

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09382

研究課題名(和文) 腸内細菌刺激による制御性B細胞の誘導メカニズムの解明と炎症性腸疾患への治療応用

研究課題名(英文) A study of microbiota activated regulatory B cells in inflammatory bowel diseases.

研究代表者

三島 義之 (Mishima, Yoshiyuki)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：30397864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、炎症性腸疾患(IBD)の病態における腸内細菌を介した制御性B細胞(Breg)誘導の分子メカニズムの解明である。自然免疫レセプターTLR2,4,9欠損マウスの腸管B細胞を検討したところ、TLR2欠損B細胞のみ細菌刺激によるIL-10産生能が低下し、エフェクターT細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制できず、移入しても腸炎モデルマウスの腸炎を抑制しなかった。そこで、このTLR2依存的IL-10産生の抑制メカニズムを解析したところ、PI3Kp110dのシグナル伝達が重要であることを発見した。本研究成果によりBregが腸内細菌を介してIBDの病態に関わる機序の一部を解明できたと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、IBDの病態における腸内細菌を介したBreg誘導機構の一端を解明できたと考える。このシステムを応用し、生体内で効率的にBreg誘導ができるようになれば、安全で有効性のたかい新規のIBD治療法開発につながる可能性がある。難渋している現行のIBD治療とは異なるアプローチであり、実用化されれば臨床的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Regulatory B cells (Breg) are involved in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. We investigated the molecular mechanisms how resident bacteria induce IL-10-producing Breg and ameliorate mucosal inflammation using several Toll-like receptor (TLR) knockout (KO) mice. B cells from TLR2 KO, but not TLR4 KO or TLR9 KO, mice produced low IL-10 in the presence of bacterial stimulation and failed to ameliorate T cell-mediated colitis. Next, we sought to determine the TLR2-dependent IL-10 production by microbiota-activated B cells. Western blotting indicated that a PI3K-AKT-GSK3B pathway is activated in the presence of TLR2 but not TLR4 stimulation. PI3Kp110d KO B cells were neither produce sufficient IL-10 when stimulated with bacteria nor ameliorated mucosal inflammation in vivo. These findings increase our understanding of the pathogenesis of IBD and regulation of mucosal homeostasis by resident microbiota.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：腸内細菌 炎症性腸疾患 制御性免疫細胞 粘膜免疫 Toll like receptor

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患(IBD)は、わが国でも近年増加傾向が著しい。しかし、いまだ原因不明であるため、現在においても抗炎症薬などの対症療法が主であり、治療に難渋するケースも多い。特に、若年者を中心に発症する本疾患は、高価で副作用も多い薬剤が必要であるため、社会的・医療経済的にも見すごせない状態である。そのため詳細な病態解明と、それをもとにした安全で効果的な新規治療法の早期開発がのぞまれている。

B細胞は抗体・サイトカイン産生、抗原提示など多機能を有する免疫細胞である。近年、自己免疫疾患や感染性疾患において、その免疫制御効果が報告されてきた(*Immunity*.2015)。一般に免疫を負に調節するB細胞は制御性B細胞(Breg)と定義され、IL-10産生B細胞はその代表である。この細胞は全身に分布しているが、比較のみじかいIL-10の半減期や作用機転を考慮すると、腸炎においては炎症の主座である腸管に存在するものが重要と考えられた。そこで我々は、これまでにIBDにおける腸管IL-10産生B細胞の解析をおこない報告してきた(*Immunology*.2010、*IBD*.2014、*Cell Mol Gastroenterol Hepatol*.2015)。これらは、体内で誘導され機能する腸管BregがIBDの病態に重要な役割をもち、エフェクターとしてだけでなく、他の制御性免疫細胞を刺激するコントローラーとして、腸管の粘膜免疫に関わっている可能性を示唆している。さらに、腸内細菌からの刺激はBreg誘導における最重要因子ということも分かってきた。

以上より、腸内細菌刺激が腸管Breg誘導に必須であり、Breg機能低下がIBDの病態に関与していることが強く示唆されるが、まだまだその詳細は不明である。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、これまでに明らかにされていない腸内細菌刺激による腸管Breg誘導機構と、IBDにおけるBreg機能異常を解明するのを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

1. B細胞のToll様受容体(TLR)発現と腸炎抑制効果の検討

IBDでBregの抗炎症機能が低い現象を解明するうえで、まずは腸管B細胞における細菌刺激関連レセプターTLRの関与を検討する。これにより、特定の細菌構成成分に由来するレセプター刺激が腸管Bregの腸炎制御にどのように関わるかをあきらかにする。

2. 腸内細菌刺激によるBregの誘導・活性化機構の検討

腸管B細胞が腸内細菌により活性化される際に重要な遺伝子の検索をおこなう。無菌マウスの腸管B細胞をもちい、腸内細菌刺激した際の遺伝子発現の変化をRNA arrayで網羅的に解析する。Breg誘導に特有の遺伝子が発見できれば、その機能解析に進み、幅ひろい遺伝子が増加した場合は、既報のIBDのGWAS結果(Nature 2010, 2012)を参考にターゲット遺伝子をしぼる。

3. ヒト腸内細菌叢によるヒトBregの誘導、炎症抑制効果の検討

A) IBD患者のBreg機能の検討: 健康人とIBD患者の末梢血B細胞をもちい、In vitroの共培養系にてBreg活性化と抗炎症効果を検討する。これによりIBDのB細胞が有する機能異常を確認・検討する。

B) IBD腸内細菌叢による腸管B細胞刺激の検討: 健康人とIBD患者(活動期と緩解期)の便から作成したlysateでそれぞれのB細胞を刺激し、IL-10産生能とその分画を検討する。また共培養系をもちいて、Bregの抗炎症機能を比較する。これによりIBD患者における

Breg 機能低下が、B 細胞自体によるものか、腸内細菌叢の違いからくるものかを検討する
C)Breg を介した IBD 発症に関与する特異的な腸内細菌の同定 :B)に関連し、IBD で Breg 誘導を阻害している要因を、腸内細菌叢の側から 16S RNA 分析をもちいて検討する。

4. 研究成果

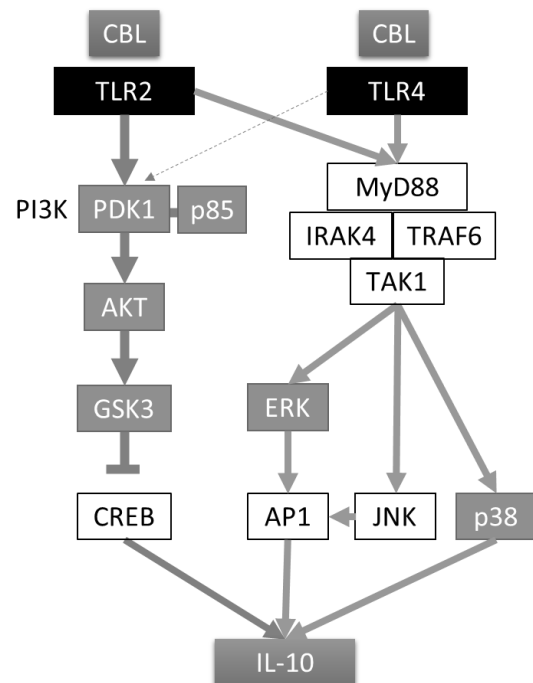
グラム陰性菌の構成成分が B 細胞を効果的に刺激する現象と、既報の IBD 患者の網羅的遺伝子解析 (GWAS) 結果にもとづき、TLR2, 4, 9 欠損マウスから分離した腸管 B 細胞をもちいて下記実験を行った。

In vitro で腸管 B 細胞を分離し、Cecal bacterial lysate (CBL) で刺激したところ、当初 TLR9 欠損マウスの B 細胞は細菌刺激による IL-10 産生は低い傾向にあったが、その後サンプル数を増やして検討したところ、IL-10 産生量は野生型 B 細胞と比較して変わりなく、通常の IL-10 産生能を有していることが分かった。同様に TLR4 欠損マウスも野生型と比較して、同様な IL-10 産生能を有していた。一方、TLR2 欠損 B 細胞は細菌刺激による IL-10 産生能が著明に低下していることが分かった。T 細胞との共培養系を用いて検討すると、野生型・TLR4 欠損・TLR9 欠損の B 細胞ではエフェクター T 細胞からの炎症性サイトカイン産生を抑制したが、TLR2 欠損 B 細胞はできなかつた。

上記を踏まえ、in vivo で検討を行った。ナイーブ T 細胞を Rag2 欠損マウスに入れると腸内細菌依存性に腸炎が自然発症するが、その際に野生型・TLR4 欠損・TLR9 欠損の B 細胞のいずれかを共移入すると腸炎発症は著明に抑えられた。しかし TLR2 欠損 B 細胞は腸炎抑制効果を認めず、B 細胞の腸炎抑制効果は TLR2 の刺激が大切であると考えられた。

これらの知見は、米国ノースカロライナ大学留学中に研究していた結果をサポートするものであったため、同大学で研究していた TLR2 依存的に IL-10 産生が抑えられるかのメカニズムの解析を進めていくこととした。Cecal bacterial lysate で刺激した野生型、TLR2 欠損と TLR4 欠損 B 細胞のシグナルの差異を検討した結果、Western blotting にて STAT3 だけでなく、AKR、PI3K、GSK3b シグナルのリン酸化が TLR2 依存的に生じていたが、ERK 等の MyD88 を介するシグナルは TLR2、TLR4 共に活性化されていた。この結果は、PI3Kp110d のシグナル伝達が TLR2 を介した IL-10 産生に重要であることを意味している。また、PI3K 特異的な阻害薬を使用すると B 細胞の IL-10 産生が著明に抑えられること、PI3Kp110d 遺伝子変異マウスの B 細胞を前述の腸炎モデルに共移入した際に腸炎が抑制できないことでデータの信頼性を高め、それらをまとめた結果は誌上で報告した。

なお、無菌マウスの検討をする前に、ターゲット遺伝子が絞れたため、同検討は行わなかつた。またヒト IBD の検体を用いた検討に関しては、解析に必要なサンプル数が集まらなかつたため、今後の検討課題としたいと考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mishima Yoshiyuki, Oka Akihiko, Liu Bo, Herzog Jeremy W., Eun Chang Soo, Fan Ting-Jia, Bulik-Sullivan Emily, Carroll Ian M., Hansen Jonathan J., Chen Liang, Wilson Justin E., Fisher Nancy C., Ting Jenny P.Y., Nochi Tomonori, Wahl Angela, Garcia J. Victor, Karp Christopher L., Sartor R. Balfour	4. 巻 129
2. 論文標題 Microbiota maintain colonic homeostasis by activating TLR2/MyD88/PI3K signaling in IL-10-producing regulatory B cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 3702 ~ 3716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI93820	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Oka Akihiko, Mishima Yoshiyuki, Liu Bo, Herzog Jeremy W., Steinbach Erin C., Kobayashi Taku, Plevy Scott E., Sartor R. Balfour	4. 巻 8
2. 論文標題 Phosphoinositide 3-Kinase P110 -Signaling Is Critical for Microbiota-Activated IL-10 Production by B Cells that Regulate Intestinal Inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1121 ~ 1121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8101121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----