

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893326

研究課題名(和文) 腸管局在性IL22産生細胞の誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) Understanding for the induction mechanisms of intestinal IL22-producing cells

研究代表者

田之上 大 (Tanoue, Takeshi)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：60732972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では腸内感染症に対する抵抗性を高めるはたらきを持つとされているIL22産生細胞に着目し、腸管におけるその誘導機構について研究を行った。

まず、マウスの様々な臓器におけるIL22産生細胞数を測定した結果、腸管、特に小腸に豊富に集積していた。その誘導に腸内常在菌の関与が考えられたため、無菌マウスを解析したところ、IL22産生細胞が顕著に減少していたことから、腸内常在菌がその誘導に寄与していることが分かった。さらに、III型リンパ球がIL22のメインソースであること、またその誘導にはグラム陽性の腸内常在菌によるMyD依存的経路を介して刺激が必要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, I focused on interleukin (IL)22-producing cells, which are considered to be a key player in protection against gastrointestinal infection. First, I've analyzed the numbers of IL22-producing cells in various tissues of healthy mice. As a result, IL22-producing cells were abundant in gut, especially in the small intestine. In contrast to microbiota-harboring SPF (specific pathogen free) mice, germ-free mice showed substantially lower numbers of the cells, suggesting gut microbiota induce the accumulation of IL22-producing cells. Furthermore, I found that type3 innate lymphoid cells are main cellular source of IL22 and gram-positive indigenous members induce the IL22+ ILC3.

研究分野：免疫学、微生物学

キーワード：IL22 腸内細菌

### 1. 研究開始当初の背景

近年、特定の腸内常在菌種が特定の腸管免疫細胞を特異的に誘導することが明らかになってきた。例えば、腸管に存在する炎症誘導性 Th17 細胞および炎症抑制性 Treg 細胞が、それぞれ Segmented Filamentous Bacteria (SFB) およびクロストリジアという腸内常在菌種により特異的に誘導されることを報告した。

一方、インターロイキン(Interleukin ; IL) 22 産生細胞は腸管粘膜面に豊富に存在し、病原性細菌の排除を担うことが知られている。しかしながら、その誘導機構は解明されておらず、とくに腸内常在菌の影響が精査されていない。そのため当該研究分野は、実際の感染症治療につながる科学的知見を社会に対して提供するに至っていない。

### 2. 研究の目的

腸内感染症は病原性微生物の感染が原因で生じる疾患であり、重篤な症状を伴って死に至るケースが多い。近年、その治療には様々な抗生剤が利用されている。しかし、薬剤耐性菌の出現およびその流行(院内感染)の原因となることから、抗生剤にとって変わる、より安全で効果的な腸内感染症治療方法の開発が社会的急務になっている。

元来、ヒトを含めた哺乳類の腸管には、IL22 産生性自然免疫リンパ球が豊富に存在していて、病原体の排除を担っている。しかしながら、その誘導機構の詳細は解明されていない。そこで本研究では IL22 産生細胞に着目し、その誘導機構解明することで新規感染症治療法の開発につながる研究成果を目指した。具体的には、IL22 産生細胞を誘導する腸内常在細菌の単離・同定を試みた。

本研究の最終的な目的として、IL22 産生細胞を誘導する責任細菌の同定を掲げた。本研究課題期間中では、誘導責任細菌の候補を絞り込むことを具体的な目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

(1)生体における IL22 産生細胞の分布を調べるために腸内常在菌が存在する通常(Specific pathogen free : SPF)環境で飼育したマウスの様々な組織から細胞を単離しフローサイトメトリーにて IL22 産生細胞数を計測した。またその主要な産生ソースとなる細胞を主要な細胞表面マーカーを用いて検討した。

(2)IL22 産生細胞の誘導に及ぼす腸内常在菌の必要性を、無菌マウスの腸管 IL22 産生細胞を解析することで検証した。

(3)特定の細菌分画が影響しているのかを異なるスペクトラムを持つ抗生剤を投与する事で検討した。具体的には、グラム陽性菌に対して抗菌作用を持つバンコマイシン、グラ

ム陰性菌に対して抗菌作用を持つポリミキシンを投与し、腸管 IL22 産生細胞数を計測した。

(4)細菌に由来する責任因子を検討するため Toll-like、NOD-like、Dectin1 レセプターシグナル(MyD88, RIP2, CARD9)、短鎖脂肪酸を認識する GPCR(G タンパク質共役受容体)、AhR(芳香族炭化水素受容体)などの欠損マウスを解析した。

(5)IL22 産生細胞を誘導する腸内細菌を同定するために、様々な種類の細菌を別々の無菌マウスに投与し(ノトバイオマウスを作製)、IL22 産生細胞数をフローサイトメトリーにて解析した。具体的にはマウス由来 Th17 誘導セグメント細菌およびそれが欠如した米国ジャクソンラボラトリー社 SPF マウス便、さらにヒト由来菌として、Treg 誘導 17 菌株、Th17 誘導 20 菌株などを無菌マウスに投与し、腸管 IL22 細胞を解析した。

(6)IL22 産生細胞の特徴を検討するために、表面マーカーや転写因子などをフローサイトメトリーにて調べた。

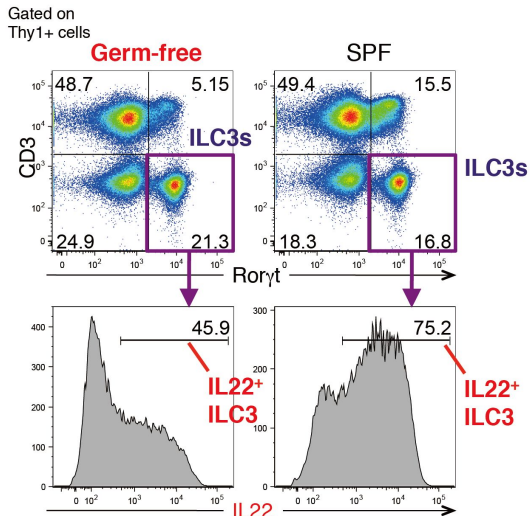
(7) IL22 産生の集積を誘導するシグナル伝達を検証した。In vivo で常時産生されている IL22 を計測するために新規に IL22 レポーターマウスを作製した。先行論文では IL22 の産生には IL23 の重要性が示唆されている。そこでこのレポーターマウスを IL23 欠損マウスと交配し、二重変異マウスを作製・解析した。

### 4. 研究成果

(1)マウスの様々な臓器における IL22 産生細胞数を測定した結果、腸管、特に小腸に豊富に集積していた。そしてその主要な産生細胞を解析した結果、CD90 陽性 CD3 陰性のリンパ球分画である、自然免疫リンパ球(Innate Lymphoid Cells ; ILC)がそのメインソースであることが分かった。IL22 を産生する ILC は転写因子 RAR-related orphan receptor gamma (RORγ)t を発現する 3 型自然免疫リンパ球(ILC3)であった。これは、既報の論文報告とも合致する内容である。

(2)腸管への IL22 産生 ILC3 の集積に腸内細菌の関与が考えられたため、無菌マウスの腸管 IL22 産生 ILC3 細胞数を解析した。その結果、正常な腸内細菌が存在する SPF マウスにくらべ、無菌マウスでは ILC3 細胞数には変化が無かったが、そのなかの IL22 産生細胞数が著しく減少していた(図 1)。また、無菌マウスに SPF マウスの便を投与すると、IL22 産生 ILC3 細胞数の増加が通常の SPF マウスと同じレベルにまで増加していた。これらの結果から、IL22 産生細胞は腸内常在菌依存的に消化管への集積が誘導されることが示唆

された。



(SI, IL23 stimulation)

図1. 無菌(Germ-free)マウスおよびSPFマウスでの IL22 産生 ILC3 細胞数の比較。

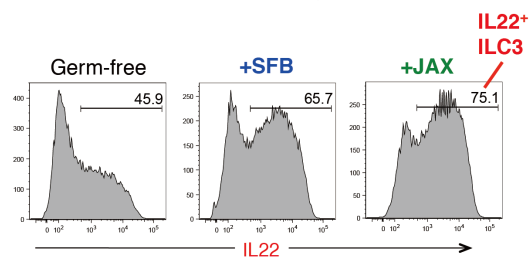
(3) IL22 産生 ILC3 の誘導に特定の細菌分画が影響しているのかを検証した。バンコマイシン、ポリミキシンを投与したマウスの腸管を解析することで検討した。その結果、バンコマイシン投与マウスでは IL22 産生 ILC3 細胞数の減少が見られたのに対し、ポリミキシン投与マウスでは変化が見られなかった。この結果から、腸内常在菌のうちバンコマイシン感受性のグラム陽性細菌が IL22 産生細胞の誘導に主たる役割を担っていることが示唆された。

(4)細菌の構成成分または代謝産物の認識レセプターを欠損したマウスにおける IL22 産生 ILC3 細胞数を調べた。Toll-like、NOD-like、Dectin1 レセプターシグナル(MyD88, RIP2, CARD9)、短鎖脂肪酸を認識する GPCR(G タンパク質共役受容体)、AhR 欠損マウスを解析した。その結果、MyD88 欠損マウスで IL22 産生細胞の減少が認められた。一方、RIP2、CARD9、GPR84 欠損マウスで細胞数に変化が見られなかった。AhR 欠損マウスでは、ILC3 細胞そのものが減少していた。この結果は既報論文と consistent である。以上から、IL22 産生細胞は Myd88 シグナル依存的な経路を介して誘導されることが示唆された。主な MyD を介するレセプターとして TLR および IL1 レセプターのシグナルが知られている。そのどちらのシグナルが IL22 産生 ILC3 に関与しているのかを調べた。IL1R 欠損マウスを解析したところ、wild type に比べ IL22 産生 ILC3 細胞数に大きな変化は認められなかった。この結果から、IL22 産生 ILC3 細胞の誘導は TLR-Myd88 経路を介することが示唆された。これは、バンコマイシン感受性の複数のグラム陽性細菌種が、toll-like receptor などのある程度 common な経路を介して IL22 産生

ILC3 細胞を誘導することを示唆している。これは当初予期していなかった知見である。

(5)Th17 細胞を誘導する細菌として同定されたセグメント細菌およびそれが欠如した腸内細菌叢を持つ米国ジャクソンラボラトリー社で飼育された SPF マウスの糞便、さらにヒト糞便から単離された Treg 誘導 17 菌株、Th17 誘導 20 菌株などを無菌マウスに投与し、腸管 IL22 細胞を解析した。また、常在菌以外の影響も検討するため、マウス腸管病原性大腸菌である *Citrobacter rodentium* の投与による影響も調べた。その結果、無菌マウスと比べてセグメント細菌(+SFB)の単独定着マウスにおいて IL22 産生 ILC3 細胞数が増加していた。また、それが欠如した菌叢(ジャクソンラボラトリー社便 : +JAX)でも IL22 産生 ILC3 の誘導が確認された(図2)。そして、ヒト由来の Treg 誘導 17 菌株、Th17 誘導 20 菌株でも IL22 産生 ILC3 細胞の誘導が見られた。これらの結果から、IL22 産生細胞はあらゆる腸内細菌の刺激により誘導されることが明らかとなった。前述(3)および(4)の結果もあわせて考慮すると、腸内細菌のうちグラム陽性細菌が Toll-like receptor の経路を介して IL22 産生細胞の集積に関与していることが示唆される。また、*Citrobacter rodentium* 投与で見られた IL22 産生細胞の集積は、本菌が病原性細菌であり、その感染により生じた炎症を介した二次的な事象として IL22 産生細胞の集積が起こった可能性も考えられる。

一方、その誘導程度は各細菌によって異なっていた。そのため、特定の common な因子を介した刺激が IL22 産生細胞の集積に関与していることが考えられた。



(SI, gated on ILC3 cells)

図2. セグメント細菌単独定着(+SFB)およびそれ以外のマウス腸内常在菌(+JAX)による小腸 IL22 産生 ILC3 細胞の誘導。

(6) IL22 産生細胞は Thy1 陽性で CD3 陰性かつ転写因子 Rorγt および T-bet 両陽性であった。またその一部は Nkp46 を発現していたことから、ILC3 のうち少なくとも 2 種類以上の亜集団によって IL22 産生が担われていて、そのどちらもが無菌マウスで減少していたことから、腸内常在菌依存的に誘導されることが分かった。

(7) IL22 産生の集積を誘導するシグナル伝達を検証した。先行論文では IL22 の産生には

IL23 の重要性が示唆されている。そこで、IL22-Venus レポーターマウスを新規に作製し、IL23 欠損マウスとのダブルミュータントマウスを作製・解析した。その結果、in vivo での発現細胞は IL23 欠損で減少していたが、in vitro でリコンビナント IL23 を補充・刺激すると正常な IL22 産生が観察された。このことから、IL23 は IL22 産生のトリガーとなるが、その産生能力を持つ細胞の集積には関与しないことが分かった。

#### 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 1 件)

1. Atarashi K\*, Tanoue T\*.ら 31 名.

(\* ; co-first author)

Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. Cell. 2015 Oct 8;163(2):367-80. doi: 10.1016/j.cell.

査読有り

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Tanoue T, Atarashi K.ら 6 名.

Microbiota-dependent induction of IL-22-producing ILC3 in the gut.

The 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology.2014/12/12 京都府京都市

〔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〕

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

田之上 大 (TANOUE Takeshi )

理化学研究所・統合生命医科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号: 60732972

(2)研究分担者

該当無し ( )

研究者番号:

(3)連携研究者

該当無し ( )

研究者番号: