

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05657

研究課題名(和文) 腸内細菌による炎症性疾患の発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of the Th17 cell-inducing bacteria from IBD patients

研究代表者

新 幸二 (Atarashi, Koji)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：60546787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト腸内に存在するTh17細胞誘導細菌の単離・同定を行った。潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌を無菌マウスの腸内へ定着させたところ、腸管Th17細胞の有意な増加が確認できた。そこでどのような細菌種がTh17細胞の誘導に関与しているのかを特定するため、抗生剤処理を行った後、Th17細胞の誘導が維持されていたマウスから腸内細菌の培養を行い、クロストリジウム属、ビフィドバクテリウム属、バクテロイデス属など合計20菌株を単離した。これら20菌株のみを腸管へ定着させただけで強いTh17細胞の誘導が見られたことから、ヒト腸内においてこれら20菌株が腸管Th17細胞の誘導に関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Th17 cells play a role in host defense against extracellular pathogens and also pathogenesis of multiple inflammatory and autoimmune disorders. I have identified the human gut bacteria that could induce intestinal Th17 cells. Th17 cells were significantly increased in the colon of the germ-free mice inoculated with fecal samples from Ulcerative colitis (UC) patients. This Th17 cell induction was further enhanced when the mice were treated with Ampicillin (Amp) in the drinking water. To isolate Th17-inducing bacterial species, I cultured cecal contents from these UC feces colonized and Amp treated mice. I isolated 20 bacterial strains belonging to Clostridium, Bifidobacterium, Ruminococcus, and Bacteroides and inoculated germ-free mice with these 20 strains. The colonization of these 20 strains strongly induced a robust accumulation of Th17 cells in the colon. Furthermore, nine out of the 20 strains were significantly increased in the microbiomes of UC and Crohn's disease subjects.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：Th17細胞 microbiota IBD

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトの腸管内腔には数百種類・百兆個以上の細菌が存在し、腸内細菌叢（腸内フローラ）と呼ばれる生態系を形成している。近年、次世代シーケンサーを用いて腸内細菌叢を網羅的に解析するメタゲノム（メタ 16S rRNA 配列）解析が世界プロジェクトとして進められており、腸内細菌叢の変化・異常（Dysbiosis）が炎症性腸疾患や大腸がん、アレルギー、肥満、糖尿病など様々な疾患患者において検出されている。そのため、腸内細菌の個々の細菌種の機能・役割を明らかにすることが強く求められている。我々はマウス腸内常在細菌であるセグメント細菌（SFB: segmented filamentous bacteria）が Th17 細胞の誘導および活性化に関与していることを明らかにしたが、マウスで強力に Th17 細胞を誘導する SFB と同等の機能をもつ細菌はヒト腸内からはまだ発見されていない。

2. 研究の目的

ヒトの腸内に存在する Th17 細胞を誘導・活性化する細菌を単離、同定し、ヒト腸内細菌による腸管 Th17 細胞の誘導メカニズムの詳細を明らかにする。そのため、以下のテーマを設定し、各々の疑問に対する答えを導きだすよう解析を行う。

(1)Th17 細胞を誘導するヒト腸内細菌の探索・同定

これまでにヒト潰瘍性大腸炎（UC）患者の糞便を無菌マウスに投与すると大腸粘膜固有層の Th17 細胞が強く増加することを確認している。この糞便中の特定の細菌が Th17 細胞の誘導に関与しているのか？また、それはどのような細菌か？について、ノトバイオームマウス作成を通して解析を行う。

(2)ヒト由来腸内細菌の Th17 細胞の誘導機構の解明

ヒト由来腸内細菌がどのようにして、または細菌由来のどのような分子が Th17 細胞の誘導に関与しているのか？について細菌のゲノミクス、トランスクリプトミクス、メタボロミクスを活用し解析を行う。また、細菌からどのような刺激が宿主に入り、どのような細胞が Th17 細胞の誘導に関与しているのか？については、様々な遺伝子組換えマウスや阻害剤を用いて解析を行う。

(3)疾患発症におけるヒト由来 Th17 誘導細菌の機能解析

炎症性腸疾患、関節リウマチ、多発性硬化症のマウスモデルでは Th17 細胞が発症に関与していることが明らかになっている。そこで同定したヒト Th17 誘導細菌がこれらのヒト疾患に関与しているのか？について、まず Th17 細胞誘導細菌がこれらの疾患患者で増加しているか Database を用いて解析を行う。その後、これらの疾患マウスモデルにヒト Th17 誘導細菌を定着させ、炎症が増悪するか検討する。

3. 研究の方法

(1)Th17 細胞を誘導するヒト腸内細菌の探索・同定

UC 患者の便を定着させたマウスに様々な抗生剤を飲水投与し、腸内細菌叢に変化を起こした場合に Th17 細胞の誘導が抑制されるか、増強もしくは変化しないかを解析する。

これらの抗生剤処理マウスの腸内細菌叢を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析する（メタ 16SrRNA 解析）。

Th17 細胞の誘導が見られた抗生剤投与マウスの便または盲腸内容物から細菌を培養し単離する。

ノトバイオームマウスを作成し、Th17 細胞が誘導されるかを検証する。

(2)ヒト由来腸内細菌の Th17 細胞の誘導機構の解明

同定された Th17 細胞誘導細菌のゲノム解読を行い、Th17 細胞誘導に関与していると想定される遺伝子を探索する。

ノトバイオームマウスの上皮や樹状細胞の RNA-seq を行い、候補遺伝子の関与を検証する。

(3)疾患発症におけるヒト由来 Th17 誘導細菌の機能解析

炎症性腸疾患患者の腸内細菌叢解析のデータベースを用いて、疾患患者において Th17 細胞誘導細菌が増加しているかを解析する。

疾患モデルマウスに Th17 細胞誘導細菌を定着させ、疾患の発症や増悪に関与するかを検証する。

4. 研究成果

(1)Th17 細胞を誘導するヒト腸内細菌の探索・同定

はじめにヒトの腸内細菌で Th17 細胞の誘導が見られるか確認するために、潰瘍性大腸炎（UC）患者 2 名（UC4-2, UC5-1）、健常者 3 名（H11, H17, H23）の便を無菌マウスに投与し、大腸の Th17 細胞をフローサイトメトリーにより解析を行った。その結果、潰瘍性大腸炎患者でも健常者でも Th17 細胞の誘導が見られた（図 1 左）。

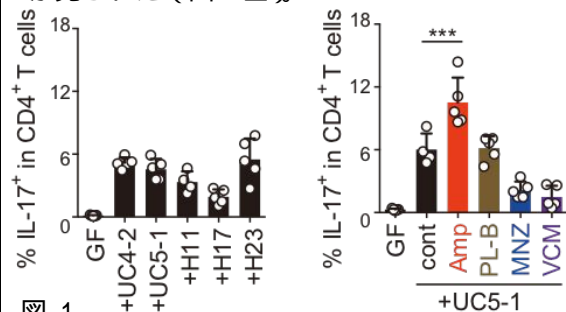


図 1

そこで、次に UC5-1 便投与マウスを用いてどのような細菌が Th17 細胞の誘導に関与しているのかを探索するため、アンピシリン（Amp）ポリミキシン B（PL-B）、メトロニダゾール（MNZ）、バンコマイシン（VCM）を飲水投与し、Th17 細胞の誘導に変化が起こるか

を検証した結果、アンピシリン投与すると Th17 細胞が増加、ポリミキシン B 投与では変化なく、メトロニダゾールとバンコマイシン投与では Th17 細胞が減少した (図 1 右)。このことから、アンピシリン耐性でメトロニダゾールとバンコマイシン感受性の細菌が Th17 細胞の誘導に関与していることが明らかになった。

次にアンピシリン投与マウスの盲腸内容物から細菌の培養を行った。その結果 20 種類の細菌を単離した。そこで単離した 20 菌株を無菌マウスに定着させ、単離できた 20 菌株のみで Th17 細胞が誘導できるかを検証した。その結果 20 菌株のみで IL-17 を産生する Th17 細胞が強く誘導された (図 2、3)

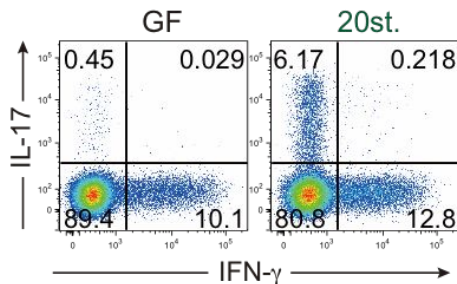


図 2

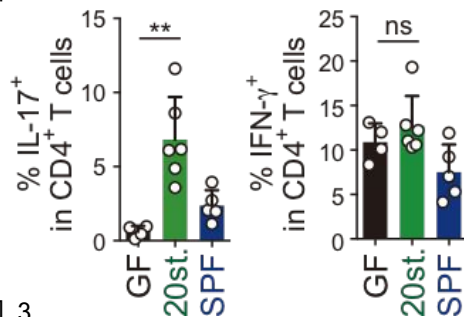


図 3

(2) ヒト由来腸内細菌の Th17 細胞の誘導機構の解明

マウス腸内細菌の SFB が腸管上皮細胞に強く接着することで Th17 細胞の誘導が促進されることが明らかになったため、このヒト由来 20 菌株も腸管上皮細胞に強く接着しているのではないかと考え、ノトバイオオートマウスの大腸管腔側表面を走査電子顕微鏡を用いて観察を行った。その結果、たくさんの細菌が上皮細胞に強く接着している様子が観察できた (図 4)。

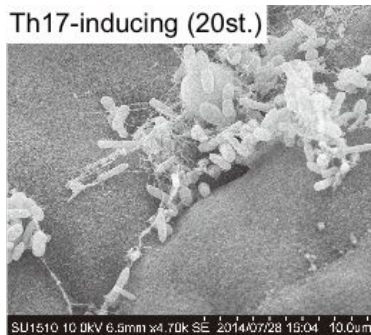


図 4

20 菌株が宿主にどのような刺激を与えているかを特定するため、20 菌株定着マウスの上皮細胞の遺伝子発現を RNA-seq により解析

した。無菌マウスと比較して活性酸素産生に関与する遺伝子の上昇が見られたため、定量 PCR により検証を行った。その結果、Nos2 と Duoxa2 の著明な発現誘導が認められた (図 5)。

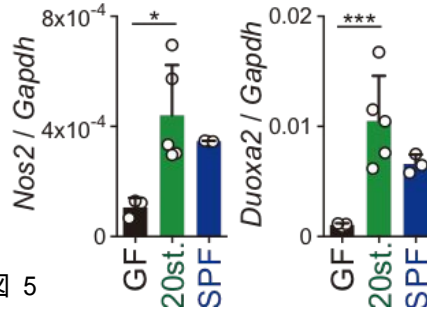


図 5

このことから、20 菌株の上皮細胞への強い接着が上皮細胞での活性酸素の産生を誘導し Th17 細胞の誘導につながっていることが想定された。

(3) 疾患発症におけるヒト由来 Th17 誘導細菌の機能解析

データベースに登録されている潰瘍性大腸炎とクローン病を含む炎症性腸疾患患者 (IBD) 25 名と健常者 84 名の腸内細菌叢のデータを用いて、単離した Th17 細胞誘導 20 菌株の量を解析した。その結果、20 菌株のうち 9 株 (図 6 の赤で囲まれた細菌) が IBD 患者で有意に増加していた (図 6)。一方で有意に健常者で増加していた細菌は 1 株のみであった (図 6 の緑で囲まれた細菌)。残り 10 株は健常者と IBD 患者で有意な差は認められなかった (図 6 の青で囲まれた細菌)。

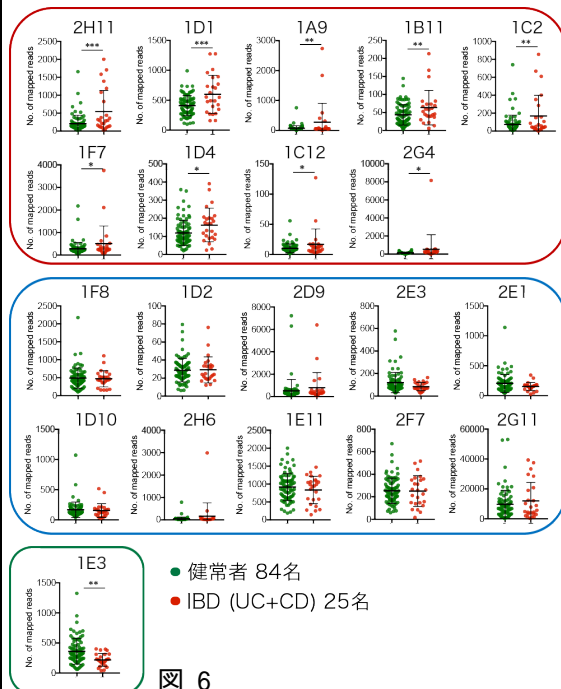


図 6

このことから、IBD 患者で有意に増加していた 9 株については、Th17 細胞の誘導を通して IBD の発症や増悪に関与している可能性が強く示唆された。

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3件)

(1) Kim S, Kim H, Yim YS, Ha S, Atarashi K, Tan TG, Longman RS, Honda K, Littman DR, Choi GB, Huh JR.

Maternal gut bacteria promote neurodevelopmental abnormalities in mouse offspring. *Nature* 549(7673): 528-532. 2017. doi: 10.1038/nature23910. (査読有り)

(2) Jones L, Ho WQ, Ying S, Ramakrishna L, Srinivasan KG, Yurieva M, Ng WP, Subramaniam S, Hamadee NH, Joseph S, Dolpady J, Atarashi K, Honda K, Zolezzi F, Poidinger M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA.

A subpopulation of high IL-21-producing CD4(+) T cells in Peyer's Patches is induced by the microbiota and regulates germinal centers. *Sci Rep.* 6:30784. 2016. doi: 10.1038/srep30784. (査読有り)

(3) Atarashi K*, Tanoue T*, Ando M*, Kamada N*, Nagano Y, Narushima S, Suda W, Imaoka A, Setoyama H, Nagamori T, Ishikawa E, Shima T, Hara T, Kado S, Jinnohara T, Ohno H, Kondo T, Toyooka K, Watanabe E, Yokoyama S, Tokoro S, Mori H, Noguchi Y, Morita H, Ivanov II, Sugiyama T, Nuñez G, Camp JG, Hattori M, Umesaki Y, Honda K.

Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* 163(2): 367-380. 2015. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.058. (査読有り)

〔学会発表〕(計1件)

新幸二

「腸内細菌による宿主免疫系の制御機構」
脳心血管抗加齢研究会 2015 シンポジウム 2
「代謝と老化疾患制御」 2015年

〔図書〕(計3件)

(1) 田之上大, 新幸二, 本田賢也
「【腸内フローラと神経・精神疾患】腸内フローラと免疫 腸内フローラと TH17 細胞(解説/特集)」
Clinical Neuroscience 35 巻 11 号 1290-1292 (2017.11)

(2) 新幸二, 田之上大, 本田賢也
「【生体バリア 粘膜や皮膚を舞台とした健康と疾患のダイナミクス】(第1章)生体バ

リアを支える分子・細胞・組織基盤 常在細菌叢による生物学的バリア 腸内細菌叢による免疫バリア調節機構(解説/特集)」
実験医学 35 巻 7 号 1129-1136 (2017.05)

(3) 田之上大, 新幸二

「腸内細菌による腸管 Th17 細胞の誘導と分化」
臨床免疫・アレルギー科 65 巻 5 号 479-484 (2016.05)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: Compositions and methods for induction of TH17 cells

発明者: Kenya HONDA, Koji ATARASHI, Masahira HATTORI, Hidetoshi MORITA

権利者: Riken, The University Of Tokyo, School Corporation Azabu Veterinary Medicine Educational Institution.

種類: 特許権

番号: W02015156419A1

取得年月日: 2015-10-15

国内外の別: 国際

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.microbiolimmunol.med.keio.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新 幸二 (ATARASHI, Koji)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授
研究者番号: 60546787

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし