慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	生体イメージングを利用した腸管内免疫細胞4次元動態解析と腸管内微小環境の統合的理解
Sub Title	Four-dimensional dynamic analysis of intestinal cells and integrated understanding of intestinal microenvironment using in vivo imaging
Author	筋野, 智久(Sujino, Tomohisa)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2022
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	制御性T細胞（Treg）の大腸内での動態について2光子顕微鏡を用いたライブイメージングにて可視化した。小腸より移動速度は遅く、さらに3次元解析の結果、大腸ではクリプト底部におおく存在することを見出した。次に腸管上皮との関連性に着目した。消化管においてTregは遺伝子発現パターンによって、胸腺由来Foxp3+Helios+Gata3+ Tregおよび、消化管局所で誘導されるFoxp3+Helios-Rorgt+ Treg、Foxp3+Helios-Rorgt- (DN) Tregの3種類に分類できる。Aryl hydrocarbon receptor ligand(AHR-L)を投与すると、腸管内部におけるFoxp3+Helios+Gata3+ Tregが増加した。さらに遺伝子解析により誘導されたTregは移動に関連する因子を上昇させていることを見出した。興味深いことに2光子顕微鏡を用いたライブイメージングではAHR—L投与マウスにおいて移動速度が上昇していた。腸管内におけるTreg局在も腸管の上皮細胞の近傍にクリプト周辺から移動していることを確認した。以上よりAhr-ligandを投与すると腸管内におけるTregの挙動、局在が変化することを見出した。 上皮細胞Ahrシグナルを欠損したマウス（Ahr(ΔIEC)）ではHelios+TregはAHR-Lを投与してもcrypt底部に存在し局在変化、動態変化は起こらない。そこで腸管内のTregの局在、動態を決定づける因子として腸管上皮細胞が候補としてあげられた。Ahr—L投与マウスにおける上皮細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、MHC class2因子を始め数個の因子を抽出した。興味深いことに上皮細胞ではCD80/86といった強刺激分子の上昇は認められなかった。Tregの維持にはTCRシグナルの継続的な活性化が重要であるとされており、腸内細菌をdepletionしたマウスにおいてはAHR-Lを投与しても上皮のMHC class2増強も起きず、Tregの局在変化も起こらないことを確認した。以上よりAHR—Lの上皮作用においては腸内細菌の存在が重要であり、さらにTregの局在、動態の制御に寄与していることを見出した。 The dynamics of regulatory T cells (Treg) in the colon was visualized by live imaging using a two-photon microscope. The speed of Tregs was slower in colon than in the small intestine, and 3D analysis revealed that Tregs were located mostly at the crypt bottom in the large intestine. Next, we focused on the relationship with the intestinal epithelium. In the gastrointestinal tract, Tregs can be classified into three types according to gene expression patterns: thymus-derived Foxp3+Helios+Gata3+ Tregs, Foxp3+Helios-Rorgt+ Tregs and Foxp3+Helios-Rorgt- (DN) Tregs induced locally in the gastrointestinal tract. Treatment with Aryl hydrocarbon receptor ligand (AHR-L) increased Foxp3+Helios+Gata3+ Tregs in the intestinal tract. Furthermore, genetic analysis revealed that the induced Tregs elevated factors associated with cell movement. Interestingly, live imaging using two-photon microscopy showed an increased speed in AHR-L-treated mice. Treg localization in the intestinal tract was also confirmed from the crypt periphery to the luminal side. These results indicate that treatment with AHR-L alters the behavior and localization of Tregs in the intestinal tract. In mice lacking Ahr signaling in epithelial cells (Ahr(ΔIEC)), Helios+Tregs are located at the crypt base and do not change their localization or dynamics even when AHR-L is administered. We comprehensively analyzed gene expression in the epithelial cells of Ahr-L-treated mice and extracted several factors including MHC-II factors. Cancelation of the microbe do not increase Tregs under the AHR-L, with the lack of MHC-II expression of the epithelial cells. These results indicate that the presence of intestinal bacteria is important for the epithelial effects of AHR-L, and also contributes to the regulation of Treg localization and dynamics.
Notes	申請種類：福澤基金研究補助
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-20210002-0051

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or

publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2021年度　福澤基金研究補助研究成果実績報告書

2022年3月26日

研究代表者	所属	医学部クラスター部門	職名	専任講師（有期・医学部）	補助額	1,500　千円
	氏名	筋野 智久	氏名（英語）	Tomohisa Sujino		

研究課題（日本語）

生体イメージングを利用した腸管内免疫細胞4次元動態解析と腸管内微小環境の統合的理解

研究課題（英訳）

Four-dimensional dynamic analysis of intestinal cells and integrated understanding of intestinal microenvironment using in vivo imaging

研究組織

氏　名 Name	所属・学科・職名 Affiliation, department, and position
筋野智久（Tomohisa Sujino）	医学部、消化器内科、専任講師
原田洋輔（Yosuke Harada）	医学部、消化器内科、特任助教
吉松祐介（Yusuke Yoshimatsu）	医学部、消化器内科、大学院生
種本俊（Shun Tanemoto）	医学部、消化器内科、大学院生

１．研究成果実績の概要

制御性T細胞（Treg）の大腸内での動態について2光子顕微鏡を用いたライブイメージングにて可視化した。小腸より移動速度は遅く、さらに3次元解析の結果、大腸ではクリプト底部におおく存在することを見出した。次に腸管上皮との関連性に着目した。消化管において Treg は遺伝子発現パターンによって、胸腺由来 Foxp3+Helios+Gata3+ Treg および、消化管局所で誘導される Foxp3+Helios−Rorgt+ Treg、Foxp3+Helios−Rorgt−（DN）Treg の3種類に分類できる。Aryl hydrocarbon receptor ligand(AHR-L)を投与すると、腸管内部における Foxp3+Helios+Gata3+ Treg が増加した。さらに遺伝子解析により誘導された Treg は移動に関連する因子を上昇させていることを見出した。興味深いことに2光子顕微鏡を用いたライブイメージングでは AHR−L 投与マウスにおいて移動速度が上昇していた。腸管内における Treg 局在も腸管の上皮細胞の近傍にクリプト周辺から移動していることを確認した。以上より Ahr−ligand を投与すると腸管内における Treg の挙動、局在が変化することを見出した。

上皮細胞 Ahr シグナルを欠損したマウス（Ahr(ΔIEC)）では Helios+Treg は AHR-L を投与しても crypt 底部に存在し局在変化、動態変化は起こらない。そこで腸管内の Treg の局在、動態を決定づける因子として腸管上皮細胞が候補としてあげられた。Ahr−L 投与マウスにおける上皮細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、MHC class2 因子を始め数個の因子を抽出した。興味深いことに上皮細胞では CD80/86 といった強刺激分子の上昇は認められなかった。Treg の維持には TCR シグナルの継続的な活性化が重要であるとされており、腸内細菌を depletion したマウスにおいては AHR-L を投与しても上皮の MHC class2 増強も起きず、Treg の局在変化も起こらないことを確認した。 以上より AHR−L の上皮作用においては腸内細菌の存在が重要であり、さらに Treg の局在、動態の制御に寄与していることを見出した。

２．研究成果実績の概要（英訳）

The dynamics of regulatory T cells (Treg) in the colon was visualized by live imaging using a two-photon microscope. The speed of Tregs was slower in colon than in the small intestine, and 3D analysis revealed that Tregs were located mostly at the crypt bottom in the large intestine. Next, we focused on the relationship with the intestinal epithelium. In the gastrointestinal tract, Tregs can be classified into three types according to gene expression patterns: thymus-derived Foxp3+Helios+Gata3+ Tregs, Foxp3+Helios−Rorgt+ Tregs and Foxp3+Helios−Rorgt− (DN) Tregs induced locally in the gastrointestinal tract. Treatment with Aryl hydrocarbon receptor ligand (AHR-L) increased Foxp3+Helios+Gata3+ Tregs in the intestinal tract. Furthermore, genetic analysis revealed that the induced Tregs elevated factors associated with cell movement. Interestingly, live imaging using two-photon microscopy showed an increased speed in AHR-L-treated mice. Treg localization in the intestinal tract was also confirmed from the crypt periphery to the luminal side. These results indicate that treatment with AHR-L alters the behavior and localization of Tregs in the intestinal tract.

In mice lacking Ahr signaling in epithelial cells (Ahr(ΔIEC)), Helios+Tregs are located at the crypt base and do not change their localization or dynamics even when AHR-L is administered. We comprehensively analyzed gene expression in the epithelial cells of Ahr-L-treated mice and extracted several factors including MHC-II factors. Cancelation of the microbe do not increase Tregs under the AHR-L, with the lack of MHC-II expression of the epithelial cells. These results indicate that the presence of intestinal bacteria is important for the epithelial effects of AHR-L, and also contributes to the regulation of Treg localization and dynamics.

３．本研究課題に関する発表

発表者氏名（著者・講演者）	発表課題名（著書名・演題）	発表学術誌名（著書発行所・講演学会）	学術誌発行年月（著書発行年月・講演年月）
Yoshimatsu Y, Sujino T et al.	Aryl hydrocarbon receptor signals in epithelial cells govern the recruitment and location of Helios+ Tregs in the gut	Cell Reports	2022 accepted