

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16698

研究課題名(和文)腸内常在菌による細胞障害性T細胞の機能制御の解明

研究課題名(英文) Study for mechanisms underlying microbiota-mediated modulation of cytotoxic T cells

研究代表者

田之上 大 (TANOUE, Takeshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：60732972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、腸内常在菌による免疫修飾なかでもヘルパーT細胞の各サブセットを誘導する腸内細菌種の同定が進み、それぞれの誘導メカニズムが理解されるに至った。一方で、CD8陽性T細胞の細胞障害性機能に対する腸内常在菌の役割については理解が十分進んでいない。そこで本研究では、細胞障害性T細胞に及ぼす腸内常在菌の影響を、そのエフェクター酵素の一つであるGranzymeに着目することで検討した。具体的にはマウス腸管での局在を解析し、その誘導と腸内細菌の関係を無菌マウスやノトバイオームマウスを使用することで検討した結果、特定細菌が一部のGranzyme産生細胞を誘導する事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で特定した細菌株の定着によりGranzyme産生誘導機能を活用して感染症やがん治療に応用出来る可能性が考えられた。また学術的には、これまでにGranzyme産生を誘導する腸内細菌を体系的に精査した報告は無く、本研究はそのさきがけに相当する研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the recent decade, plenty of evidence showed Specific members of gut microbiota can affect gut immune system especially for helper T cells. However it is still unknown for the relationship of gut microbiota and CD8-positive T cells. Here, we addressed the effect of microbiota on cytotoxic T cells by analyzing granzyme-producing CD8 T cells. We analyze the intestinal localization of granzyme-producing cell and effect of microbiota by using germ-free and gnotobiotic mice and showed that specific members of microbiota can induce the granzyme-producing CD8 T cells.

研究分野：免疫学 微生物学

キーワード：腸内細菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年宿主生理機能に対する腸内常在菌の寄与が明るみとなり、そのなかでも「腸内細菌による消化管免疫系モジュレート」はホットトピックの一つである。とりわけ T 細胞を強く誘導する常在細菌種の特定が進み、たとえば、マウス常在性のセグメント細菌は小腸 Th17 細胞を特異的に誘導する。さらには、健康者由来の 17 菌株の Clostridia コンソーシアムは制御性 T 細胞を強く誘導する。炎症性腸疾患患者の口腔内から単離した *Klebsiella pneumoniae* は、消化管に定着すると大腸炎誘発性の Th1 細胞を誘導する。また特定の細菌種ではないが、常在菌由来 TLR リガンドが Myd88 経路を介してパイエル板で Tfh 細胞を誘導する。しかし、これら CD4 陽性ヘルパー T 細胞についての報告が続く一方で、消化管常在菌による CD8 陽性細胞障害性 T (Cytotoxic T:CTL) 細胞に対する研究報告が少ない。この学術的現状を踏まえ本課題では、「腸内常在菌が CTL の機能に作用するか?」という問いに起因した研究を行った。常在菌は CTL の攻撃対象である細胞内病原性微生物の排除を強めることが報告されているため、その可能性は大きく期待できるものだった。

### 2. 研究の目的

本課題は腸内細菌叢が CTL の機能に及ぼす影響の理解とくにその中心的な機能を担う、Granzyme 産生 CTL を誘導する常在菌特定と感染症への関与解明を目的とした研究を行う。具体的には Granzyme 産生 CTL を強く誘導する腸内細菌種の同定を試みる。さらには、その感染症に対する防御機構増強効果を、マウスの感染モデルを用いて検討する。一連の解析を介して、細胞障害性機能への腸内常在菌の寄与を明らかにし、感染症の予防・治療への応用に発展する成果を目指す。

### 3. 研究の方法

Granzyme はアポトーシス誘導などを介して標的細胞に障害性作用を及ぼすエフェクター分子であり、主に CTL が産生する代表的なプロテアーゼである。本研究ではこの Granzyme 産生を細胞障害性作用の指標とし、その産生細胞誘導能に着目し研究を行った。マウスは 10 種類の Granzyme 遺伝子(Gzma-g,k,m,n)を有している。常在菌存在下で Granzyme 産生細胞の組織局在を検討するために、SPF マウスの小腸および大腸の粘膜固有層および上皮における Granzyme 産生細胞を市販されている特異的抗体を用いてフローサイトメーターにより解析・比較した。そして常在菌により発現がアップレギュレートされている Granzyme を特定するために、常在菌を持つ SPF マウスと持たない無菌マウスにおける各 Granzyme 発現細胞数を検討した。さらに腸内細菌による誘導を検討するために、無菌マウスに SPF マウスの小腸内容細菌およびヒト由来の特定細菌を定着させたノトバイオームマウスを作製しフローサイトメトリーおよびシングルセル RNA シーケンスにより解析した。

### 4. 研究成果

マウスはゲノム上に 10 種類の Granzyme 遺伝子(Gzma-g,k,m,n)を保持しており、10 番染色体に m、13 番染色体に k および a、14 番染色体に残りの b,c,f,n,g,d,e が位置する。このうち特異的抗体が入手可能な Gzma,B,M について、腸管粘膜固有層における産生細胞をフローサイトメトリーにより解析したところ、Gzma ならびに B 陽性細胞が多数局在していた。その細胞数の内訳は、TCR<sup>+</sup>CD8T 細胞が最も多く、ついで NK を含む ILC1(NK1.1<sup>+</sup>)細胞、TCR<sup>+</sup>細胞に加え少数の TCR<sup>+</sup>CD4T 細胞も発現していた。大腸の細胞についてより詳しく解析したところ、それぞれの細胞により Granzyme の発現パターンが異なっていた。具体的には TCR<sup>+</sup>CD8T 細胞は Gzmb 産生集団が多く、その約半分のポピュレーションは同時に Gzma も産生していた(Gzmb 単陽性および AB 両陽性)。一方、NK1.1<sup>+</sup>細胞は Gzma のみを産生する細胞が殆どであった(Gzma 単陽性)。TCR<sup>+</sup>細胞は Gzma 産生集団が多く、その半分以上が Gzmb も産生する両陽性細胞であった(Gzma 単陽性および AB 両陽性)。次に、これらの Granzyme 産生細胞に対する腸内細菌の関与を調べるために無菌マウスを解析したところ、CD8T と TCR<sup>+</sup>細胞の Granzyme 産生は AB とともに消失していた。一方で NK1.1<sup>+</sup>細胞の産生は 2/3 から半減するものの保持されていた。このことから腸内細菌が CD8T 細胞や TCR<sup>+</sup>細胞の Granzyme 産生を誘導する一方で、NK1.1<sup>+</sup>細胞の産生には関与が低いことが明らかとなった。また、IFN $\gamma$  産生 CD8T 細胞を誘導する健康者由来 11 細菌株を無菌マウスに定着させると腸管粘膜固有層において Gzmb 陽性 CD8T 細胞の誘導が認められた。その Gzmb 陽性 CD8T 細胞は一部 IFN $\gamma$  を共発現していた。シングルセル RNA シーケンス解析を実施したところ、それらは Gzma 陽性 CD8T 細胞を誘導していた。さらに同 11 細菌株の定着は大腸粘膜固有層のみならず、担がんマウスの腫瘍部においても GranzymeB や A 産生 CD8T 細胞を誘導する事がフローサイトメトリーやシングルセル RNA シーケンス解析により明らかとなった。

研究計画立案当初に想定していなかったが、腸内細菌が上皮間リンパ球の Granzyme 産生に関与することが考えられたため、その詳細についても検討した。SPF マウスの大腸上皮間リンパ球を採取し Granzyme 産生細胞を検討したところ、粘膜固有層と同様に TCR<sup>+</sup>T 細胞、TCR<sup>+</sup>T 細胞、NK 細胞が Granzyme を産生していた。いずれの細胞集団も GranzymeA や B を産生していた一方で GranzymeK は産生していなかった。Granzyme 産生細胞数は TCR<sup>+</sup>T 細胞や TCR<sup>+</sup>T 細胞

が多く、NK 細胞はかなり少なかった。なかでも TCR<sup>+</sup> T 細胞や TCR<sup>+</sup> T 細胞のうち CD8a<sup>+</sup>(CD8T)細胞が Granzyme を産生していた。具体的には、上皮間 TCR<sup>+</sup> T 細胞のうち 40-70% が GranzymeA 陽性、25-60%が GranzymeB 陽性であった。また上皮間 TCR<sup>+</sup> T 細胞の内、10%が GranzymeA 陽性、4-8%が GranzymeB 陽性だった。その集積と腸内細菌の関与を検討するため SPF マウスおよび一切の細菌が定着していない無菌マウスの大腸および小腸上皮間リンパ球を採取し Granzyme 産生細胞を検討したところ、無菌マウスにおける CD3 陽性 T 細胞すなわち TCR<sup>+</sup> T 細胞、TCR<sup>+</sup> T 細胞の Granzyme 産生細胞が SPF マウスに比べ顕著に低値を示した。また、小腸フローラを含む小腸内容物を無菌マウスに定着させたところ、Granzyme 産生 TCR<sup>+</sup> T 細胞、TCR<sup>+</sup> T 細胞が増加した。これらのことから、腸内常在菌により Granzyme 産生上皮間 T 細胞が誘導されることが分かった。また、IFN $\gamma$  産生 CD8T 細胞を誘導する健常者由来 11 細菌株を無菌マウスに定着させると、GranzymeB 産生性上皮間 TCR<sup>+</sup> T 細胞が誘導された。ヒト腸内常在菌についても上皮間リンパ球を誘導する細菌株があることが明らかとなり、その Granzyme 産生誘導機能を活用して感染症やがん治療に応用出来る可能性が考えられた。学術的には、これまでに Granzyme 産生を誘導する腸内細菌を体系的に精査した報告は無く、本研究はそのさきがけに相当する研究であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 新 幸二、 田之上 大	4. 巻 275
2. 論文標題 腸内細菌と免疫寛容および腫瘍免疫制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 103-107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 2. Nagayama M, Yano T, Atarashi K, Tanoue T, Sekiya M, Kobayashi Y, Sakamoto H, Miura K, Sunada K, Kawaguchi T, Morita S, Sugita K, Narushima S, Barnich N, Isayama J, Kiridooshi Y, Shiota A, Suda W, Hattori M, Yamamoto H, Honda K.	4. 巻 12
2. 論文標題 TH1 cell-inducing Escherichia coli strain identified from the small intestinal mucosa of patients with Crohn's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut Microbes	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19490976.2020.1788898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 田之上 大、 本田 賢也	4. 巻 37
2. 論文標題 腸内細菌叢によるがん免疫応答調節	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学増刊	6. 最初と最後の頁 97-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 田之上 大、 新 幸二、 本田 賢也	4. 巻 37
2. 論文標題 T細胞を誘導する腸内常在菌とがん免疫への関与	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学増刊	6. 最初と最後の頁 67-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田之上 大
2. 発表標題 CD8T細胞を誘導するヒト腸内細菌種の同定とがん免疫応答への関与
3. 学会等名 第29回 東京免疫フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi TANQUE, Kenya HONDA
2. 発表標題 A human-derived commensal bacteria that can induce IFN $\gamma$ -producing CD8 T cells and cancer immunity.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田之上 大
2. 発表標題 宿主免疫系に作用する腸内細菌種の同定とそのがん免疫応答に及ぼす影響
3. 学会等名 第7回 がんと代謝研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------