



Title	Identification of a unique subset of tissue-resident memory CD4+ T cells in Crohn' s disease
Author(s)	横井, 健人
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91809
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	横井 健人
論文題名 Title	Identification of a unique subset of tissue-resident memory CD4 ⁺ T cells in Crohn's disease (クローン病に特異的に発現するCD4陽性組織常在性記憶T細胞の同定)
<p>論文内容の要旨</p> <p>〔目 的 (Purpose)〕</p> <p>炎症性腸疾患 (IBD) は遺伝的素因に様々な環境因子が加わり、T細胞を介した異常な免疫応答が誘導されることによって発症すると考えられている。その要因の多様性にも関わらず、病型は主にクローン病 (CD) と潰瘍性大腸炎 (UC) に収束することから、各々の病型に特有の免疫学的機構が存在すると考えられる。近年、分子標的治療薬の開発により治療の選択肢が増加している一方、依然として治療抵抗性や長期的な寛解の維持が課題として残されている。本研究では手術摘出腸管検体を用いてT細胞のディーププロファイリングを行うことにより、IBD腸管に特異的に存在するT細胞サブセットと生物学的ネットワークを特定し、新たな治療標的を見出すことを目的とした。</p> <p>〔方法ならびに成績 (Methods/Results)〕</p> <p>外科的に切除されたIBD患者52人 (CD26例、UC26例) の腸管サンプルから採取した免疫細胞を27種類の細胞表面マーカーを用いてマスサイトメトリーで分析し、T細胞サブセットの組成をコントロール標本 (26例) と比較した。CD腸管ではCD161+ CCR5+ CD103+ 組織常在性記憶CD4⁺T細胞が有意に増加していた一方、UC腸管ではこのT細胞サブセットは減少し、CXCR5陽性の濾胞ヘルパーT細胞が有意に増加していた。CD161+ CCR5+ CD103+組織常在性記憶CD4⁺T細胞の割合の高いCD患者群では低いCD患者群と比較して術前CRP値が有意に高く、またCD161+ CCR5+ CD103+組織常在性記憶CD4⁺T細胞の比率と臨床的活動性の指標 (IOIBD スコア) には正の相関が認められた。次に、CD、UC、コントロールの腸管それぞれ4サンプルよりT細胞を単離し、シングルセルRNA-seq解析を行った。決定木分析ではCD161+ CCR5+ CD103+組織常在性記憶CD4⁺T細胞の遺伝子発現パターンは他のCD4⁺T細胞サブセットよりもCD8⁺T細胞サブセットに類似し、自然免疫様および細胞傷害性のパスウェイを高く発現していた。さらにCD161+ CCR5+ CD103+組織常在性記憶CD4⁺T細胞の中にCD腸管にきわめて特異的に発現するサブセットを見出した。このCD腸管に特異的な組織常在性記憶T細胞サブセットは、<i>KLRB1</i>、<i>NKG6</i>、<i>KLRG1</i>、<i>GZM</i>、<i>GNLY</i>などの自然免疫における細胞毒性に関連する多くの遺伝子を高発現し、また <i>IFNG</i>、<i>TBX21</i>、<i>CCR5</i>などのTh1細胞関連遺伝子の発現も有意に上昇していた。In vitroの解析では、CD161+ CCR5+ CD103+組織常在性記憶CD4⁺T細胞は他のCD4⁺T細胞サブセットと比較し、IL-12、IL-18、IL-7、IL-15のカクテル刺激やPMA/ionomycin刺激に対してより鋭敏に反応し、IFN-γやIL-2などTh1サイトカインを有意に高く分泌した。クローン病腸管の免疫組織学的な評価を行ったところ、CD161+ CCR5+ CD103+組織常在性CD4⁺T細胞性サブセットは、腸管上皮細胞に接する形で直下の粘膜固有層に集簇していた。こうした局在的特徴も腸管上皮細胞に対する炎症の惹起に寄与している可能性が考えられたため、ヒト腸管上皮細胞より腸管オルガノイドを作成し、これとCD161+ CCR5+ CD103+組織常在性記憶CD4⁺T細胞をIL-12、IL-18、IL-7、IL-15存在下に共培養し、細胞傷害性を調べた。サイトカイン刺激群では非刺激群と比較し、有意に培養上清中のLDHが上昇するとともに腸管オルガノイドの傷害スコアが上昇した。また、この反応はIFN-γに対する中和抗体を加えることにより有意に抑制された。</p> <p>〔総 括 (Conclusion)〕</p> <p>シングルセル解析技術を駆使し、IBD患者の腸管から採取された免疫細胞を網羅的に解析することで、CD、UCのそれぞれで増加しているT細胞サブセットを同定した。特にCDでは強い組織傷害性と向炎症性の疾患特異的な組織常在性記憶CD4⁺T細胞が出現していることが明らかとなった。本研究により、IBDの中でも特にCDにおいて病因となる細胞が同定されるとともに、その病原性の主体となる刺激因子、分泌因子および発現マーカーが明らかになった。疾患特異的組織常在性記憶T細胞は慢性炎症や炎症の再発に関与すると考えられるため、CDの長期的な寛解維持に対する治療標的となる可能性がある。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 横井 健人

	(職)	氏 名	署名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授	大園 東一
	副 査	大阪大学教授	荒瀬 尚
	副 査	大阪大学教授	長澤 丘司

論文審査の結果の要旨

IBD患者由来の腸管とコントロール腸管内の免疫細胞をマスサイトメトリーで比較することで、CD腸管ではCD161+ CCR5+ CD103+ 組織常在性記憶CD4+T細胞が増加していることを見出した。シングルセルRNA-seq解析ではこのT細胞サブセットの中にCD腸管にきわめて特異的に発現するサブセットを見出し、*IFNG*など細胞障害性を示す遺伝子が高発現していることを見出した。さらにこのサブセットは他のCD4+T細胞サブセットと比較し、サイトカイン刺激やPMA/ionomycin刺激に対してより鋭敏に反応し、IFN- γ やIL-2などTh1サイトカインを有意に高く分泌した。免疫組織学的な評価では、腸管上皮細胞に接する形で直下の粘膜固有層に集簇して存在することも見出した。

本研究により、IBDの中でも特にCDにおいて病因となる細胞が同定されるとともに、その病原性の主体となる刺激因子、分泌因子および発現マーカーが明らかになったことから博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。