

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500958

研究課題名(和文)腸管の健康保持における食生活と腸内菌の重要性についての研究

研究課題名(英文)Importance of intestinal bacteria and dietary habits to maintain human health

研究代表者

片岡 佳子(KATAOKA, Keiko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：40189303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：免疫応答を制御するサイトカインであるインターロイキン-10を産生する細胞の出現に関わる腸内菌を探索した。マウス小腸粘膜内のB細胞の一種と考えられる細胞群が、無菌状態ではほとんど存在せず通常マウス糞便を投与すると増加すること、マウスの週齢に依存して増加することを見いだした。腸管内のグラム陽性菌を減少させる抗菌薬投与によりこの細胞群は減少し、グラム陽性菌であるEnterococcusのみを定着させると増加した。この細胞群は抗菌物質の産生や組織修復に関わるインターロイキン-22も産生した。未感作T細胞移入による大腸炎を抑制し、抗インターロイキン-10抗体の投与により抑制効果はキャンセルされた。

研究成果の概要(英文)：We searched intestinal bacteria which can induce interleukin-10-producing cells. B cell-like cell population in mucosa of mouse small intestine was very little under germ free condition, but increased age-dependently or by administration of SPF mice feces. This cell population was decreased by antibiotics for Gram-positive bacteria, and increased in mice monoassociated with Enterococcus, an Gram-positive bacteria. This population additionally produced interleukin-22 which can mediate the production of antibacterial peptide and tissue repair. Partially purified fraction of this population showed inhibitory effect on colitis in naive T cell-transferred mice, and the effect was cancelled by injection of anti-interleukin-10 antibody.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：腸内菌 無菌マウス ノトバイオトマウス B細胞 インターロイキン-10 インターロイキン-22 大腸炎モデル

## 1. 研究開始当初の背景

食生活の変化に平行して近年アレルギーや炎症性腸疾患が増加している。しかしながら、腸内主要構成菌種の腸管への定着あるいは食事成分の代謝がどのように腸内環境の恒常性の維持に寄与し、病態を抑制するのかが不明である。腸内優勢菌のうち分離培養が比較的容易な少数の菌種については、腸管上皮における抗菌物質や細胞間接着分子の産生を促進して腸管バリアを強化する作用と炎症性シグナルの伝達の修飾や制御性Tリンパ球の誘導による炎症抑制作用が報告されている。腸管内主要菌種には、難消化性の食物繊維などの食事成分を代謝して短鎖脂肪酸を産生するものがあるが、酪酸などの短鎖脂肪酸については腸管のバリア機能を高める作用や過剰な炎症を抑制する作用が報告されている。

## 2. 研究の目的

腸内菌を無菌マウスに定着させる実験モデルを用いて、免疫応答の調整および腸管バリア機能の促進に關与する腸内菌を特定することを第一の目的とした。その腸内菌の定着が食事成分の代謝を介して、炎症性腸疾患などの抑制に寄与する機構の解明を第二の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 無菌マウスに定着させるための腸内菌は、通常 (SPF) マウスの盲腸内容物から嫌氣的に分離し、16S ribosomal RNA 遺伝子の塩基配列の相同性に基づき同定し、7 菌種 (*Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Anaerotruncus*, *Alistipes*, *unclassified Porphyromonadaceae*, *Lachnospiraceae* の各属から計 7 菌種) を動物実験に使用した。また、理化研究所バイオリソースセンターから購入した標準菌株 (*Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactococcus* の各属から 1 菌種) を培養して使用した。これらの菌種を単独または組み合わせて無菌マウスに経口投与し 3 週間以上ビニルアイソレーター内で無菌的に飼育した後、マウスの小腸および大腸の上皮細胞間リンパ球および粘膜固有層リンパ球をフローサイトメトリーで解析した。

必要に応じて、無菌状態で飼育を続けたマウス、通常マウスの糞便を投与または通常マウスとの Cohousing により全腸内菌を定着させたマウス、抗菌薬バンコマイシン、ポリミキシン B またはメトロニダゾールを投与してグラム陽性菌、グラム陰性菌、または偏性嫌気性菌をそれぞれ減少させたマウスを実験群に加えた。動物実験は (*Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactococcus* の各属から 1 菌種) 徳島大学動物実験委員会の承認を得た計画に従って行い、動物の苦痛を最低限にするよう配慮した。

(2) 腸管からのリンパ球の調製の際には、

EDTA 処理して粘液や上皮細胞を除き、コラゲナーゼ処理後にパーコールを用いてリンパ球画分を集めた。必要時、磁気ビーズ法によりさらに腸管リンパ球の分画や脾臓からのナイーブ T 細胞の調製を行った。

(3) 小腸から調製した CD4 陰性 B220+IL-10 産生細胞を RPMI 培地中で培養し、その上清中の IL-10, IL-22 を ELISA 法により定量した。B 細胞に対する刺激には、抗 IgM 抗体および抗 CD40 抗体を合わせて使用した。

(4) C.B-17/1cr-scid/scid マウス (8 週齢、 ) に Balb/c マウス (8 週齢、 ) の脾臓から調製したナイーブ T 細胞を腹腔内投与し、慢性的に大腸炎を起こすモデル (Wasting Disease model) を用いて CD4 陰性 B220+IL-10 産生細胞の機能を調べた。この IL-10 産生細胞をナイーブ T 細胞投与前日から 1 週間おきに 3 回投与し、体重減少と下痢を指標として抑制効果の有無を観察した。RAG ノックアウトマウスを用いた同様の検討も行い、さらに抗 IL-10 抗体により大腸炎抑制効果が低下するかどうかを検討した。

## 4. 研究成果

(1) 免疫応答を制御するサイトカイン IL-10 を産生する細胞の出現に關わる腸内菌を探索するため、無菌マウスと通常 (SPF) マウスの小腸粘膜内のリンパ球画分を比較した。腸内菌の定着によって増加する IL-10 産生細胞としては CD4 陽性制御性 T 細胞が知られているが、小腸粘膜固有層の CD4 陰性の細胞群中にも IL-10 産生細胞は存在しており、通常マウスでは無菌マウスより多かった。この CD4 陰性 IL-10 産生細胞群には様々な細胞群が含まれていたが、通常の T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞とは表層マーカーの発現が異なるものの IgM の発現および RAG ノックアウトマウスには存在しなかったことから B 細胞の一種と考えられる細胞に着目し、以後の検討を行った。この細胞は 2 週齢の離乳前の通常マウスではわずかであるが、離乳後の 4 週齢~7 週齢の時期に小腸粘膜固有層内で増加していた。大腸粘膜内にも存在はしていたが、小腸粘膜の方がその存在比率は高かった。

(2) CD4 陰性で IL-10 産生性の B 細胞様の細胞 (sLPL) の出現に關わる腸内菌を明らかにするため、マウス盲腸内容物から分離した 7 菌種を混合して無菌マウスに投与した群では IL-10 産生 sLPL 細胞が増加していた。7 菌種のうち *Lactobacillus* を含む 3 種類を定着させた場合にも同様に sLPL 細胞の増加がみられた。増加の程度は SPF 便投与群に比べると小さかったが、7 菌種のうちいずれかは sLPL 細胞の出現に關与している可能性がある。

通常マウスに 4 週齢から抗菌薬バンコマイ

シンを投与したマウスでは非投与群に比べてCD4 陰性 IL-10 産生細胞が減少していた。グラム陽性菌のうちマウス由来の標準菌株の培養液を無菌マウスに経口投与し定着させたところ、*Bifidobacterium* と *Bacillus* を定着させたマウスではこの sLPL 細胞群の増加は見られず、*Enterococcus* 属菌を定着させたマウスでは増加がみられた。増加のレベルは SPF 便を投与した場合に比べると小さいが、常在菌として存在するグラム陽性菌の中に CD4 陽性制御性 T 細胞以外の IL-10 産生細胞の出現を誘導するものがあることが明らかになった。

(3)この sLPL 細胞画分を磁気ビーズを用いて調製し培養した。培養上清中には IL-10 の他にインターロイキン-22 (IL-22) が産生されていた。培養液中に B 細胞に対する刺激用抗体を加えると IL-22 の産生が増加した。IL-22 は抗菌タンパク質の産生や組織修復を促進するサイトカインであり、腸管内に多数存在する常在菌の体内への侵入を防ぎ、傷害された部分の修復を行う重要なサイトカインである。

(4)ナイーブ T 細胞を SCID マウスに移入する大腸炎モデルにこの CD4 陰性 IL-10 産生細胞画分からさらに分画を行って得られた sLPL 細胞を移入すると、大腸炎による体重減少が抑制される傾向がみられた。RAG-2 ノックアウトマウスにナイーブ T 細胞を移入する大腸炎モデルでも同様の結果であった。また、抗 IL-10 抗体をこの sLPL 細胞移入前日に投与することにより、大腸炎抑制効果が減少した。

以上の結果は、*Enterococcus* のような出生後の比較的早期に腸管に定着するようなありふれた常在菌への曝露によって、腸管における免疫応答の調整や腸管バリア機構の保持に参与する可能性のある細胞集団が出現することを示唆したものである。

## 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 4 件)

Bhuyan ZA, Arimochi H, Nishida J, Kataoka K, Kurihara T, Ishifune C, Tsumura H, Ito M, Ito Y, Kitamura A, Yasutomo K. CD98hc regulates the development of experimental colitis by controlling effector and regulatory CD4+T cells. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 査読有, Vol. 444(4), 2014, pp. 628-633, DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.144

Nakajima K, Maekawa Y, Kataoka K, Ishifune C, Nishida J, Arimochi H, Yoshimoto T, Tomita S, Nagahiro S,

Yasutomo K. The ARNT-STAT axis regulates the differentiation of intestinal TCR +CD8 + cells. *Nature Communications*, 査読有, Vol. 4, 2013, DOI: 10.1038/ncomms3112.

Iwahashi S, Maekawa Y, Nishida J, Ishifune C, Kitamura A, Arimochi H, Kataoka K, Chiba S, Shimada M, Yasutomo K. Notch2 regulates the development of marginal zone B cells through Fos. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 査読有, Vol. 418, 2012, pp. 701-707, DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.082

Nemoto H, Kataoka K, Ishikawa H, Ikata K, Arimochi H, Iwasaki T, Ohnishi Y, Kuwahara T, Yasutomo K. Reduced diversity and imbalance of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Science*, 査読有, Vol 57, 2012, pp. 2955-2964, DOI: 10.1007/s10620-012-2236-y

〔学会発表〕(計 1 件)

石舟智恵子他、Notch シグナルは小腸粘膜固有層に存在する CD4+CD11c+細胞の分化に必要である、日本免疫学会総会、2011 年 11 月 27 日 幕張メッセ(千葉県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

片岡 佳子 (KATAOKA, Keiko)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・教授  
研究者番号：40189303

(2)研究分担者  
有持 秀喜 (ARIMOCHI, Hideki)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号：30311822

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：