

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20214

研究課題名(和文) 腸内マイクロバイオーームによるTfh細胞サブセット制御機構と免疫アレルギー病態

研究課題名(英文) Involvement of gut microbiota in numerical regulation of T follicular helper cells associating immune disorders

研究代表者

川田 耕司 (Kawata, Koji)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20374572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗体産生を制御するT細胞サブセットである濾胞ヘルパーT細胞(Tfh細胞)について、その数的変動と腸内細菌叢の関連について検証した。抗生物質投与により腸内細菌叢を減少させたマウスにおいては、Tfh分化を調節するIL-2の上昇が認められた。またガラクトース誘導亜急性老化モデルマウスでは、加齢に伴うTfh細胞の有意な増加が認められたが、抗生物質投与群では、Tfhの増加が顕著に抑制される結果となった。マウスでは免疫老化の一つの特徴として、Tfh様細胞が増加することが報告されており、腸内細菌叢が老化に伴い増加するTfh様細胞の分化および数的調節に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined a relationship between numerical frequency of T follicular helper (Tfh) cells, which have an important role in specific humoral immunity, and structural change in intestinal microbiota. In the mice orally treated with antibiotics, the serum levels of IL-2, the cytokine inhibiting Tfh differentiation, were notably increased. It has been reported that a T cell population expressing Tfh-like phenotype were increased with age in normal mice. In our study, a significant increase of Tfh cells was observed in D-galactose-induced aging model mice, while antibiotics treatment effectively inhibited the increment of Tfh cells. These results suggested that intestinal microbiota might be involved in differentiation and numerical regulation of Tfh-like cells, which might contribute to immunosenescence, through a regulation of IL-2 production.

研究分野：免疫学

キーワード：濾胞ヘルパーT細胞 腸内細菌叢

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、腸内細菌叢の構成異常が、炎症性腸疾患、肥満、糖尿病、アレルギー疾患など、ヒトの様々な疾患における発症リスクと密接に関連している可能性が明らかになってきている。特にアレルギー罹患者と健常者で、腸内細菌叢の構成菌種に違いが見られること、乳酸菌をはじめとするプロバイオティクスがアレルギー症状の改善作用を有することが疫学的研究によって示されている。また無菌動物を用いた研究から、腸内細菌の存在しないマウスでは、腸管周囲の免疫組織が未発達であり、腸管免疫に特徴的な IgA 産生が低いことが知られており、またこれらの特徴が特定の細菌種の定着により改善することから、腸内細菌が免疫系組織の形成や発達、細胞応答を修飾していることが明らかになりつつある。これらの結果は、腸内細菌によって維持される免疫恒常性の破綻が、免疫病態形成の一因となる可能性を示唆しているが、その具体的なメカニズムは未だ解明されていない。

(2) 濾胞ヘルパーT (T<sub>FH</sub>) 細胞は抗原特異的抗体の産生に重要な働きを示すT細胞サブセットであるが、さらに他のヘルパーT細胞への分化の遷移細胞として免疫システム全体を制御していると考えられており、本細胞の量的、質的変動はアレルギーや自己免疫疾患の病態形成における主要なメカニズムの一つと考えられる。事実、我々のこれまでの解析から、アレルギー性鼻炎罹患者と健常者で末梢血中の T<sub>FH</sub> サブセットの構成比に明らかな差が認められることが示されている (図1B)。多発性硬化症および関節リウマチ等の自己免疫性疾患モデルマウスでは、無菌飼育や抗生物質投与によって症状が軽快することが知られており、病態形成に重要な役割を果たすT細胞サブセットであるTh17および濾胞ヘルパーT細胞 (T<sub>FH</sub> 細胞) が、腸内に存在するセグメント細菌 (Segmented filamentous bacteria : SFB) によって強く誘導されることが報告されている。また、この T<sub>FH</sub> 細胞と一致する表現型 (BCL6+ CXCR5+ PD-1+) を示すT細胞は、正常マウスにおいても加齢に伴い増加することが報告されており、免疫老化の主要メカニズムである可能性が示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、T<sub>FH</sub> 細胞の分化、成熟に対する腸内細菌の機能的意義を明らかにすることを目的とする。腸内細菌の存在が T<sub>FH</sub> 細胞の特に数的調節に対しどのような影響を与えているのか、またそのメカニズムについて基礎的な研究を実施した。

## 3. 研究の方法

(1) バンコマイシンおよびポリミキシン B

を C57BL/6 マウスに 4 週間自由飲水で投与し、腸内細菌叢を変化、減少させたマウスからリンパ球を分離し、T<sub>FH</sub> 細胞の表面マーカー (CCD3+, CD4+, PD-1+, CXCR5+) を指標とした解析を実施した。評価対象とするマウスリンパ組織は、脾臓およびパイエル板とし、これらの組織から分離したリンパ球について、T<sub>FH</sub> 細胞を中心にフローサイトメトリーを用いた解析を実施した。また、抗体アレイを用いたサイトカイン解析により、上記抗生物質処理により変動する血中サイトカインについて検討した。

(2) T<sub>FH</sub> 細胞と一致する表現型を示す T 細胞は、正常マウスにおいても加齢に伴い増加することが報告されていることから、D-ガラクトースを 100 mg/kg/day 3 ヶ月間投与することによって誘導した亜急性老化モデルについても上記と同様の解析を行い、免疫老化と腸内細菌の関連についても検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 抗生物質投与マウスにおける腸内細菌叢

バンコマイシンおよびポリミキシン B を自由飲水により 4 週間投与した 8 週齢のマウスにおいて、糞便中 DNA 量を測定したところ、明らかな減少が認められ、当該処理によって腸内細菌叢が減少していることが確認された (図 1A)。また、Th17 および T<sub>FH</sub> 細胞を強く誘導する事が報告されているセグメント細菌について、糞便由来 DNA をサンプルとした特異的リアルタイム PCR により評価を行ったが、本実験に使用したマウスではセグメント細菌は検出されなかった (図 1B)。

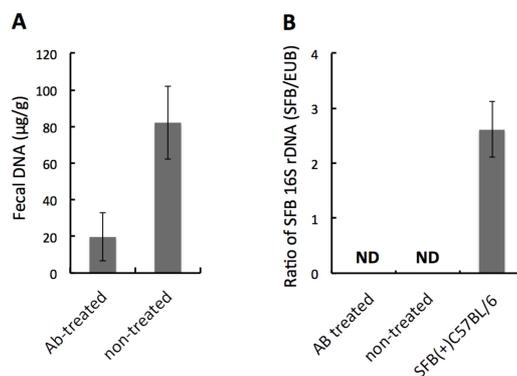


図 1 抗生物質投与マウスにおける糞便中 DNA 量とセグメント細菌

### (2) 抗生物質投与マウスにおける T<sub>FH</sub> 細胞動態

上記 (1) の処理を実施したマウスの各種リンパ組織より分離したリンパ球について、フローサイトメトリーを用いた解析を実施した。その結果、パイエル板における細胞の構成比には変化が認められず、脾臓 T<sub>FH</sub> 細胞 (CD4+, PD-1+, CXCR5+) の割合は抗生物質投与群でわずかに増加する傾向を示したものの、有意な差は認めなかった。(図 2) 。

た、当該マウスに対するヒツジ赤血球 (SRBC) を用いた抗原刺激の結果においても、刺激後 7 日での  $T_{FH}$  細胞の割合には、コントロール、投与群で有意な差は認めなかった。

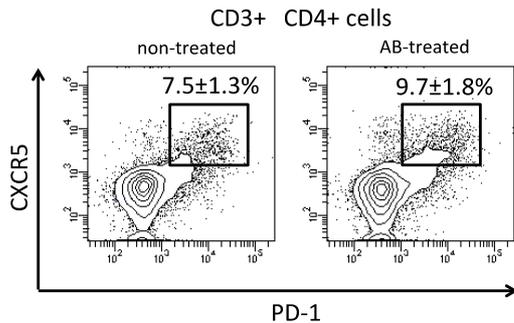


図 2 抗生物質投与マウス脾細胞中の  $T_{FH}$  細胞の割合

### (3) 免疫老化における $T_{FH}$ 様細胞増加と腸内細菌叢

マウスでは加齢により、 $T_{FH}$  細胞と同一の表現型を示す T 細胞が増加することが報告されており、免疫老化の一つの特徴と考えられているため、この  $T_{FH}$  様細胞と腸内細菌叢の関連について、D-ガラクトース投与による亜急性老化モデルを用いて検討することとした。D-ガラクトースを 100 mg/kg/day 3 ヶ月間皮下投与した群において、脾臓における  $T_{FH}$  細胞 (CD4+, PD-1+, CXCR5+) の割合が顕著に増加する結果となり (図 3)、これは 18 ヶ月齢の老齢マウスについて実施した解析結果と一致していた。これらの結果は、D-ガラクトース投与と老化モデルにおいても、実際の老化と類似した免疫学的特徴を再現することが可能であることを示唆している。また、D-ガラクトース投与と並行して、バンコマイシン、ポリミキシン B を飲水投与したモデルでは、 $T_{FH}$  細胞増加が顕著に抑制される結果となった。

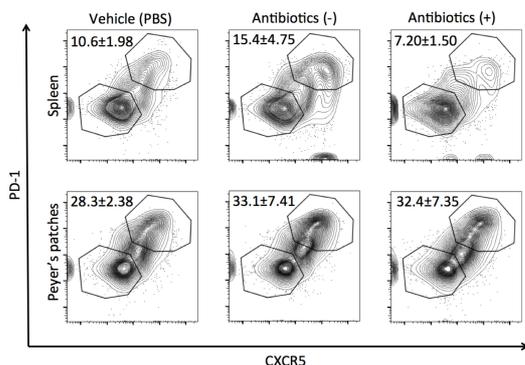


図 3 ガラクトース誘導亜急性老化モデルにおける脾細胞中  $T_{FH}$  細胞の割合

### (4) 抗生物質投与マウスにおけるサイトカイン動態

上記モデルマウス血清の抗体アレイを用いた網羅的解析により、抗生物質処理を行ったマウス血清では、IL-2、IL-17 の有意な上昇および CXCL13 の有意な減少が認められた。これらのうち、IL-2 はリンパ節や脾臓にお

ける  $T_{FH}$  細胞分化を抑制する作用を有することが知られており、IL-2 濃度の上昇は、抗生物質投与と老化モデルにおける  $T_{FH}$  細胞増加の抑制とよく一致している。また、本モデルのパイエル板における IL-2 産生細胞について検討したところ、抗生物質投与群において、IL-2 産生細胞数が有意に高い結果となった。IL-2 は転写因子 BCL6 の抑制を介して  $T_{FH}$  細胞分化を抑制することが報告されているため、腸内細菌が IL-2 産生抑制を介して、免疫老化に伴い増加する  $T_{FH}$  様細胞の分化および数的調節に関与している可能性が示唆された。また近年、マウス腸内に存在するセグメント細菌が  $T_{FH}$  細胞を誘導する事が報告されているが、(1) で示したように、本研究で使用したマウス系統は SFB を保有しておらず、老化に伴う  $T_{FH}$  細胞数の増加を誘導する他の細菌種の存在が示唆された。

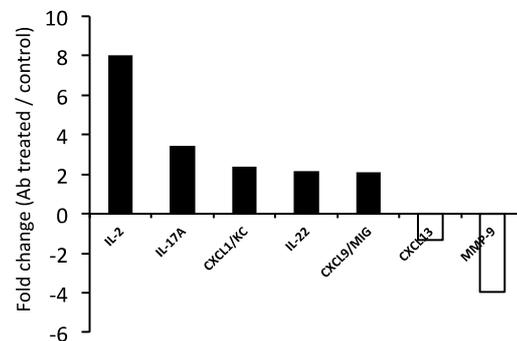


図 4 抗体アレイを用いた抗生物質投与マウスにおける血中サイトカイン解析

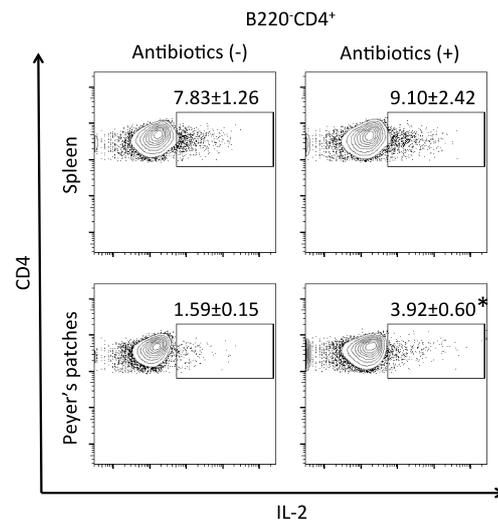


図 5 抗生物質投与マウスパイエル板における、IL-2 産生細胞数

### (5) 総括

抗生物質投与により腸内細菌叢を変化、減少させたマウスにおいて、若齢では  $T_{FH}$  細胞数に顕著な変化を認めなかった一方、老齢マウスにおいては、腸内細菌が IL-2 産生抑制を介して、免疫老化に伴い増加する  $T_{FH}$  様細胞の分化および数的調節に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Matsumiya H, Kawata K, Kamekura R, Tsubomatsu C, Jitsukawa S, Asai T, Akasaka S, Kamei M, Yamashita K, Ito F, Kubo T, Sato N, Takano K, Himi T, Ichimiya S. High frequency of Bob1<sup>lo</sup> T follicular helper cells in florid reactive follicular hyperplasia. *Immunol. Lett.* 2017; 191:23-30

川田 耕司、一宮慎吾 2017 腸内細菌による濾胞ヘルパーT細胞制御の可能性と免疫アレルギー病態 アレルギーの臨床 Vol.37 pp252-255

Nagaya T#, Kawata K, Kamekura R, Jitsukawa S, Kubo T, Kamei M, Ogasawara N, Takano K, Himi T, Ichimiya S. Lipid mediators foster the differentiation of T follicular helper cells. *Immunol. Lett.* 2017; 181: 51-57.

Ichimiya S, Kamekura R, Kawata K, Kamei M, Himi T. Functional RNAs control T follicular helper cells. *J. Hum. Genet.* 2017; 62: 81-86.

Yamashita K#, Kawata K#, Matsumiya H, Kamekura R, Jitsukawa S, Nagaya T, Ogasawara N, Takano K, Kubo T, Kimura S, Shigehara K, Himi T, Ichimiya S. Bob1 limits cellular frequency of T-follicular helper cells. *Eur J Immunol.* 2016; 46: 1361-1370.

[学会発表](計4件)

川田耕司、山下恵司、松宮弘、實川純人、亀倉隆太、長屋朋典、氷見徹夫、一宮慎吾。転写制御因子 Bob1 による濾胞ヘルパーT細胞の細胞数調節- 第106回日本病理学会総会、東京、2017.

Kawata K, Yamashita K, Kamekura R, Jitsukawa S, Nagaya T, Ito F, Shigehara K, Takano K, Himi T, Ichimiya S. Bob1 limits cell numbers of T follicular helper cells. The 45rd annual meeting of the Japanese society for immunology. Okinawa, 2016.

Kawata K, Yamashita K, Mitsuhashi Y, Nagaya T, Jitsukawa S, Kamekura R, Shigehara K, Seki N, Himi T, Ichimiya S. Functional involvement of BOB1 in the numerical regulation of

follicular helper T cells. The 44rd annual meeting of the Japanese society for immunology. Sapporo, 2015.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

川田 耕司(KAWATA, Koji)  
福島県立医科大学・医学部附属実験動物研究施設・助教  
研究者番号: 20374572

(2)研究協力者

山下 恵司(YAMASHITA, Keiji)  
長屋 朋典(NAGAYA, Tomonori)