

Metabolic gene reprogramming is essential to develop Intraepithelial lymphocytes

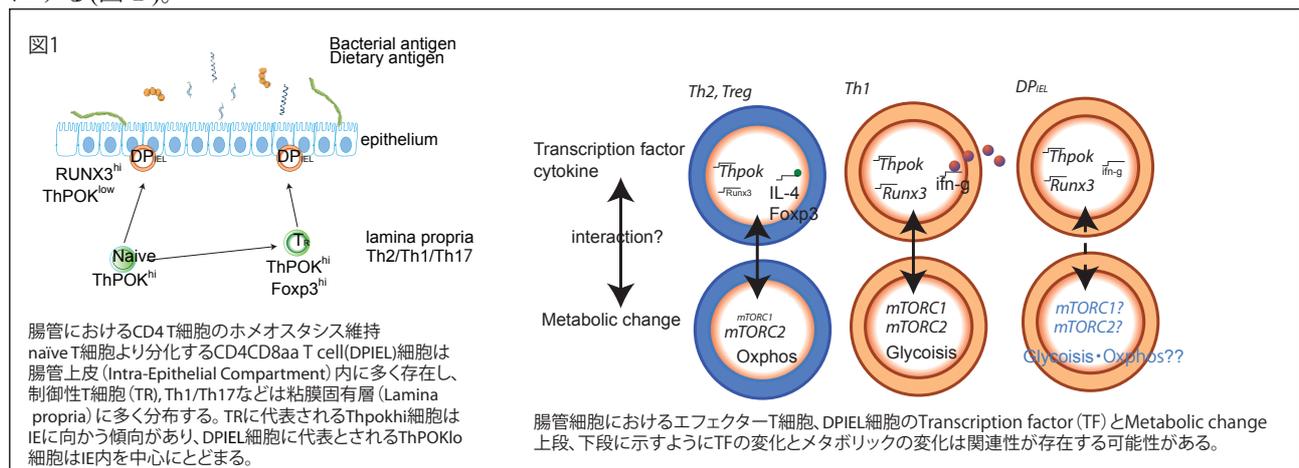
慶應義塾大学 医学部 消化器内科
筋野智久

研究背景

近年、免疫系におけるシグナル伝達においてメタボリックな変化が重要であることが判明している。自然免疫系のいわゆるマクロファージなどは培養系が樹立していることから *in vitro* において比較的容易に細胞内のメタボリック解析が進んでいる(O'Neil. Cell 2012, Nature 2013)が、T細胞は解析が進んでいないのが現状である。脾臓における Tregs は Fatty Acid oxidation (FAO)を使用した Catabolic な細胞集団であり、Th17 細胞は Anabolic な細胞集団が判明しているが(Michalek RD. JI 2011)、腸管内末梢の細胞は分取困難のため *in vivo* での検討は行われていない。そこで我々は腸管内の T細胞の metabolic 変化を詳細に解析することで腸管ホメオスタシスの維持機構を検討する。腸管粘膜固有層における helper CD4 T細胞 (Th1,Th17) が炎症惹起に重要である(Sujino T. Gastroenterology 2011)。一方で、腸管上皮内に存在する T細胞は通常 KLRG 1 陽性の terminal differentiated cell であり memory T細胞に分類されると考えられている。申請者は腸管上皮内において CD4⁺CD8aa⁺ (Double positive :DP_{IEL}) T細胞というユニークな細胞集団が炎症抑制機能を持つことを証明した(Sujino T. Science 2016) (図1)。今回の検討では腸管における DP_{IEL} T細胞の metabolic phenotype を解析することで、metabolism を制御し炎症をコントロールすることを目的にする。

CD4⁺T細胞は TCRシグナルを受けると serine/threonine kinase である mTORC1 を介し、aerobic glycolysis, sterol biosynthesis を促進させ、細胞増殖に寄与する。しかし、長期生存する memory, tissue resident CD4細胞において mTORC 以下の解析は進んでいないのが現状である。腸管上皮内では CD4⁺CD8aa⁺ T細胞 (Double positive :DP_{IEL}) というユニークな細胞集団が存在する。DP_{IEL}は、加齢とともに増加し、MHCclass2 restricted な細胞であることが判明しているが、その役割については未だに明らかではない。申請者は DP_{IEL} が粘膜固有層の Treg から一部分化し、腸管局所の炎症抑制に貢献していることを発見し報告した (Sujino T. Science 2016.)。本研究では DP_{IEL} の細胞内代謝及び、代謝に関わる因子 mTOR との関連性を明らかにすることで、腸管ホメオスタシスの維持機構を解明する。

細胞内に成長因子シグナル、活性化シグナルが入ると mTORC1 が上昇し、転写因子 Stat3 の活性化、解糖系の *hif1a* の亢進、Lipid synthesis の亢進を促進すると言われている。例えば腸管粘膜固有層に多く存在する Th17細胞は mTORC1 上昇、mTORC2 低下、Th2,Treg は mTORC2 上昇、mTORC1 低下している。DP_{IEL}細胞の細胞内の代謝経路を詳細に解析することで、DP_{IEL}細胞の分化およびホメオスタシスにおける役割を明らかにする(図1)。



結果 1 腸管上皮内細胞の移動スピードの変化

まず、腸管上皮内細胞における移動速度を2光子顕微鏡にて観察した。OT2:Thpok^{gfp}:RFPマウスより naive T細胞を分取し、RAG2KOマウスに移入後、OVA抗原を含んだ食事を2週間投与した。投与後2光子顕微鏡にて腸管内の細胞の挙動を観察すると、Thpok陽性細胞 (GFP⁺RFP⁺) は腸管粘膜固有層に多く、Thpok陰性細胞 (GFP⁻RFP⁺) は腸管上皮内に多く存在することを見出した。腸管上皮内T細胞におけるGFP陰性細胞の多くはCD4CD8aa陽性細胞であることを確認した。次にGFPの輝度により細胞集団を3群に分割し細胞移動速度を検討した。GFP^{hi}の細胞集団と比較しGFP^{lo}の細胞集団では有意に細胞移動速度の上昇を認めた。以上の結果より腸管上皮細胞におけるThpokの遺伝子発現に応じて細胞がlocation, Speedを変化させていることを確認した。本結果は腸管上皮内におけるT細胞がダイナミックに腸管内で代謝状態を変化させている可能性を示している。

結果2 腸管上皮細胞の代謝状態の解析
 近年 *seahorse* を利用し腸管内の代謝状態を解析することが可能となった。Spleen naïve T 細胞、腸管上皮内より分取した CD4 細胞、腸管上皮内に特異的に存在する TCRgd 細胞を分取し、*seahorse* を利用し細胞内代謝を解析した(図3)。OCR測定において Naïve T 細胞と比較し、腸管上皮内 CD4 T 細胞は有意に減少していた。一方で腸管上皮内 CD4 T 細胞は ECAR では Naïve T 細胞より有意に上昇しており、Glycolysis を有意に利用していることが判明した。一方 TCRgd 細胞との有意差はなく、腸管上皮内における細胞集団は naïve T 細胞と比較し glycolysis を利用していることは明らかとなった。

結果3 腸管上皮内細胞における代謝関連遺伝子の追究

次に腸管上皮内 T 細胞における代謝関連遺伝子の変化を検討するために腸管上皮内における CD4⁺CD8^{aa}T (SP_{IEL})細胞及び DP_{IEL}細胞を FACS で分取し遺伝子発現の解析を

行った。既報では腸管上皮内の CD8 陽性細胞は脂肪酸を代謝する遺伝子の上昇を認めると報告があり RNAseq で検討を行ったが(図4A)、SP_{IEL}、DP_{IEL} 間での有意な上昇は認めなかった。一方で解糖系代謝における regulator として報告されている mTORC1, また細胞内骨格構成に重要とされている mTORC2 について PCR を施行した。興味深いことに mTORC1, mTORC2 とともに DP_{IEL} が SP_{IEL} と比較し上昇していることを見出した。mTORC1 は細胞内代謝のキーであり、下流

における Glycolysis, Lipid metabolism, protein synthesis を制御している。mTORC1 の上流にある Glut1 については優位差を認めず、また下流の Lipid synthesis に関与する SREBP1/SREBP2 についても naïve T cell と比較し上昇は認めるものの、一方で DP_{IEL}, SP_{IEL} での差は認められなかった。興味深いことに Glycolysis, Hypoxia における遺伝子である Hif1 について検討すると、SP_{IEL} で DP_{IEL} と比較し有意な上昇を認めた(図4B)。本結果は腸管上皮内 T 細胞において mTORC1 の上昇を認めるにもかかわらず、その下流に存在する Hif1 が低下することで DP_{IEL} が存在することが判明した。

次に mTOR を変化させることで DP_{IEL} の分化誘導を制御可能であるかについて検討した。AMPK を活性化することで mTORC1 を特異的に阻害する 2 DG 投与において DP_{IEL} 細胞の分化誘導に差を認めるか検討した。6 週齢野生型マウスに対し、2DG を 4 週間投与し解析を行った。DP_{IEL} は 2DG 投与群においてコントロール群と比較し著明に減少していることを確認した。本結果は mTORC1 シグナルが DP_{IEL} 細胞誘導に重要であることを示している。次に mTORC1 の直接阻害である rapamycin を投与し検討した。前者の実験と同様に 6 週齢野生型マウスに rapamycin を 4 週間投与し解析した。興味深いことに 2DG とは異なり、rapamycin 投与群においてコントロールより DP_{IEL} が有意に増加することを確認した。本検討より mTORC1 の直接、間接的な阻害により腸管上皮内の DP_{IEL} 細胞分化誘導が制御されていることが判明した(図5 A, B)。

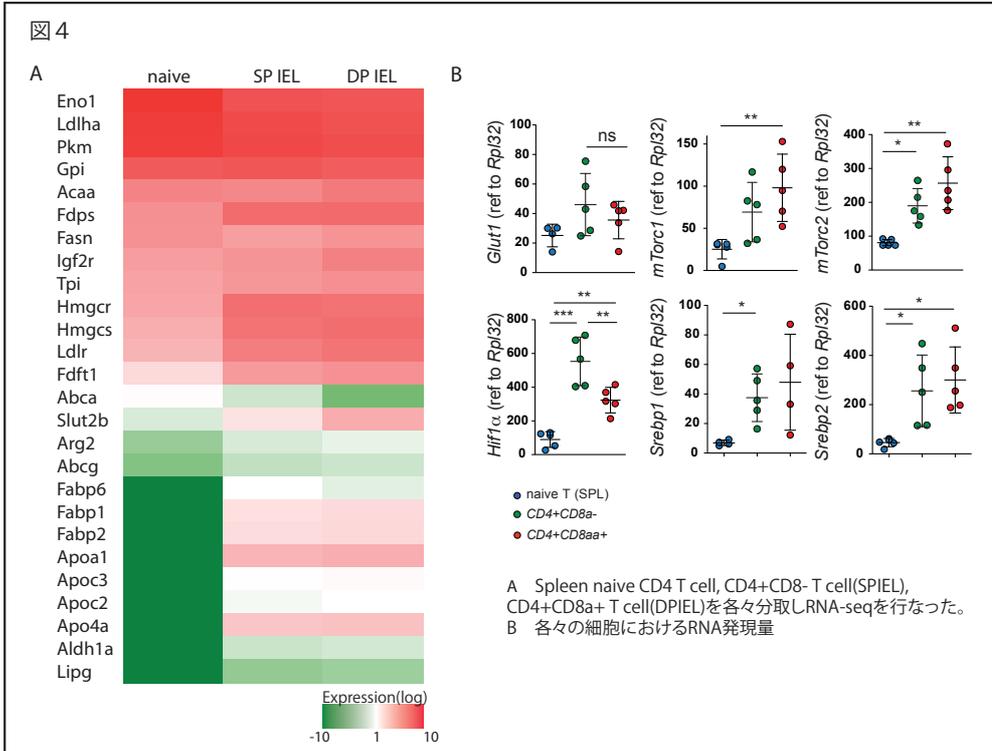
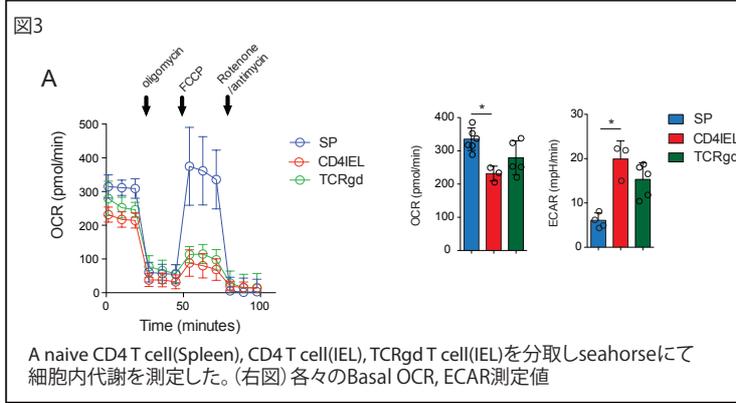
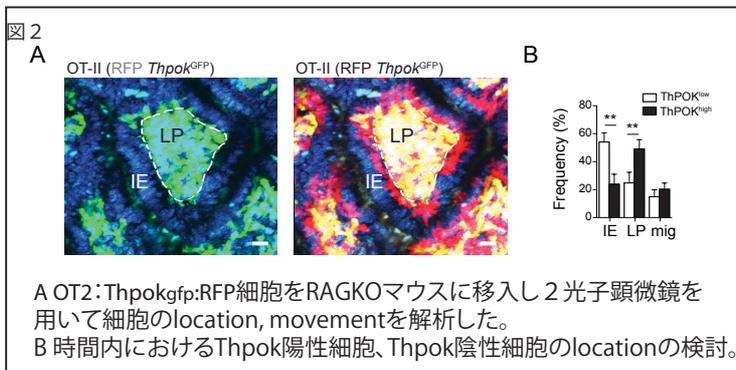


Figure 4: RNA-seq analysis of gene expression. Panel A is a heatmap showing log expression of various genes in naive, SP^{IEL}, and DP^{IEL} cells. Panel B is a dot plot showing relative expression of Glut1, mTORC1, mTORC2, Hif1^α, Srebp1, and Srebp2 in naive T (SPL), CD4⁺CD8^a, and CD4⁺CD8^{aa} cells.

最後に mTORC 下流に存在する Hif1 の腸管上皮への影響を検討する目的で、*Cd4cre; hif1^{fl/fl}* (Δ Hif1), 及び Hif1 のユビキチン化による分解を促進する Vhl 欠損マウスである *Cd4cre; vhl^{fl/fl}* (Δ Vhl) マウスを作成し、腸管上皮内の DP_{IEL} 細胞の分化誘導を検討した。 Δ Hif1 マウスは有意に腸管上皮内 DP_{IEL} 細胞の割合が上昇しており、一方 Hif1 の発現上昇を認める Δ Vhl

マウスにおいて DP_{IEL} 細胞の割合が減少した(図 6A, B)。本結果より腸管上皮内 T 細胞の分化制御に Hif1 の発現量が大きく関わっていることが明らかとなった。

結論

これまで T 細胞の代謝は着目されてきたが多くの Spleen における memory, naïve T 細胞が中心であり、組織内 resident 細胞にはあまり

着目されてこなかった。今回申請者は初めて生体腸管上皮内における CD4 T 細胞のエネルギー状態を明らかにし、1 : 腸管上皮内 CD4 特に CD4CD8 α 陽性 (DP_{IEL}) 細胞が上皮内に多く存在し、細胞移動スピードが上昇していること。2 : DP_{IEL} 細胞が Oxphos より Glycolysis を naïve CD4 T 細胞と比較し使用していること。3 : DP_{IEL} と SP_{IEL} 細胞は脂肪酸代謝酵素関連遺伝子の発現上昇を naïve T 細胞と比較し認めるものの、DP_{IEL}, SP_{IEL} において差が認められないこと。4 : DP_{IEL} 細胞では有意に mTORC1 関連遺伝子の上昇を認めるが、下流において Hif1 α のみは減少していること。5 : hif1 の遺伝子を強制的に減弱させるマウスにおいては DP_{IEL} が有意に上皮内で増加することを見出した。

本研究において mTorc1/2 がいかに Hif の制御を行っているのか、また通常上皮内はもっとも酸素分圧が低いため Hif の上昇が著しいはずにもかかわらず、long-lived CD4 細胞と言われる炎症抑制能力を有した DP_{IEL} が Hif 発現量を下げることによって分化し誘導されるかについては明らかではない。今後 DP_{IEL} が Physiological に hif1 を減弱するメカニズムを検討する。

