

## 34. 免疫細胞による腸管上皮細胞の糖鎖修飾制御機構の解明

後藤 義幸

千葉大学 真菌医学研究センター

Key words : 上皮細胞, Fut2,  $\alpha$ 1,2-フコース, T細胞, IL-10

### 緒言

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抗原に恒常的に曝されている特殊な器官である。腸管は一層の上皮細胞に覆われており、外来抗原に対する物理的、免疫学的な第一線の防御バリアを形成している。腸管上皮細胞は細胞表面に様々な糖鎖を発現していることが知られているが、なかでもII型フコース転移酵素 (Fucosyltransferase 2: Fut2) によって糖鎖末端に  $\alpha$ 1,2-フコースが付加されている<sup>1)</sup>。興味深いことに、この  $\alpha$ 1,2-フコースは腸内細菌の一種である *Bacteroides* が産生するフコシダーゼによって切断されて取り込まれ、異化されるのみならず、フコースオペロンを介した遺伝子発現の制御や細胞壁構成成分であるフコシル化莢膜多糖の合成に再利用されることが報告されており、宿主と腸内細菌間における共生因子の一つと考えられてきた<sup>2)</sup>。さらに、*FUT2* 遺伝子の不活性型変異多型をホモに持つヒトでは *dysbiosis* が起こっており、この遺伝子多型はクローン病やI型糖尿病、原発性硬化性胆管炎、乾癬、ベーチェット病など様々な疾患の原因遺伝子の一つであることが報告されてきた<sup>3)</sup>。以上のような背景から、腸管上皮細胞の Fut2 および  $\alpha$ 1,2-フコース発現誘導・制御機構を明らかにすることは、医学的、生物学的観点から極めて重要な課題である。

我々は、これまでにセグメント細菌を含む腸内細菌と自然免疫細胞の一つである3型自然リンパ球が協調的に働くことで、腸管上皮細胞の Fut2 および  $\alpha$ 1,2-フコースの発現を誘導することを示してきた<sup>4)</sup>。一方、腸管上皮細胞の Fut2 および  $\alpha$ 1,2-フコースの発現に対する獲得免疫細胞の役割については不明であった。本研究では、獲得免疫細胞の一つである T 細胞に着目し、腸管上皮細胞の Fut2 および  $\alpha$ 1,2-フコースの発現制御機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

### 方法および結果

#### 1. T細胞受容体 (T cell receptor: TCR) $\beta$ 鎖陽性細胞が上皮細胞の $\alpha$ 1,2-フコースの発現を負に制御する

上皮細胞の Fut2 および  $\alpha$ 1,2-フコースの発現誘導・制御における獲得免疫細胞の役割を明らかにするために、T細胞およびB細胞欠損マウスを解析した。その結果、T細胞欠損およびT、B細胞欠損マウスにおいて、野生型マウスよりも上皮細胞の  $\alpha$ 1,2-フコースならびに Fut2 の発現が亢進していることを見出した (図1)。この結果から、T細胞は上皮細胞の  $\alpha$ 1,2-フコース発現を抑制することが明らかとなった。次に、上皮細胞の  $\alpha$ 1,2-フコースの発現を抑制する T細胞サブセットを同定するために、TCR  $\beta$  鎖もしくは  $\delta$  鎖を欠損したマウスを解析したところ、TCR  $\beta$  鎖を欠損したマウスは T細胞欠損マウスと同様に上皮細胞の  $\alpha$ 1,2-フコース発現が亢進していた (図2)。以上の結果から、TCR  $\beta$  鎖陽性 T細胞が上皮細胞の  $\alpha$ 1,2-フコース発現を負に制御することが示された。

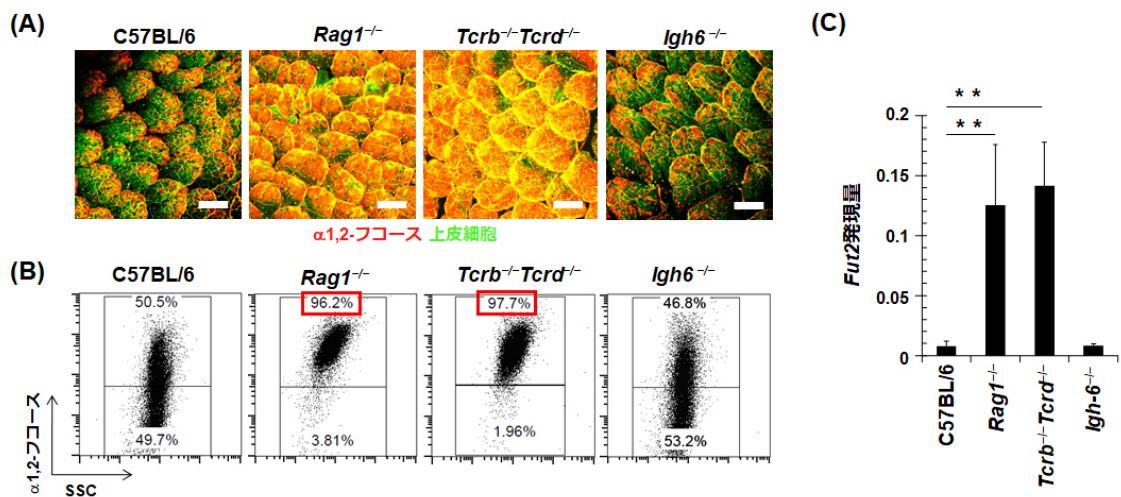


図 1. T 細胞は上皮細胞の  $\alpha 1, 2$ -フコース発現を負に制御する

(A) 野生型、*Rag1* 欠損、*Tcrbd* 欠損、*Igh6* 欠損マウス回腸の共焦点レーザー顕微鏡写真 (Whole-mount 染色)。UEA-1 (赤:  $\alpha 1, 2$ -フコース) と WGA (緑: 上皮細胞) による蛍光二重染色。スケールバー=100  $\mu\text{m}$  (B) 野生型、*Rag1* 欠損、*Tcrbd* 欠損、*Igh6* 欠損マウス回腸上皮細胞の UEA-1 によるフローサイトメトリー解析結果。(C) 野生型、*Rag1* 欠損、*Tcrbd* 欠損、*Igh6* 欠損マウス回腸上皮細胞の *Fut2* 遺伝子発現量。Error bar: SD. \*\*  $P < 0.01$ . *t* 検定。

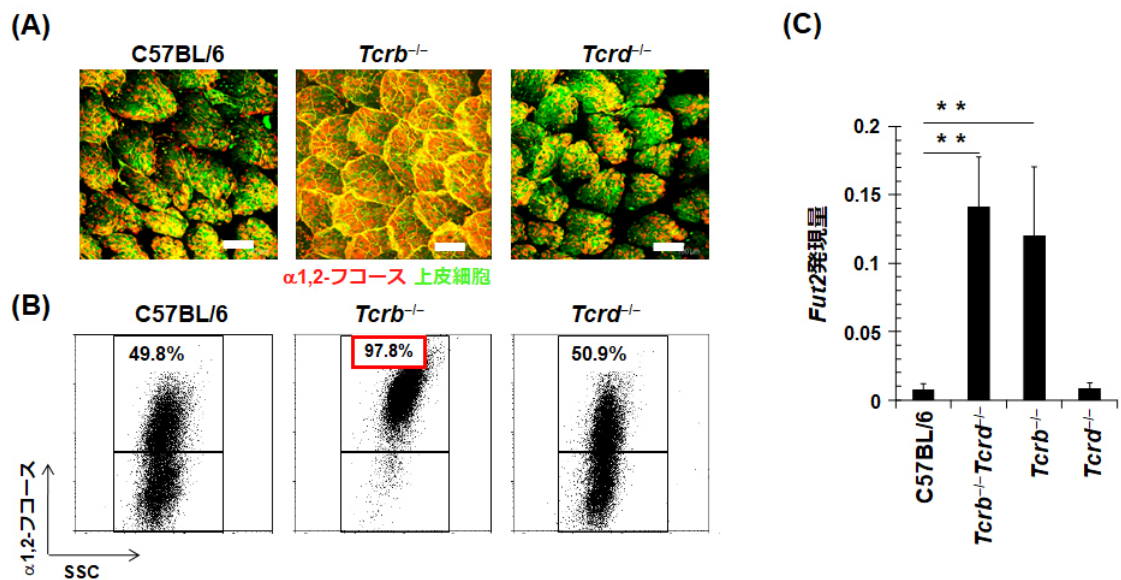


図 2. TCR  $\beta$  鎖陽性 T 細胞は上皮細胞の  $\alpha 1, 2$ -フコース発現を負に制御する

(A) 野生型、*Tcrb* 欠損、*Tcrd* 欠損マウス回腸の共焦点レーザー顕微鏡写真 (Whole-mount 染色)。スケールバー = 100  $\mu\text{m}$ 。UEA-1 (赤:  $\alpha 1, 2$ -フコース) と WGA (緑: 上皮細胞) による蛍光二重染色。(B) 野生型、*Tcrb* 欠損、*Tcrd* 欠損マウス回腸上皮細胞の UEA-1 によるフローサイトメトリー解析結果。(C) 野生型、*Tcrb* 欠損、*Tcrd* 欠損マウス回腸上皮細胞の *Fut2* 遺伝子発現量。Error bar: SD. \*\*  $P < 0.01$ . *t* 検定。

## 2. CD4T 細胞が上皮細胞の $\alpha 1, 2$ -フコスの発現を負に制御する

腸管上皮細胞の  $\alpha 1, 2$ -フコスを抑制する T 細胞サブセットをさらに絞り込むために、TCR  $\beta$  鎖欠損マウスに野生型由来 CD4T 細胞もしくは CD8T 細胞を移入した。その結果、CD4T 細胞を移入したマウスでは、TCR  $\beta$  鎖欠損マウスで異常に増加していた  $\alpha 1, 2$ -フコースおよび Fut2 の発現が野生型マウスと同程度に低下した (図 3)。この結果から、TCR  $\beta$  鎖陽性 CD4T 細胞が上皮細胞の  $\alpha 1, 2$ -フコスの発現を抑制することが示された。

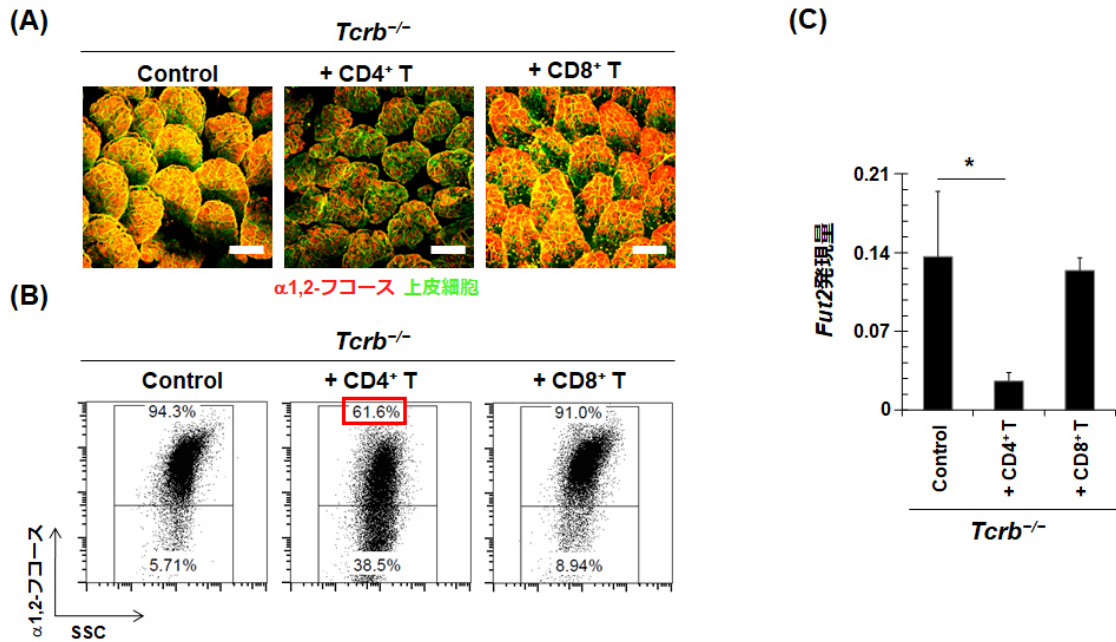


図 3. CD4 陽性 T 細胞は上皮細胞の  $\alpha 1, 2$ -フコース発現を負に制御する

(A) CD4T もしくは CD8T 細胞を移入した Tcr  $\beta$  欠損マウスの 4 週間後における回腸の共焦点レーザー顕微鏡写真 (Whole-mount 染色)。UEA-1 (赤:  $\alpha 1, 2$ -フコース) と WGA (緑: 上皮細胞) による蛍光二重染色。スケールバー =  $100 \mu\text{m}$  (B) CD4T もしくは CD8T 細胞を移入した Tcr  $\beta$  欠損マウスの 4 週間後における回腸上皮細胞の UEA-1 によるフローサイトメトリー解析結果。(C) CD4T もしくは CD8T 細胞を移入した Tcr  $\beta$  欠損マウスの 4 週間後における回腸上皮細胞の Fut2 遺伝子発現量。Error bar: SD. \*  $P < 0.05$ .  $t$  検定。

## 3. IL-10 産生 CD4T 細胞が上皮細胞の $\alpha 1, 2$ -フコスの発現を負に制御する

CD4T 細胞が上皮細胞の  $\alpha 1, 2$ -フコスの発現を抑制する分子機構を明らかにするために、CD4T 細胞が産生するサイトカインに着目し、各種サイトカイン欠損マウスを解析した。その結果、抑制性サイトカインである IL-10 を欠損したマウスにおいて、上皮細胞の  $\alpha 1, 2$ -フコースならびに Fut2 の発現が亢進していた (図 4)。さらに、野生型または IL-10 欠損マウスから CD4T 細胞を分離し、TCR  $\beta$  鎖欠損マウスに移入したところ、野生型マウス由来 CD4T 細胞は上皮細胞の  $\alpha 1, 2$ -フコース発現を抑制したのに対し、IL-10 欠損マウス由来の CD4T 細胞を移入しても、上皮細胞の  $\alpha 1, 2$ -フコスの発現は TCR  $\beta$  鎖欠損マウスと同様に亢進したままであった (図 4)。これらの結果から、IL-10 を産生する TCR  $\beta$  鎖陽性 CD4T 細胞、つまり制御性 T 細胞 (Treg/Tr-1) が上皮細胞の  $\alpha 1, 2$ -フコースならびに Fut2 の発現を抑制することが明らかとなった。以上の内容は、Scientific Reports 誌に原著論文として発表し、さらに  $\alpha 1, 2$ -フコスの誘導・制御機構をまとめた総説として Nature Immunology 誌に発表した<sup>5,6)</sup>。

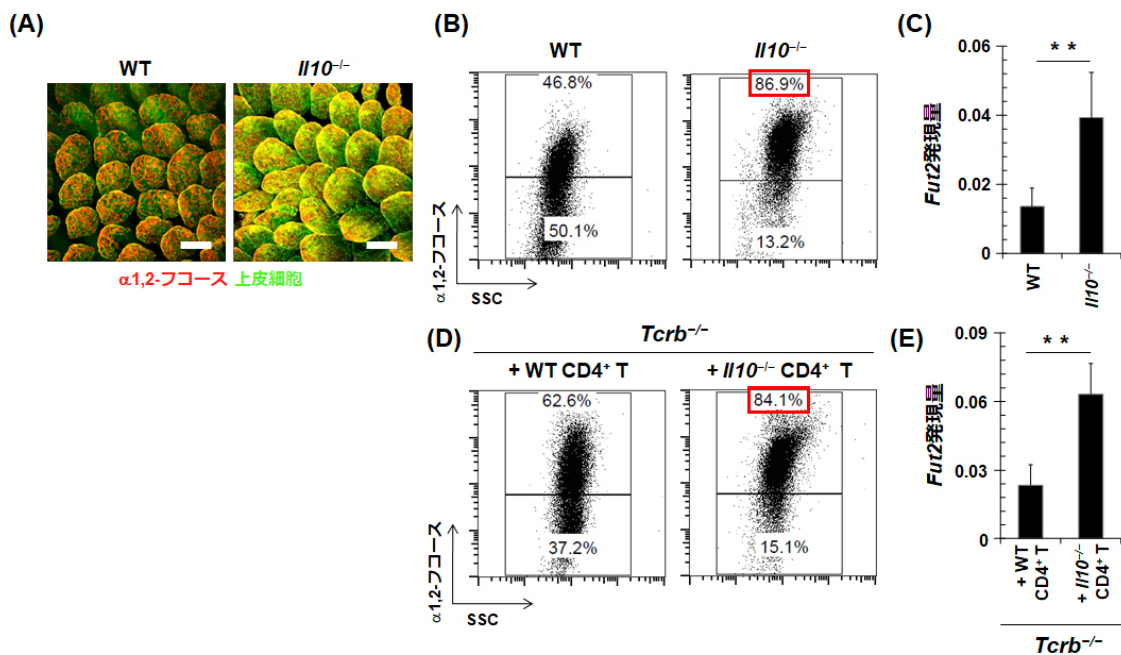


図 4. CD4 陽性 T 細胞は IL-10 を介して上皮細胞の  $\alpha 1, 2$ -フコース発現を負に制御する  
 (A) 野生型、IL10 欠損マウス回腸の共焦点レーザー顕微鏡写真 (Whole-mount 染色)。UEA-1 (赤:  $\alpha 1, 2$ -フコース) と WGA (緑: 上皮細胞) による蛍光二重染色。スケールバー =  $100 \mu\text{m}$  (B) 野生型、IL10 欠損マウス回腸上皮細胞の UEA-1 によるフローサイトメトリー解析結果。(C) 野生型、IL10 欠損マウス回腸上皮細胞の *Fut2* 遺伝子発現量。(D) 野生型もしくは IL10 欠損マウス由来 CD4T 細胞を移入した *Tcrb* 欠損マウスの 4 週間後における回腸上皮細胞の UEA-1 によるフローサイトメトリー解析結果。(E) 野生型もしくは IL10 欠損マウス由来 CD4T 細胞を移入した *Tcrb* 欠損マウスの 4 週間後における回腸上皮細胞の *Fut2* 遺伝子発現量。Error bar: SD. \*\*  $P < 0.01$ . *t* 検定。

## 考 察

これまでの知見と本研究で得られた結果から、腸管上皮細胞の  $\alpha 1, 2$ -フコースの発現は自然免疫細胞である 3 型リンパ球と獲得免疫細胞である IL-10 産生 CD4T 細胞によって、正または負に制御されることが示された。 $\alpha 1, 2$ -フコースは病原性細菌に対する感染防御機能を有していることから、T 細胞が欠損することによる  $\alpha 1, 2$ -フコース発現の亢進は、獲得系免疫の異常に対する自然免疫の補完的な機能である可能性が考えられる。しかしながら、これまでのところ T 細胞による上皮細胞の  $\alpha 1, 2$ -フコース発現を抑制する意義については明らかになっていない。糖鎖は細胞の機能に深く関わっていることから、 $\alpha 1, 2$ -フコースが高発現すると細胞の機能に何らかの異常が生じるのかもしれない。また制御性 T 細胞は IL-10 を産生することで炎症性腸疾患の発症を抑制し、腸管の恒常性維持に寄与しているが、IL-10 産生 T 細胞は上皮細胞の  $\alpha 1, 2$ -フコースの発現を調節し、腸管の恒常性を維持していることが考えられる。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学医科学研究所炎症免疫分野の清野宏教授である。最後に、本研究の御支援をいただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Becker DJ, Lowe JB. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology*. 2003 Jul;13(7):41R-53. PubMed PMID: 12651883

- 2) Comstock LE & Kasper DL. Bacterial glycans: key mediators of diverse host immune responses. *Cell*. 2006 Sep 8;126(5):847-50. PubMed PMID: 16959564
- 3) Maroni L, van de Graaf SF, Hohenester SD, Oude Elferink RP, Beuers U. Fucosyltransferase 2: a genetic risk factor for primary sclerosing cholangitis and Crohn's disease-a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2015 Jun;48(2-3):182-91. PubMed PMID: 24828903
- 4) 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 Sep 12;345(6202):1254009. PubMed PMID: 25214634
- 5) Goto Y, Lamichhane A, Kamioka M et al. IL-10-producing CD4(+) T cells negatively regulate fucosylation of epithelial cells in the gut. *Sci Rep*. 2015 Nov 2;5:15918. PubMed PMID: 26522513
- 6) Goto Y, Uematsu S, Kiyono H. Epithelial glycosylation in gut homeostasis and inflammation. *Nat Immunol*. 2016 Oct 19;17(11):1244-1251. PubMed PMID: 27760104