

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06034

研究課題名(和文) 腸内マイクロバイオーームによるTfh細胞サブセットの挙動変化と免疫老化

研究課題名(英文) Involvement of gut microbiota in T follicular helper cell-associated immunosenescence

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ガラクトース誘導亜急性老化モデルマウスおよびSAMP1老化モデルマウスにおいて、正常老化マウスで認められる各CD4+T細胞サブセットの割合、特に濾胞ヘルパーT細胞(Tfh)様の表現型を有する細胞の増加が認められた。このTfh様細胞増加は、抗生物質投与による腸内細菌叢の変化によって抑制され、抗生物質投与マウスにおいて腸内優占種となっていたLactobacillus murinusの経口投与によっても同様の抑制効果が認められた。これらの結果からL. murinusが老化に伴い増加するTfh様細胞の分化および数の調節に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、老化に伴うT細胞の構成変化を特定の腸内細菌種によって抑制可能であり、老化病態形成を制御できる可能性が示された。本研究で確認されたTfh様細胞増加の老化病態形成への寄与は明らかとなっていないが、SLEを自然発症するBWF1マウスにおいて、同様の表現型を有するT細胞が若齢期から増加し、病態形成に関与する可能性が報告されている。本研究によって得られた知見は、老化病態のみならず、プロバイオティクス等を用いた自己免疫性疾患コントロールにおいても有用な基礎的データとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In our study, a significant increases of individual T-cell subsets especially T follicular helper (Tfh) cells, which were observed in normal aged mice, were observed in D-galactose-induced aging model mice and senescence accelerated mouse P1 (SAMP1), while antibiotics treatment effectively inhibited the increment of Tfh-like cells. Furthermore, oral administration of Lactobacillus murinus, which was identified as dominant species of intestinal microbiota in antibiotics treated mice, exhibit a similar inhibitory effects. These results suggests that L. murinus might be involved in differentiation and numerical regulation of Tfh-like cells, which might contribute to immunosenescence.

研究分野：実験動物学

キーワード：濾胞ヘルパーT細胞 免疫老化 腸内細菌叢 老化モデルマウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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。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、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(Tfh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Tfh細胞と一致する表現型(BCL6<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>)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。現在、老化研究にはD-ガラクトース投与による亜急性老化モデル、SAM(senescence accelerated mouse)の各系に代表される老化促進モデルマウスが使用されているが、これらのモデルにおけるT細胞サブセットの構成変化についてはほとんど検討されておられない。

(2)研究代表者(川田)は、過去の研究で若齢期より抗生物質を継続的に経口投与し、腸内細菌叢を減少させた正常老化マウス脾臓において、加齢に伴うTfh様細胞の増加が顕著に抑制されることを見出した。これらの結果は、免疫老化に伴う上記T細胞サブセットの構成変化においても、腸内細菌による調節機構が存在していることを強く示唆するものである。また、またこれらのマウスは、抗生物質非投与のコントロール群においても上記セグメント細菌を保有しておらず、免疫老化に伴って出現、増加するTfh様細胞の調節には、他の細菌種が関与していると推測される。

### 2. 研究の目的

(1)基礎的データとして、D-ガラクトース投与による亜急性老化モデル、老化促進モデルマウスSAMP1におけるT細胞分化から見た老化特性について検討した。

(2)マウスにおける免疫老化に対する腸内細菌の影響、機能的意義を明らかにするため、各種の老化モデルマウスを用いて、老化に伴い増加するTfh様細胞の分化、機能に腸内細菌がどのような影響を与えているのか、またその責任菌種・菌群について検討した。

### 3. 研究の方法

(1)12週齢のC57BL/6マウスにD-ガラクトースを100mg/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、及び老化促進モデルマウスSAMP1の脾臓からリンパ球を分離し、フローサイトメトリーを用いた各T細胞サブセットの表面マーカーを指標とした解析を実施した。また、SAMP1のコントロールとして正常老化を示すSAMR1マウスを用いた。

(2)バンコマイシン 500mg/LおよびポリミキシンB 100mg/Lを自由飲水させ、腸内細菌叢を攪乱、減少させた老化モデルの脾細胞について上記(1)と同様の解析を実施し、T細胞サブセットの構成変化について解析するとともに、当該マウスの糞便から腸内細菌叢解析を実施し、加齢に伴うTfh様細胞の増加に寄与する細菌種の特定を試みた。

(3)上記(2)で特定された候補菌種を経口投与した老化モデルの脾細胞についてFACS解析を実施し、脾臓におけるメモリーT細胞およびT細胞サブセットの構成を評価した

### 4. 研究成果

#### (1)老化モデルマウスにおけるTfh様細胞の数的動態

D-ガラクトース 100mg/kg/dayを12週齢より3ヶ月間皮下投与することにより作製した老化モデルマウスでは、脾臓由来CD4<sup>+</sup>T細胞における、メモリー形質を有するCD4<sup>+</sup>T細胞(CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup>)および各CD4<sup>+</sup>T細胞サブセット(Th1、Th2、Th17、T<sub>reg</sub>)の割合が、生理食塩水を投与した対照群と比較して有意に増加する結果となった。また、本来外来抗原の刺激によって誘導されるTfh細胞と類似した表現型(CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>)を示す細胞の自発的増加が認められ、同様の傾向が、4-40週齢のSAMP1においても認められた(図1B)。これらのTfh様細胞は、ヒツジ赤血球を用いて若齢マウスで誘導したTfh細胞と比較して、重要なTfh機能マーカーであるICOSおよびBCL6を同等のレベルで発現しており、通常のTfh細胞機能を有していることが推測される一方、PD-1の発現が高く、CD153陽性細胞を多く含む特徴が認められた。これらのT細胞サブセットの構成変化およびTfh様細胞の特徴は正常老化マウスについて実施した解析結果と類似しており、これまでに報告されている免疫老化病態を反映していることから、本老

化マウスモデルが免疫老化研究において有用である可能性が示された。

### (2) 老化モデルマウスにおける老化関連 Tfh 様細胞動態と腸内細菌叢

抗生物質投与により腸内細菌叢を攪乱、減少させた亜急性老化モデルについて FACS 解析を実施し、脾臓におけるメモリーT細胞およびT細胞サブセットの構成を評価したところ、抗生物質の投与により腸内細菌叢を攪乱した老化モデルマウスでは、上記T細胞の構成変化が顕著に抑制される結果となり、T細胞を中心とした免疫系の加齢性変化に腸内細菌叢が強く関わっていることが示唆された(図2A)。さらに、抗生物質投与マウスの腸内細菌叢解析を実施したところ、菌種多様性の顕著な低下とともに *Lactobacillus* 属が優占となっており、種レベルでは *L.murinus* の顕著な増加が認められた(図2B)。

### (3) 老化関連 Tfh 様細胞の数的動態における *L.murinus* の修飾作用

C57BL/6J マウスに D-ガラクトース 100 mg/kg/day を 8 週齢より 3 ヶ月間皮下投与することにより作製した亜急性老化モデル、同時に *L.murinus* を 3 日ごとに  $2 \times 10^8$  経口投与した上記老化モデルの脾細胞について FACS 解析を実施し、脾臓におけるメモリーT細胞およびT細胞サブセットの構成を評価したところ、*L.murinus* 投与群では上記T細胞の構成変化が顕著に抑制される結果となり、特にT細胞を中心とした免疫系の加齢性変化に対し、本菌が抑制的な作用を有している可能性が示された。

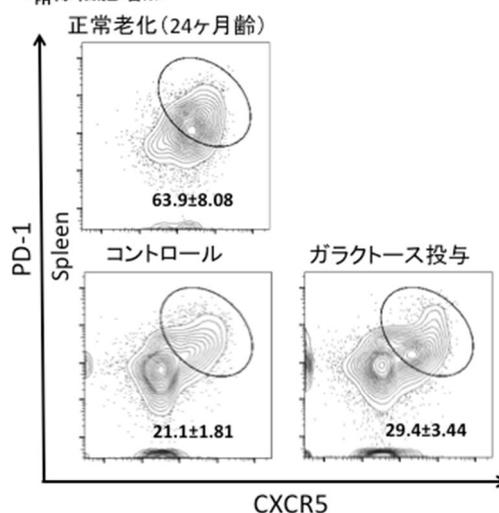
### (4) 総括

本研究により、使用した老化マウスモデルがT細胞サブセットの構成変化から見た免疫老化を再現しており、また腸内細菌叢を構成する *L.murinus* が、老化に伴うこれらの変化を抑制する可能性が明らかとなった。老化に伴い増加する Tfh 様細胞の老化病態形成における役割は未だ明らかとなっていないが、SLE を自然発症する BWF1 マウスにおいて、同様の表現型を有するT細胞が若齢期から増加し、病態形成に関与する可能性が報告されており、本細胞の増加を抑制する *L.murinus* は、自己免疫性疾患の病態形成においても抑制的な作用を有する可能性が推測される。本研究で得られた知見は、腸内細菌叢の老化病態形成における修飾作用の解明に加え、プロバイオティクス等による自己免疫性疾患コントロールにおいても有用な基礎的データとなると考えられる。

### < 引用文献 >

Tahir, S., Y. Fukushima, K. Sakamoto, K. Sato, H. Fujita, J. Inoue, T. Uede, Y. Hamazaki, M. Hattori, and N. Minato. 2015. A CD153 + CD4 + T Follicular Cell Population with Cell-Senescence Features Plays a Crucial Role in Lupus Pathogenesis via Osteopontin Production. *J. Immunol.* 194: 5725-5735.

### A ガラクトース誘発老化モデルマウスにおける T<sub>FH</sub> 様細胞増加



### B SAMP1マウスにおける T<sub>FH</sub> 様細胞増加

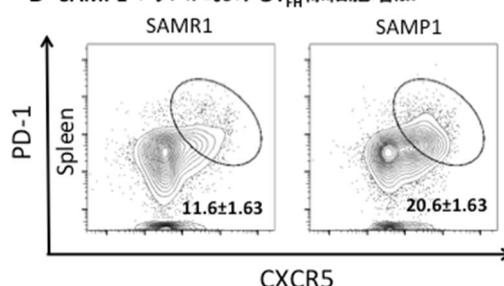
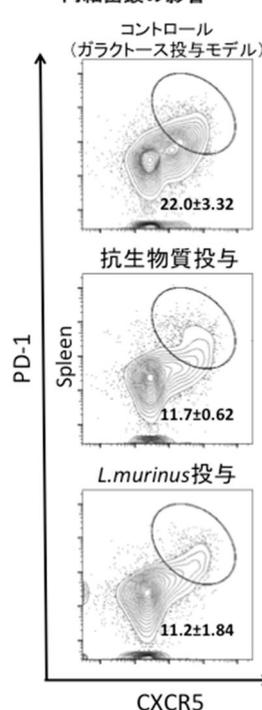


図1 ガラクトース誘発およびSAMP1老化モデルマウス脾細胞における Tfh 様細胞動態

### A ガラクトース誘発老化モデルマウスの T<sub>FH</sub> 様細胞動態における腸内細菌叢の影響



### B 抗生物質投与マウスにおける腸内細菌叢の変化

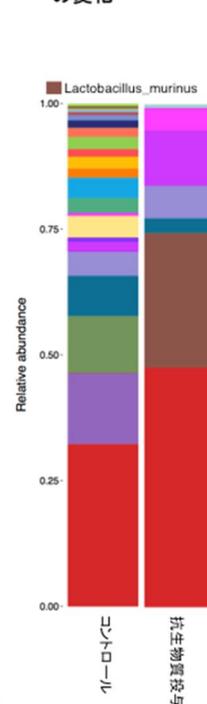


図2 ガラクトース誘発老化モデルの Tfh 様細胞動態における腸内細菌叢の関与と責任菌種

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 KAWATA Koji, SUZUKI Takato, OZAWA Kazunori, SEKIGUCHI Miho	4. 巻 -
2. 論文標題 Features of T-cell subset composition in a D-galactose-induced senescence mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Animals	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） 10.1538/expanim.20-0095	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川田 耕司, 鈴木 崇斗, 小澤 和典, 関口 美穂
2. 発表標題 ガラクトース誘発亜急性老化モデルおよび老化促進モデルマウスSAMP1における濾胞ヘルパーT様細胞の数的動態
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川田 耕司, 鈴木 崇斗, 小澤 和典, 関口 美穂
2. 発表標題 老化モデルマウスにおける濾胞ヘルパーT様細胞の数的変動
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018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
---------	---------