

自然リンパ球による腸管上皮幹細胞の分化・機能制御

千葉大学

真菌医学研究センター 感染免疫分野 微生物・免疫制御プロジェクト

後藤 義幸

1. はじめに

腸管は食餌性抗原や病原性、非病原性細菌をはじめとする無数の外来抗原に恒常的に曝されている特殊な組織である。腸管は単層の上皮細胞に覆われ、この上皮細胞層は外来抗原に対して物理的、免疫学的な第一線の防御バリアを形成している。例えば、腸管上皮細胞サブセットの一つである杯細胞は粘液の産生に特化した細胞であり、パネート細胞はディフェンシンなどの抗菌物質を産生することで、管腔内に存在する微生物の腸管組織内への侵入を阻んでいる。

腸管上皮細胞は、管腔に存在する病原性、非病原性の常在微生物に常に対峙するという特殊な環境下にあり、それらの微生物と相互作用することが知られている。例えば、上皮細胞が細胞表面上に発現する糖鎖、特に $\alpha 1, 2$ -フコースはノロウイルスやロタウイルスに結合し、感染成立の足場となるだけでなく、*Bacteroides* に代表される腸内細菌が産生するフコシダーゼによって切断され、細菌に取り込まれて異化されるだけでなく、フコースオペロンを介した遺伝子の発現制御や細胞壁構成成分の合成に再利用することが報告されている（参考文献1）。このことから、腸管上皮細胞が発現する $\alpha 1, 2$ -フコースは、宿主と腸内細菌間における共生因子の一つであると考えられている。また、上皮細胞に $\alpha 1, 2$ -フコースを付加するフコース転移酵素である Fucosyltransferase 2 (Fut2) は、ヒトにおいて不活性型変異多型の存在が知られており、その多型はクローン病やI型糖尿病、原発性硬化性胆管炎などの炎症性疾患の関連遺伝子の一つであることが Genome Wide Association Study (GWAS) から明らかとなっている（発表論文1）。以上の背景から、腸管上皮細胞の Fut2 ならびに $\alpha 1, 2$ -フコースの発現誘導機構を明らかにすることは、医学的・生物学的な観点から重要な課題と考えられる。我々はこれまでに腸管上皮細胞の Fut2 および $\alpha 1, 2$ -フコースの発現誘導機構を解析し、腸内細菌の一種であるセグメント細菌（segmented filamentous bacteria: SFB）が、腸管における代表的な自然免疫系細胞である3型自然リンパ球（Group 3 innate lymphoid cells: ILC3）に作用し、IL-22の産生を惹起することで、腸管上皮細胞の $\alpha 1, 2$ -フコース付加（フコシル化）を誘導することを見出している（参考文献2）。このことから腸内細菌、宿主腸管免疫細胞、上皮細胞の三者間ネットワークが、上皮細胞の糖鎖修飾を誘導し、腸内微生物との共生基盤の形成に寄与していることが明らかとなった。しかしながら、これまでのところ $\alpha 1, 2$ -フコース誘導メカニズムの一つとして、腸管局所における ILC3 と上皮細胞の相互作用の詳細は未だ明らかとなっていない。

円柱上皮細胞を含む全ての腸管上皮細胞サブセットは、絨毛陰窩部位に存在する Lgr5 陽性の上皮幹細胞から分化することが知られており、上皮細胞層ならびに腸管の恒常性維持に極めて重要な役割を担っている。また、ILC3 が産生する主なサイトカインである IL-22 は、腸管上皮細胞の増殖を促進することが報告されており、ILC3 から産生される IL-22 が腸管上皮細胞層の恒常性維持に寄与している可能性が示唆される。しかしながら ILC3 による腸管上皮幹細胞の動態、遺伝子発現や機能制御の詳細については不明な点が多い。そこで本研究では、特に腸管絨毛の陰窩部位に着目し、ILC3 と IL-22 による上皮幹細胞の制御機構を $\alpha 1, 2$ -フコシル化を含めて明らかにすることを目的とする。

2. 方法

2-1. $\alpha 1, 2$ -フコシル化腸管上皮細胞の動態解析

腸内細菌によって誘導される腸管上皮細胞の $\alpha 1, 2$ -フコシル化を経時的に観察し、 $\alpha 1, 2$ -フコシル化の動態を明らかにするために、無菌マウスや抗生物質処理マウスを通常飼育環境下におき、1日後、3日後、5日後の回腸上皮細胞の $\alpha 1, 2$ -フコシル化を免疫組織学的に解析した。

2-2. 腸内細菌による ILC3 の遺伝子発現解析

腸内細菌が ILC3 の遺伝子発現に与える影響を解析するために、野生型および抗生物質処理した Roryt-GFP マウスの十二指腸および回腸粘膜固有層から CD3⁺Roryt⁺細胞 (ILC3) をフローサイトメトリーにより分離し、IL-22を含む遺伝子の発現解析を行った。

2-3. IL-22 による腸管上皮幹細胞の $\alpha 1, 2$ -フコシル化ならびに遺伝子発現解析

IL-22 による腸管上皮幹細胞の $\alpha 1, 2$ -フコシル化ならびに遺伝子発現を解析するために、4週齢の Lgr5-GFP マウスの小腸絨毛陰窩部位に存在する上皮幹細胞を分離し、R-spondin1、Noggin、EGF と共培養することで腸管オルガノイドを作製した。作製した腸管オルガノイドの培養液中に recombinant IL-22 を 5 ng/mL の濃度で加え、3日間培養した後にオルガノイドを回収し、whole-mount 組織染色とフローサイトメトリー解析により、腸管上皮細胞ならびに上皮幹細胞の $\alpha 1, 2$ -フコシル化を観察するとともに、IL-22 によって誘導さ

れる遺伝子の発現解析を行った。

3. 結果 研究成果

3-1. $\alpha 1, 2$ -フコシル化腸管上皮細胞の動態解析

無菌マウスおよび抗生物質処理マウスを、通常の飼育環境下において腸内細菌を定着させ、 $\alpha 1, 2$ -フコース陽性である上皮細胞の動態を観察した。その結果、無菌および抗生物質処理マウスの回腸では、 $\alpha 1, 2$ -フコース陽性の上皮細胞はほとんど観察されないのに対し、これらのマウスに腸内細菌を移植すると、移植後1日目には絨毛の陰窩部位において $\alpha 1, 2$ -フコシル化が観察され、移植後3日目には絨毛の下部から陰窩部位にかけての上皮細胞において $\alpha 1, 2$ -フコシル化が観察され、さらに移植後5日目には全ての絨毛がフコシル化されたことから、上皮細胞の $\alpha 1, 2$ -フコシル化は絨毛陰窩部分、特に上皮幹細胞において誘導される可能性が示唆される。なお、上皮細胞サブセットにおける $\alpha 1, 2$ -フコシル化を観察したところ、パネート細胞は無菌ならびに抗生物質処理マウスでも $\alpha 1, 2$ -フコシル化が観察される一方、円柱上皮細胞、杯細胞は腸内細菌移植前では $\alpha 1, 2$ -フコースの発現は観察されないのに対し、移植後1日目から5日目にかけて、 $\alpha 1, 2$ -フコシル化することが明らかとなった。

3-2. 腸内細菌によるILC3の遺伝子発現解析

我々は野生型マウスにおいて、十二指腸部位の上皮細胞は $\alpha 1, 2$ -フコシル化されておらず、回腸部位の上皮細胞はそのほとんどが $\alpha 1, 2$ -フコシル化されていることを見出していた。また $\alpha 1, 2$ -フコースはILC3から産生されるIL-22によって誘導されることから、腸内細菌の局在によってILC3の遺伝子発現、特にIL-22の発現が制御される可能性が考えられた。そこで、野生型および抗生物質処理したRoryt-GFPマウスの十二指腸および回腸からILC3を分離し、IL-22の発現量を比較した。その結果、野生型マウスにおいてILC3におけるIL-22の発現は十二指腸より回腸の方が高く、抗生物質処理マウスではその発現が十二指腸レベルまで低下していた。また、抗生物質処理マウスを通常の飼育環境下におき腸内細菌を移植すると、回腸ILC3におけるIL-22の発現量は、野生型マウスのレベルまで回復した。一方、 $\alpha 1, 2$ -フコース誘導に必要なもう一つのILC3発現サイトカインであるLymphotoxin (LT) α および β の発現を観察したところ、野生型と抗生物質処理マウスの十二指腸および回腸におけるILC3の間において、有意な差は観察されなかった。

3-3. IL-22による腸管上皮幹細胞の $\alpha 1, 2$ -フコシル化ならびに遺伝子発現解析

ILC3から主に産生されるIL-22による腸管上皮幹細胞の $\alpha 1, 2$ -フコシル化ならびに遺伝子発現制御を明らかにするために、Lgr5-GFPマウスの小腸から分離した上皮幹細胞を試験管内で培養し、腸管オルガノイドを作製した。この腸管オルガノイドの培養液中にIL-22およびコントロール (BSA/PBS) を添加し、3日間培養した結果、IL-22を添加した群において上皮細胞の $\alpha 1, 2$ -フコシル化が誘導されたことを、whole-mount組織染色法により確認した。さらにフローサートメトリーを用いて、Lgr5陽性の上皮幹細胞と陰性の上皮細胞 (円柱上皮細胞、杯細胞、パネート細胞などを含む) に分け、 $\alpha 1, 2$ -フコシル化を観察したところ、Lgr5陽性および陰性の上皮細胞において $\alpha 1, 2$ -フコシル化が観察された。なお、Fut2欠損マウスの腸管オルガノイドを作製し同様の実験を行ったところ、IL-22によって誘導される $\alpha 1, 2$ -フコシル化はほぼ完全に消失していた。また、IL-22添加、非添加群のオルガノイドからmRNAを抽出し、 $\alpha 1, 2$ -フコシル化を司るFut2やLgr5、抗菌物質であるRegIII β/γ 、Lyz1、Defa6などの遺伝子発現を観察したところ、これらの遺伝子の発現がIL-22添加群において有意に上昇していた。また、IL-22添加群のオルガノイドは、非添加群に比べ、オルガノイドの大きさやbuddingの数が有意に多いことが明らかとなった。

4. 考察 まとめ

無菌および抗生物質処理マウスへの腸内細菌移植を行ったところ、特に移植後3日目の結果から上皮細胞の $\alpha 1, 2$ -フコシル化は、絨毛の陰窩部位から発生していることが示唆された。この結果から、絨毛陰窩部位に存在する上皮幹細胞が $\alpha 1, 2$ -フコシル化され、 $\alpha 1, 2$ -フコシル化上皮幹細胞が増殖することによって絨毛全体の上皮細胞が $\alpha 1, 2$ -フコシル化されるというモデルが考えられる。一方、無菌マウスや抗生物質処理マウスのパネート細胞において $\alpha 1, 2$ -フコシル化が観察され、腸内細菌移植後に円柱上皮細胞や杯細胞で $\alpha 1, 2$ -フコシル化が誘導されたことから、上皮細胞サブセット間で腸内細菌依存的、非依存的な $\alpha 1, 2$ -フコシル化誘導機構が存在することが示された。また、腸内細菌依存的な $\alpha 1, 2$ -フコシル化の誘導はFut2が担っていることから、パネート細胞の $\alpha 1, 2$ -フコシル化はFut2非依存的である可能性が示唆される。

野生型および抗生物質処理マウスにおいて、ILC3からのIL-22の発現を観察した結果、野生型マウスでは十二指腸より回腸部位におけるILC3の方がIL-22の発現が高く、抗生物質処理マウスにおいて、その発現が減少することが示された。このことから、野生型マウスの回腸部位におけるILC3のIL-22発現は腸内細菌依存的に誘導されることが明らかとなった。また、このことは回腸部位特異的に存在する腸内細菌がILC3からのIL-22発現を誘導する可能性を示している。事実、上皮細胞の $\alpha 1, 2$ -フコース発現を誘導するSFBは回腸上皮層に特異的に定着する細菌であることが知られており、SFBが定着することによる刺激がILC3からのIL-22の発現を誘導することが示唆される。一方、IL-22とは異なり、ILC3におけるLT α やLT β の発現は、野生型および抗生物質処理マウスの十二指腸と回腸間において有意な差は見られなかった。このことから、ILC3は腸内細菌依存、非依存的にサイトカインを産生することが示された。現在までに、ILC3が発現するLTとIL-22の関係性は明らかとなっていないものの、病原性細菌感染モデルにおいて、ILC3上のLTは樹状細胞からのIL-23の産生を促進し、オートクライン的にILC3からのIL-22発現を誘導する報告がされていることから、SFBによる

IL-22発現の誘導にもLTが関与しているのかもしれない（参考文献3）。

Lgr5-GFPマウスから腸管オルガノイドを作製しIL-22で刺激すると、Lgr5陽性の上皮幹細胞において $\alpha 1$, 2-フコシル化が観察されたことから、上皮幹細胞がIL-22の刺激を受けることで $\alpha 1$, 2-フコシル化することが示された。またIL-22によって誘導される $\alpha 1$, 2-フコシル化はFut2欠損マウスのオルガノイドで消失したことから、IL-22が上皮幹細胞にFut2の発現を誘導し $\alpha 1$, 2-フコシル化する可能性が考えられる。実際、腸管オルガノイドをIL-22によって刺激したところFut2の発現が30倍以上に大きく亢進したことから、IL-22によって誘導される $\alpha 1$, 2-フコシル化は、Fut2を介して誘導されることが裏付けられている。また、IL-22刺激によりFut2のみならず、上皮幹細胞のマーカーであるLgr5の遺伝子発現も亢進していた。このことから、ILC3が産生するIL-22は上皮幹細胞の増殖を促進する働きがある可能性が考えられる。今後は、IL-22Rおよび下流に存在する転写因子であるSTAT3による上皮幹細胞の増殖制御についての研究が、重要となるであろう。

IL-22はさらにパネート細胞や円柱上皮細胞から産生される抗菌物質の発現も亢進しており、上皮幹細胞の各上皮細胞サブセットへの分化や遺伝子発現に影響を与えている可能性があり、今後の研究の展開が期待される。また免疫学的な観点からは、ILC3およびその他の細胞、例えばTh17細胞が産生するIL-22に、どのような役割の違いがあるのかについても興味深く、今後の解析が期待される。

5. 発表論文、参考文献

<発表論文>

1. Goto Y, Uematsu S, Kiyono H. Epithelial glycosylation in gut homeostasis and inflammation. *Nat Immunol.* 2016; 17: 1244-1251

<参考文献>

1. Comstock LE & Kasper DL. Bacterial glycans: key mediators of diverse host immune responses. *Cell* 2006 ; 126 : 847-850.
2. Goto, Y. Obata T, Kunisawa J, Sato S, Ivanov II, Lamichhane A, Takeyama N, Kamioka M, Sakamoto M, Matsuki T, Setoyama H, Imaoka A, Uematsu S, Akira S, Domino SE, Kulig P, Becher B, Renauld JC, Sasakawa C, Umesaki Y, Benno Y, Kiyono H. Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science* 2014 ; 345 : 1254009.
3. Tumanov AV, Koroleva EP, Guo X, Wang Y, Kruglov A, Nedospasov S, Fu YX. Lymphotoxin controls the IL-22 protection pathway in gut innate lymphoid cells during mucosal pathogen challenge. *Cell Host Microbe*. 2011 ; 10 : 44-53.