

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07443

研究課題名(和文)大腸免疫系炎症制御の分子機構解明と腸内共生菌・食品機能分子による修飾

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular immunoregulation of the colonic inflammation, and the application of intestinal commensal bacteria and food functional molecules for host immunoregulation

研究代表者

細野 朗 (Hosono, Akira)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：70328706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸は小腸とは異なる腸内環境をもち、腸管免疫系を形成している。しかし、腸内細菌をはじめとする生体外異物との共生系を維持するために、どのような分子機構で免疫系の制御や宿主の恒常性維持が調節されているのかは不明であり、特に膨大な腸内共生菌を有する大腸免疫系の免疫制御機能について解析した。

本研究では腸内共生菌の存在によって誘導される腸管関連リンパ組織の炎症制御に関するT細胞フェノタイプに注目し、通常マウスと無菌マウスを比較した結果、小腸では制御性T細胞が腸内細菌の有無によっても差がみられないのに対し、大腸では無菌状態では分化誘導されにくく、腸内共生菌が免疫制御に寄与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The large intestine has an intestinal environment different from that of the small intestine and shows the development of their immune system. However, in order to maintain a symbiotic system with foreign bodies such as intestinal bacteria, it is unknown what type of molecular mechanism regulates the immune system and maintenance of host homeostasis. We analyzed the immunoregulatory function of the colon immune system with huge numbers of the commensal bacteria. In this study, we focused on T cell phenotype related to inflammation control of gut-associated lymphoid tissue induced by the presence of intestinal symbiotic bacteria, and as a result of comparison between conventional (CV) and germ-free (GF) mice. In the large intestine, regulatory T cells were induced in CV mice compared with GF mice. It was suggested that commensal bacteria could contribute to immune regulation in the large intestine.

研究分野：食品機能学

キーワード：腸内共生菌 大腸 小腸 リンパ組織 T細胞 炎症制御

1. 研究開始当初の背景

腸管免疫系は生体にとって最大の免疫器官であり、腸内環境において食品成分や腸内共生菌によって様々な免疫感作を受けると考えられるが、その詳細は不明であった。なお、これまでの腸管免疫に関する研究は主に小腸を中心とする免疫組織の細胞応答が主流であり、大腸部位の免疫系についてはほとんど報告されていなかった。特に、腸管免疫系の形成や発達、または炎症反応の制御に対してどのような腸内共生菌あるいは細菌由来分子が強く関与しているのかはほとんど解明されていなかった。さらに、小腸と大腸の免疫系細胞の特徴とその相互作用についても未解明なままである。なお、近年は腸管における制御性の免疫応答が腸内細菌やその代謝産物である有機酸によって誘導されることや、食品成分のビタミン A 代謝産物のレチノイン酸が制御性 T 細胞を誘導する樹状細胞の活性化に寄与している機構が明らかにされた。しかし、大腸部位のなかでも結腸に存在するリンパ組織である結腸リンパ節については、その細胞特性の解明は我々の研究グループ以外、あまり研究が進展していない状況であった。

2. 研究の目的

膨大な数と種類の腸内共生菌を有する大腸では、本来は生体外異物である腸内共生菌の存在によっても腸管粘膜炎症が制御されて腸内の恒常性が保たれているが、そのメカニズムは不明な点が多い。近年、生活習慣病などの疾患の多くが生体内での炎症反応と深く関わっていることから、大腸免疫系における炎症制御機構は宿主の健康維持増進にとっても非常に興味深い。特に、消化吸収において中心的な役割をもつ小腸と膨大な数の腸内共生菌を有する大腸とでは免疫系における生理的な役割が異なると考えられるが、詳細なメカニズムは不明である。本研究は、大腸部位に注目した大腸免疫系細胞応答の特性、またはアレルギー・炎症反応を制御する免疫制御機構に果たす腸内共生菌の作用を解明し、特定の腸内共生菌が誘導する免疫応答を分子レベルで解明することにより、プロバイオティクス、プレバイオティクスなどの機能性食品分子による免疫調節作用を介した応用性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 小腸および大腸部位の腸管関連リンパ組織の T 細胞分化が腸内細菌の影響を受けかどうかの検討。

腸管部位の異なるリンパ組織中の T 細胞フェノタイプに注目した解析について、通常の腸内細菌を有する (CV) マウスと無菌 (GF) マウスを用いた比較を行った。

(2) 腸内細菌叢を制御する食品機能分子が炎症制御応答に及ぼす影響の検討。

難消化性糖類を摂取させたときの腸内細菌叢および腸内有機酸濃度に与える影響の解析と、食物アレルギーモデルマウスにおける腸管関連リンパ組織の細胞応答に与える難消化性糖類摂取による影響について解析した。

(3) 高脂肪食餌条件が食物アレルギーによる炎症に対して及ぼす影響の検討。

食物アレルギーモデルマウスに対して高脂肪食餌条件下で飼育した際の、抗原特異的 T 細胞応答および腸管炎症に与える影響について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 腸管関連リンパ組織内の分化した $CD4^+$ T 細胞を解析したところ、小腸パイエル板 (PP) では B 細胞の抗体産生能を調節する働きを持つ濾胞性ヘルパー T 細胞 ($PD-1^+/CXCR5^+$) の割合が CV マウスの方が GF マウスと比べて高い値を示した。一方、液性免疫に関係する Th2 細胞 ($IL-4^+CD4^+$ 細胞) と免疫応答を抑制的に調節する誘導性制御性 T 細胞

($Neropilin-1^+Foxp3^+CD4^+$ 細胞) の割合は、CV マウスと GF マウスとの間に有意差は認められなかった。この結果から、PP では腸内細菌依存的に増加する細胞と、腸内細菌以外の要因によっても分化や増殖が調節されている細胞が存在する可能性が示唆された。また、結腸リンパ節 (CoP) では濾胞性ヘルパー T 細胞、誘導性制御性 T 細胞の割合は、CV マウスの方が GF マウスと比べて高い値を示し、腸内細菌依存的な影響がみられた。以上の結果から、小腸の PP と結腸の CoP では T 細胞の分化や増殖を決定づける要因が異なる可能性が示唆された。

(2) 卵白オボアルブミンに対する食物アレルギーモデルマウスに難消化性糖類であるフラクトオリゴ糖 (FOS) を摂取させると、卵白食摂取により誘導される体重減少および血中 $mMCP1$ 濃度 (腸管のマスト細胞の活性化の指標となる $mouse Mast Cell Protease-1$) の上昇が、FOS 摂取により緩和する傾向が認められた。一方、細胞内サイトカイン発現の解析において、腸間膜リンパ節 (MLN) 中の Th2 型サイトカインである IL-4、IL-13 を発現する $CD4^+$ T 細胞、Th1 型と Th2 型の両方のサイトカインを発現する $CD4^+$ T 細胞の割

合の卵白食摂取による増加が FOS 摂取により有意に低下した。さらに、MLN における CD45RB^{high}CD69⁺CD4⁺ T 細胞の卵白食摂取による増加が、FOS 摂取により有意に低下していた。この卵白食摂取マウスの MLN 中の CD45RB^{high}CD69⁺CD4⁺ T 細胞は Th1 型と Th2 型の両方のサイトカインを産生した。以上より、FOS 摂取による腸内環境の変化は、食物アレルギーの誘導時において腸管免疫系の Th1 型と Th2 型の両方のサイトカインを産生する活性化 CD4⁺ T 細胞の誘導を抑制する特徴を持つことが示唆された。

(3) 卵白食によって誘導したアレルギーモデルマウスにおいて、高脂肪食給餌群の方が標準食群に比べて血清中の総 IgE、および mMCP1 産生が抑えられている傾向が見られた。また、この時、標準食・高脂肪食群の間で活性型 CD4⁺ T 細胞 (CD44^{high}CD62^{low}CD4⁺ T 細胞, CD69^{high}CD45RB^{low}CD4⁺ T 細胞) の割合には差が認められなかった。脾臓細胞の活性型 CD4⁺ T 細胞, Th2 型サイトカインには差が認められなかった。以上から、高脂肪食条件下で飼育した後、卵白食を摂餌して食品アレルギーを誘導すると、T 細胞を介した炎症応答の誘導を鈍化させる可能性があり、このときに腸内代謝産物の短鎖脂肪酸によって抗原特異的 T 細胞応答が制御されている可能性が考えられる。

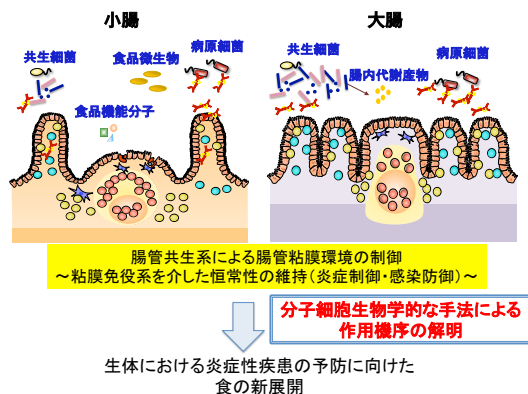


図 1. 小腸および大腸免疫系の免疫系制御機構の特徴

以上、大腸免疫系は腸内共生菌によって免疫感作を強く受けるのに対し、小腸免疫系は腸内共生菌のみならず食餌性の食品成分によっても免疫系細胞の分化誘導がみられる特徴があることが明らかになった (図 1)。一方、大腸免疫系は小腸に比べてナイーブな T 細胞の割合が高く、今後は大腸の免疫感作がどのような機構で制御されているのかにつ

いてもさらなる解明を進めてまいりたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Hachimura S, Totsuka M, Hosono A. 2018. Immunomodulation by food: impact on gut immunity and immune cell function. *Biosci Biotechnol Biochem*, 82: 584-599. 査読有り DOI: 10.1080/09168451.2018.1433017.
- ② Nakajima-Adachi H, Shibahara K, Fujimura Y, Takeyama J, Hiraide E, Kikuchi A, Murakami H, Hosono A, Nochi T, Wakatsuki Y, Shimojo N, Kaminogawa S, Sato R, Kiyono H, Hachimura S. 2017. Critical role of intestinal interleukin-4 modulating regulatory T cells for desensitization, tolerance, and inflammation of food allergy. *PLoS One*, e0172795. 査読有り DOI: 10.1371/journal.pone.0172795.
- ③ Nakata K, Sugi Y, Narabayashi H, Kobayakawa T, Nakanishi Y, Tsuda M, Hosono A, Kaminogawa S, Hanazawa S, Takahashi K. 2017. Commensal microbiota-induced microRNA modulates intestinal epithelial permeability through a small GTPase ARF4. *J Biol Chem*, 292: 15426-15433. 査読有り DOI: 10.1074/jbc.M117.788596.
- ④ Sugi Y, Takahashi K, Kurihara K, Nakano K, Kobayakawa T, Nakata K, Tsuda M, Hanazawa S, Hosono A, Kaminogawa S. 2017. α -Defensin 5 gene expression is regulated by gut microbial metabolites. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81: 242-248. 査読有り DOI: 10.1080/09168451.2016.1246175.
- ⑤ Tsuda M, Arakawa H, Ishii N, Ubukata C, Michimori M, Noda M, Takahashi K, Kaminogawa K, Hosono A. 2017. Dietary fructooligosaccharides attenuate early activation of CD4⁺ T cells which produce both Th1 and Th2 cytokines in the intestinal lymphoid tissues of a murine food allergy model. *Int Arch Allergy Immunol*, 174: 121-132. 査読有り. DOI: 10.1159/000481984.
- ⑥ Sugi Y, Takahashi K, Kurihara K, Nakata K, Narabayashi H, Hamamoto Y, Suzuki M, Tsuda M, Hanazawa S, Hosono A, Kaminogawa S. 2016. Post-transcriptional regulation of Toll-interacting protein in the intestinal epithelium. *PLoS One*. 11: e0164858. 査読有り DOI:

10.1371/journal.pone.0164858.

- ⑦ Onodera T, Hosono A, Odagiri T, Tashiro M, Kaminogawa S, Okuno Y., Kurosaki T, Ato M, Kobayashi K, Takahashi Y. 2016. Whole-virion influenza vaccine recalls an early burst of high-affinity memory B cell response through Toll-like receptor signaling. *J Immunol*, 196: 4172-4184.
- ⑧ Miyazato S, Kishimoto Y, Takahashi K, Kaminogawa S, Hosono A. 2016. Continuous intake of resistant maltodextrin enhanced intestinal immune response through the changes in the intestinal environment in mice. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 35: 1-7. 査読あり DOI: 10.12938/bmfh.2015-009.

[学会発表] (計 32 件)

- ① 本田真澄, 津田真人, 高橋恭子, 足立(中嶋)はるよ, 八村敏志, 細野朗. 高脂肪食餌条件が T 細胞を介した食品アレルギー反応へ与える影響. 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018.
- ② 高橋輝, 津田真人, 細野朗. 食品アレルギー誘導時に観察される肺組織における活性化 CD4⁺ T 細胞と顆粒球の増加. 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018.
- ③ 中田一彰, 村松芳樹, 杉由高, 榎林ひかり, 中西祐輔, 津田真人, 細野朗, 上野川修一, 花澤重正, 高橋恭子. 腸管上皮透過性を亢進させる低分子量 GTP アーゼ ARF4 の発現分布と役割. 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018.
- ④ 小島菜月, 津田真人, 石濱史也, 細野朗. 盲腸リンパ節の T 細胞の分化の誘導と維持には恒常的な腸内細菌叢が必要である. 第 51 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会. 2018.
- ⑤ Nakata K, Tsuda M, Hosono A, Nakanishi Y, Takahashi K. miR-21-5p regulates intestinal epithelial permeability through ADP-ribosylation factor 4 (ARF4). 第 46 回日本免疫学会学術集会. 2017.
- ⑥ 津田真人, 高橋恭子, 上野川修一, 細野朗. フラクトオリゴ糖による食物アレルギー誘導抑制作用と腸管免疫系の CD4⁺ T 細胞応答に与える影響. 日本食品免疫学会第 13 回学術大会 (JAFI 2017). 2017.
- ⑦ 石濱史也, 津田真人, 八村敏志, 高橋宜聖, 高橋恭子, 上野川修一, 細野朗. 盲腸リンパ節の T 細胞フェノタイプおよび胚中心 B 細胞の発現は結腸リンパ節とは異なる特徴をもつ. 日本食品免疫学会第 13 回学

術大会 (JAFI 2017). 2017.

- ⑧ 寺内篤史, 安達悠, 津田真人, 細野朗, 八村敏志, 高橋宜聖. インフルエンザに対する B 細胞応答の腸内細菌による制御. 日本食品免疫学会第 13 回学術大会 (JAFI 2017). 2017.
- ⑨ 中田一彰, 杉由高, 榎林ひかり, 津田真人, 細野朗, 上野川修一, 高橋恭子. 腸管上皮における低分子量 GTP アーゼ ARF4 の発現と機能. 日本食品免疫学会第 13 回学術大会 (JAFI 2017). 2017.
- ⑩ Ishihara F, Tsuda M, Hosono A. T cell differentiation of gut-associated lymphoid tissue, which modified by commensal bacteria, is different between in the small intestine and in the large intestine. The joint Congress of the 19th International Symposium on Gnotobiology, the 50th Congress of Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology and the 39th Congress of SOMED, 2017.
- ⑪ Tsuda M, Hosono A. The development of acquired immune cells from gut-associated lymphoid tissues in the large intestine by intestinal microbiota. The joint Congress of the 19th International Symposium on Gnotobiology, the 50th Congress of Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology and the 39th Congress of SOMED, 2017.
- ⑫ 中田一彰, 高橋恭子, 杉由高, 小早川哲朗, 榎林ひかり, 松尾大介, 牛島直哉, 津田真人, 細野朗, 上野川修一, 花澤重正. 低分子量 GTP アーゼを介した腸管上皮透過性の調節機構. 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017.
- ⑬ 石井涼太, 石井俊祐, 津田真人, 高橋恭子, 八村敏志, 細野朗, 上野川修一. 小腸パイエル板細胞による IgA 産生応答における腸内細菌及びレチノイン酸による修飾作用. 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017.
- ⑭ 畑井俊哉, 上滝隆太郎, 津田真人, 高橋恭子, 細野朗, 八村敏志. 大腸リンパ節特徴的に存在する自然リンパ球の解析. 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017.
- ⑮ 高橋輝, 津田真人, 細野朗. 食品アレルギー条件下における肺組織の免疫応答解析. 日本農芸化学会 2017 年度大会.
- ⑯ 石濱史也, 津田真人, 小熊俊生, 村木悠平, 於鉄崢, 八村敏志, 高橋宜聖, 高橋恭子, 上野川修一, 細野朗. 結腸リンパ節における T 細胞分化の特徴. 日本農芸

- 化学会 2017 年度大会, 2017.
- ⑰ Nakata K, Tsuda M, Hosono A, Takahashi K. Intestinal microbiota-dependent miRNA affects epithelial permeability. 第 45 回日本免疫学会学術集会, 2016.
- ⑱ 石濱史也, 津田真人, 八村敏志, 高橋宜聖, 高橋恭子, 上野川修一, 細野朗. 大腸リンパ組織における制御性 T 細胞の特性と腸内細菌による影響. 日本食品免疫学会第 12 回学術大会 (JAFI 2016), 2016.
- ⑲ 津田真人, 高橋恭子, 上野川修一, 細野朗. フラクトオリゴ糖の摂取は食品アレルギーにおける腸管免疫系の T 細胞応答を抑制する. 日本食品免疫学会第 12 回学術大会 (JAFI 2016), 2016.
- ⑳ 畑井俊哉, 上滝隆太郎, 於鉄崢, 津田真人, 高橋恭子, 細野朗, 八村敏志. 腸管関連リンパ組織 (GALT) における自然リンパ球 (ILC) 応答性の組織特異性解析: 大腸・小腸免疫系の比較. 日本食品免疫学会第 12 回学術大会 (JAFI 2016), 2016.
- ㉑ 高橋輝, 津田真人, 細野朗. 食品アレルギー条件下における気管支関連リンパ組織の T 細胞応答の特徴. 日本食品免疫学会第 12 回学術大会 (JAFI 2016), 2016.
- ㉒ 中田一彰, 高橋恭子, 津田真人, 細野朗, 上野川修一. 腸管上皮細胞における miR-21-5p の機能解析. 日本食品免疫学会第 12 回学術大会 (JAFI 2016), 2016.
- ㉓ 畑井俊哉, 上滝隆太郎, 於鉄崢, 高橋恭子, 八村敏志, 細野朗. 腸管免疫系細胞におけるインターロイキン-5 産生に与える腸内共生菌の影響. 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016.
- ㉔ 村木悠平, 小熊俊生, 津田真人, 於鉄崢, 杏掛優香, 八村敏志, 高橋宜聖, 高橋恭子, 上野川修一, 細野朗. 大腸リンパ組織における制御性 T 細胞フェノタイプ特性の解析. 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016.
- ㉕ 上滝隆太郎, 糸賀翔大, 石井俊祐, 輪島隼一, 芝原恭子, 高橋恭子, 上野川修一, 細野朗, 八村敏志. パイエル板樹状細胞は T 細胞の IL-21 遺伝子発現を誘導する. 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016.
- ㉖ 中田一彰, 高橋恭子, 杉由高, 小早川哲朗, 檜林ひかり, 花澤重正, 津田真人, 細野朗, 上野川修一. 腸内細菌により誘導される miR-21-5p は腸管上皮機能を調節する. 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016.
- ㉗ 細野朗, 津田真人. 無菌マウスと通常マウスの大腸および小腸の腸管関連リンパ組織の形態と T 細胞フェノタイプの比較. 第 49 回無菌生物ノートバイオロジー学会総会, 2016.
- ㉘ TAKAHASHI Kyoko, HOSONO Akira. Regulation of α -defensin 5 gene expression in intestinal epithelial cells. 第 44 回日本免疫学会学術集会, 2015.
- ㉙ 中田一彰, 高橋恭子, 杉由高, 細野朗, 津田真人, 上野川修一. 腸内細菌により腸管上皮細胞において誘導される miRNA の同定. 日本食品免疫学会第 11 回学術大会 (JAFI 2015), 2015.
- ㉚ 杏掛優香, 中田一彰, 津田真人, 高橋恭子, 上野川修一, 細野朗. 腸内細菌とその代謝産物が腸管関連リンパ組織の IgA 産生応答を修飾する. 日本食品免疫学会第 11 回学術大会 (JAFI 2015), 2015.
- ㉛ 上滝隆太郎, 畑井俊哉, 高橋宜聖, 橋口昌章, 辻典子, 山田潔, 戸塚護, 上野川修一, 細野朗, 八村敏志. 腸管関連リンパ組織における自然リンパ球の解析. 日本食品免疫学会第 11 回学術大会 (JAFI 2015), 2015.
- ㉜ 上滝隆太郎, 於鉄崢, 糸賀翔大, 畑井俊哉, 石井俊祐, 輪島隼一, 芝原恭子, 高橋恭子, 上野川修一, 細野朗, 八村敏志. 腸管関連リンパ組織における濾胞ヘルパー T 細胞についての解析. 第 19 回腸内細菌学会, 2015.
- [図書] (計 2 件)
- ① 細野朗 他, アイ・ケイ コーポレーション, 食品の保健機能と生理学, 2015, 208.
- ② 津田真人, 細野朗 他, シーエムシー出版, 落合邦康監修: 腸内細菌・口腔細菌と全身疾患, 2015, 259.
- [産業財産権] (該当なし)
- [その他] (該当なし)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
細野 朗 (HOSONO, Akira)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 70328706
- (2) 研究分担者
高橋 恭子 (TAKAHASHI, Kyoko)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号: 70366574