

機関番号：12601

研究種目：研究活動サポート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890127

研究課題名（和文） 腸管でのTh17細胞の誘導、活性制御法の開発

研究課題名（英文） Analysis of the induction and activation of intestinal Th17 cells

研究代表者

新 幸二 (ATARASHI KOJI)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：60546787

研究成果の概要（和文）：Th17細胞は近年新たに同定されたヘルパーT細胞の一種であり、インターロイキン（IL-）17やIL-17F、IL-22を産生することで細胞外寄生菌の感染防御や自己免疫疾患の発症に寄与していることが知られている。今回、腸管に多く存在しているTh17細胞が腸内常在細菌の一種であるセグメント細菌(SFB)によって誘導されていることを明らかにした。一方で、免疫抑制に重要な役割を担っている制御性T細胞（Treg細胞）はクロストリジウム属細菌によって誘導されていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Th17 cells, one of T helper subsets, secrete interleukin-17 (IL-17), IL-17F, and IL-22 and have significant roles in protecting the host from bacterial and fungal infections, as well as autoimmune diseases. I have demonstrated that Th17 cells are abundant in intestinal mucosa and Th17 cell accumulation in gut is induced by segmented filamentous bacteria (SFB). At the same time, the accumulation of regulatory T cells (Tregs) in gut is mediated by Clostridium species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：ライフサイエンス（共通基礎研究）

キーワード：Th17細胞、Treg細胞、腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

(1) Th17細胞は細胞外寄生細菌の感染防御や自己免疫疾患の発症に関与していることが報告されているが、その多くの解析は *in vitro* 誘導系や自己免疫疾患のモデルマウスを用いて行われている。これまでの研究によって、Th17細胞が腸管に多く存在していること、その誘導に細胞外ATPが関与していることを突き止めた。しかし、腸管Th17細胞の分化誘導機構の詳細や腸管炎症への関与に

ついてはほとんど解明されていない。

(2) Th17細胞と同様にTreg細胞も腸管に多く存在していることが報告されているが、その誘導機構や役割についてはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) 細胞外ATPがどのような機構で腸管Th17細胞の誘導を促進しているのか、またど

のような腸内細菌が Th17 細胞の誘導に関与しているのかについて注目し解析を行う。その際、Th17 細胞の腸管炎症への関与について明らかにし、Th17 細胞の誘導を抑制することやその活性の制御機構を促進することで腸炎の予防法や治療法の開発基盤を提供することを目指す。

(2) これまでの解析により他の組織と比較して腸管粘膜固有層に Treg 細胞が多く存在していることを突き止めた。そこで、炎症の抑制に重要である Treg 細胞の腸管での誘導機構を解析する。その結果をもとに腸炎の予防や治療法の開発につなげることを目指す。

3. 研究の方法

(1)

①腸内細菌が存在している SPF マウスと比較すると、腸内細菌が存在しない無菌マウスの腸管には Th17 細胞が激減している。また、アメリカの動物ブリーダーであるジャクソン研究所とタコニック社の SPF マウスを比較すると、タコニック社由来のマウスの腸管には多くの Th17 細胞が存在しているが、ジャクソン研究所由来のマウスにはほとんど存在していないことが明らかになった。以上のことから、ジャクソン社とタコニック社のマウスの腸内細菌を比較することで、Th17 細胞の誘導に関与している細菌が同定できることが考えられる。

②同定した腸内細菌が本当に腸管での Th17 細胞の誘導に関与しているかを解析するため、無菌マウスに同定した菌のみを定着させるノトバイオトマウスの手法を用いる。その結果、Th17 細胞が誘導されることが確認できれば、どのようなメカニズムで誘導されているか解析を行う。無菌マウスと同定された細菌のノトバイオトマウスの比較、およびジャクソン研究所のマウスとジャクソン研究所のマウスに同定された細菌を定着させたマウスの比較を行う。例えば、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現を比較し、Th17 細胞の存在と相関して発現が上昇している遺伝子、または減少している遺伝子を網羅的に探索する。その後、得られたデータをもとにどのようなシグナル伝達経路が活性化しているのか予想する。また、発現が上昇していた遺伝子産物が Th17 細胞の誘導に関与していることが考えられるので、in vitro での Th17 細胞の分化誘導条件に添加することで Th17 細胞の誘導が促進されるかを解析する。

③Th17 細胞は IL-17 を産生し細胞外寄生細菌や真菌などの感染防御に重要な機能を有していることが報告されている。そこで、腸管での Th17 細胞の機能を解析するため、ジャ

クソン研究所のマウスに同定した細菌を定着させ腸管 Th17 細胞がないマウスと多いマウスを作成する。これらの両マウスを用いて、経口的に病原性細菌を感染させ、炎症の程度、細菌数等を測定することにより、腸管 Th17 細胞の役割を解析する。

(2)

①Treg 細胞は全身に存在しているが腸管の特に大腸に多く存在していることが知られている。このことから、Th17 細胞だけでなく Treg 細胞も腸内細菌によって誘導されていることが推測された。そこで、腸内細菌の存在しない無菌マウスと SPF マウスを比較することにより、管での Treg 細胞の増加が腸内細菌によって引き起こされているかを検討する。もし、腸内細菌によって誘導されていることが明らかになれば、ある種の細菌特異的に効果のある抗生物質を用いて、どのような細菌種が Treg 細胞の増加に寄与しているかを突き止める。その後、Th17 細胞の実験と同様にノトバイオトマウスを用いた実験を行い Treg 細胞の増加に関与している細菌を同定する。

②腸管の Treg 細胞は抗炎症性サイトカインである IL-10 を高産生していることが知られている。そこで、同定された細菌が Treg 細胞の誘導のみに関与しているのか、Treg 細胞からの IL-10 産生にも関与しているかを解析する。これまでの研究において IL-10 レポーターマウスを作成しており、このマウスを無菌化すると Treg 細胞からの IL-10 産生に影響があるのか、同定された細菌を定着させると IL-10 産生能が回復するのかを検討する。また、Treg 細胞には胸腺で分化する内在性 Treg 細胞と末梢でナイーブ T 細胞から分化する誘導性 Treg 細胞の 2 種類が存在している。このことから、腸内細菌の影響を受けている Treg 細胞が内在性 Treg 細胞なのか誘導性 Treg 細胞なのかを解析する。

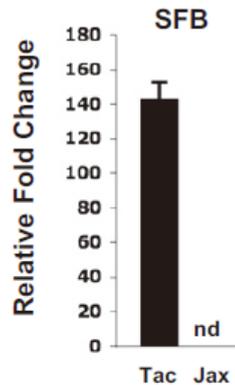
③Treg 細胞は自己反応性 T 細胞の制御や過剰な免疫反応の抑制に機能していることがよく知られている。同時に Treg 細胞が腸管炎症の抑制に重要であることが明らかになっている。そのため、腸管での腸内細菌によって増加した Treg 細胞が腸管炎症の抑制に機能しているかを解析する。腸炎の発症には腸内細菌が関与していることが知られているので、無菌マウスと同定した細菌のみのノトバイオトマウスの比較では Treg 細胞の腸管炎症への役割がきれいに解析できないことが考えられる。そこで SPF マウスに同定した細菌を上から投与し、この細菌が多いマウスと少ないマウスを作成し、腸炎モデルを用いて Treg 細胞の腸管炎症への役割について

解析を行う。

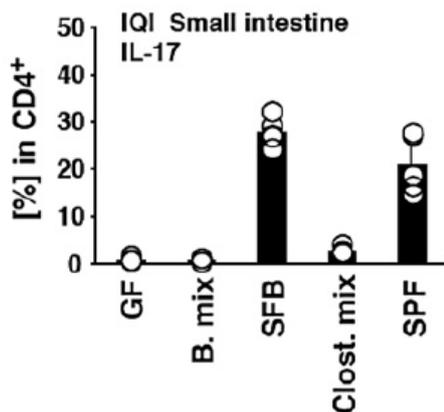
4. 研究成果

(1)

①同じ系統のマウスであってもタコニック社 (Tac) のマウスの腸内には Th17 細胞が多く存在しているのに対しジャクソン研究所 (Jax) のマウスにはほとんど存在していない。そこで、これらのマウスの腸内細菌を構成している細菌種を PhyloChip を用いて比較した。その結果、セグメント細菌 (SFB) がジャクソン研究所のマウスにはほとんど存在しておらず、タコニック社のマウスには多く存在していた (右図)。このことから、セグメント細菌が腸管での Th17 細胞の誘導に関与していることが強く示唆された。



②SFB が直接腸管での Th17 細胞の誘導に関与しているかを解析するため、無菌マウスに SFB、他の細菌種であるバクテロイデス属 (B. mix)、クロストリジウム属 (Clost. mix) の細菌をそれぞれ定着させ Th17 細胞が誘導されるかを解析した。その結果、バクテロイデス属、クロストリジウム属の細菌群のみを定着させた無菌マウスでは CD4⁺T 細胞の中の Th17 細胞の割合はほとんど変化なかったが、SFBのみを定着させたマウスでは Th17 細胞の割合が

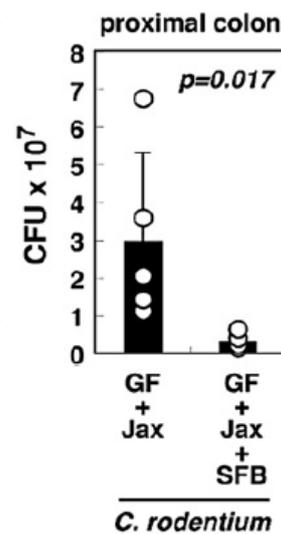


劇的に増加し、SPF マウスと同程度まで回復した (右図)。このことから SFB が強い Th17 細胞の誘導能力を有していることが明らかになった。また、無菌マウスと SFB ノトバイオオートマウスの比較、ジャクソン研究所のマウスの便のみとジャクソン研究所の便+SFB を定着させたマウスの小腸から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現を比較した。その結果、血清アミロイド A (SAA) の遺伝子発現の上昇が SFB ノトバイオオートマ

ウス、ジャクソン研究所のマウス便+SFB においてコントロールと比較して 50 倍から 200 倍を顕著に上昇していた。また、Th17 細胞の in vitro 培養系に SAA を添加すると Th17 細胞の誘導が促進された。このことから SFB の定着により腸管での SAA の発現が上昇し Th17 細胞の誘導に寄与していることが明らかになった。

③SFB によって腸管で誘導された Th17 細胞がどのような役割を持っているかを検討した。無菌マウスにジャクソン研究所のマウス便のみ (GF+Jax)、ジャクソン研究所のマウス便と SFB (GF+Jax+SFB) を定着させたマウスを作成し、病原性大腸菌である *Citrobacter Rodentium* を経口的に感染させた。1 週間後、腸管内に浸潤して

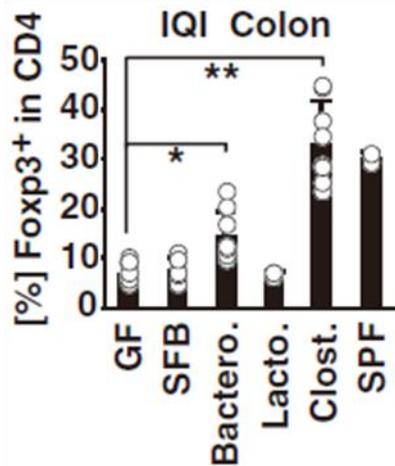
きた細菌数を測定すると、GF+Jax マウスと比較して GF+Jax+SFB マウスでは有意に浸潤細菌が減少していた (右図)。同様に炎症による腸管の肥厚が抑制されていた。以上のことから、SFB によって誘導された腸管 Th17 細胞は、経口的に侵入してくる病原性微生物に対する防御反応に重要な役割を担っていることが考えられた。



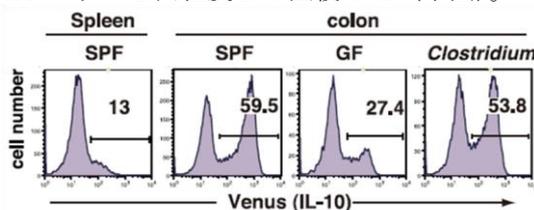
(2)

①Th17 細胞と同様に Treg 細胞も腸内細菌によって誘導されているかと検討するため、無菌マウス (GF) と SPF マウスを比較した。その結果、大腸では Balb/c (BALB)、IQI、C57BL/6 (B6) 系統のマウスすべてにおいて GF で減少していた。このことから大腸では腸内細菌によって Treg 細胞が誘導されていることが明らかになった。そこで、どのような腸内細菌が Treg 細胞の誘導に機能しているのかを突き止めるため、グラム陽性菌に効くバンコマイシン、グラム陰性菌に効くポリミキシン B を SPF マウスに飲ませ、Treg 細胞数を測定した。芽胞を形成しない細菌を殺すためクロロホルム処理をした SPF マウスの便を無菌マウスに定着させ Treg 数を測定した。その結果、バンコマイシンで処理したマウスにおいて Treg 細胞数の減少が確認でき、クロロホルム処理をした SPF マウスの便でも無菌マウスで減少した Treg 細胞の増加が観察できた。これらのことから、グラム陽性の芽胞形成細

菌が大腸 Treg 細胞の誘導に重要であることが強く示唆された。そこで、大腸に定着するグラム陽性の芽胞形成細菌であるクロストリジウム属 (Clost.)、小腸に定着するグラム陽性芽胞形成細菌である SFB、グラム陽性芽胞非形成細菌であるラクトバチルス属 (Lacto.)、グラム陰性芽胞非形成細菌であるバクテロイデス属 (Bactero.) をそれぞれ無菌マウスに定着させ、どの菌種が大腸 Treg 細胞の誘導に機能しているかを検討した。その結果、バクテロイデス属でも大腸 Treg 細胞の上昇が少し観察できたが、クロストリジウム属細菌の定着により SPF マウスと同程度の強い誘導が確認できた (右図)。このことから、腸内細菌の中でクロストリジウム属細菌が大腸 Treg 細胞の誘導に重要な働きをしていることが明らかになった。



②Treg 細胞からの IL-10 の産生を解析するため、IL-10 の遺伝子の 3' -UTR 領域に IRES-Venus (蛍光タンパク質) を挿入したノックインマウスを作成した (IL10-Venus マウス)。この IL10-Venus マウスの脾臓 (Spleen)、大腸 (Colon) から Treg 細胞を単離し、Venus の発現をフローサイトメトリーにより解析すると、脾臓の Treg 細胞は 10 数% と少ないのに対し、大腸 Treg 細胞は 50% 以上が IL-10 を産生していることが判明した (下図)。また、IL10-Venus マウスを無菌化すると、Venus 陽性 Treg 細胞が有意に減少し、無菌マウスにクロストリジウム属細菌を定着させると SPF マウスと同程度まで回復した (下図)。



さらに、内在性 Treg 細胞のマーカーである Helios の発現を解析すると、無菌マウスの大腸で減少した Treg 細胞のほとんどが誘導性 Treg 細胞であり、クロストリジウム属細菌の定着によって増加する Treg 細胞は誘導性 Treg 細胞であった。以上のことから、クロス

トリジウム属細菌は大腸の誘導性 Treg 細胞の増加に重要であり、同時に Treg 細胞からの IL-10 の産生にも関与していることが明らかになった。

③クロストリジウム属細菌によって誘導された Treg 細胞が腸管炎症の抑制に機能しているかを解析するため、2 週齢の SPF マウスにクロストリジウム属細菌を投与しクロストリジウム属細菌の多く存在するマウスを作成した。通常 SPF マウスと比較してこのクロストリジウム属の多いマウスは大腸の Treg 細胞が有意に増加していた。そこで、腸炎を誘導する DSS や TNBS を投与したところ、クロストリジウム属細菌の多いマウスは腸炎の症状が軽く、炎症が抑制された状態にあることが明らかになった。また、炎症性腸疾患の患者ではクロストリジウム属細菌が減少していることが報告されており、腸炎の予防にクロストリジウム属細菌による Treg 細胞の誘導が関与していることが予想される。

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 3 件)

①Atarashi K et al. Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. **Science** 査読有、331(6015) 337-341. (2011)

②Atarashi K, Tanoue T, Honda K. Induction of lamina propria Th17 cells by intestinal commensal bacteria. **Vaccine** 査読有、28(50) : 8036-8038. (2010)

③Ivanov II*, Atarashi K* et al. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. **Cell** 査読有、139(3) : 485-498. (2009) *These authors contributed equally to this work

[学会発表] (計 2 件)

①新幸二, Regulation of colonic regulatory T cells by Clostridium species、第 14 回国際免疫会議、2010 年 8 月 25 日、神戸国際展示場 (兵庫県)

②新幸二、腸内細菌による Th17 細胞誘導機構、日本食品免疫学会設立 5 周年記念学術大会、2009 年 5 月 27 日、東京大学 (東京都)

[図書] (計 1 件)

① 新幸二、日本メディカルセンター

(INTESTINE)、ATP が腸管粘膜固有層の Th17 細胞を誘導する、2009、437-439

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：制御性 T 細胞の増殖または集積を誘導する作用を有する組成物

発明者：本田賢也、新幸二、伊藤喜久治

権利者：東京大学

種類：特許

番号：特願 2010-129134

出願年月日：2010 年 6 月 4 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.immunol.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新 幸二 (ATARASHI KOJI)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：60546787

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし