

令和元年6月11日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09315

研究課題名(和文) 腸内細菌・発酵産物による制御性T細胞表面結合TGF- β 発現誘導の研究

研究課題名(英文) Induction of the cell surface-bound TGF-beta on the regulatory T cells by enteric bacteria and its fermentation product.

研究代表者

中村 和彦 (Nakamura, Kazuhiko)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：00274449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞(regulatory T cell; Treg)は免疫応答を抑制・制御する作用を有し、炎症性腸疾患や自己免疫疾患の制御に重要である。Tregは細胞表面に免疫抑制性サイトカインであるtransforming growth factor (TGF)- β を発現する。一部の腸内細菌やその発酵産物である酪酸がTregを増加させる。我々は酪酸がTreg細胞表面TGF- β を増加させるかどうかを研究した。

マウスに酪酸・食物繊維含有餌を与えると脾臓CD4⁺ T細胞中のTreg 割合が増加したが、Treg細胞表面TGF- β 発現は増加せず、実験大腸炎は抑制されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酪酸・食物繊維の経口的摂取は炎症性腸疾患や自己免疫疾患制御に重要と考えられるTregの割合を増加させた。Treg細胞表面TGF- β を増加させたり、大腸炎を抑制する効果は確認できなかった。酪酸・食物繊維はTregを増加させる事により健康維持や炎症性疾患予防に有用である可能性は示されたが、既に発症した疾患のコントロールには単独で効果を期待するのは難しく、より強力な免疫抑制療法が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Treg) possess the capability of immunosuppression and are important to control inflammatory bowel disease and other autoimmune diseases. Treg expresses an immunoregulatory cytokine, transforming growth factor (TGF)-beta on its cell surface. Some enteric bacteria and its fermentation product, butyric acid increase Treg. We studied whether butyric acid increases the expression of cell surface-bound TGF-beta on Treg. Feeding mice with food containing butyric acid and dietary fiber increased the percentage of Treg in splenic CD4⁺ T cells but not the expression of cell surface-bound TGF-beta on Treg and did not suppress the experimental colitis.

研究分野：消化器内科

キーワード：炎症性腸疾患 制御性T細胞 腸内細菌 TGF-

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) Treg 細胞表面結合 TGF- β による炎症性腸疾患抑制

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg) は過剰な免疫応答を抑制する代表的な免疫調節性細胞である。Treg を欠損させた実験大腸炎モデルや Treg 分化誘導因子 Foxp3 が欠損したマウス、ヒトで慢性腸管炎症が起こることより Treg は炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease; IBD) 抑制に重要と考えられる。

我々は Treg が

- 1) 免疫抑制性サイトカインである TGF- β を高レベルに産生すること
- 2) 産生された TGF- β は細胞表面に発現する事
- 3) 産生された TGF- β は Treg による大腸炎抑制に重要であること

を報告した^{1,2}。

その後、TGF- β は glycoprotein A repetitions predominant (GARP) を介して Treg の細胞表面に結合する事³、TGF- β /GARP 複合体からの活性型 TGF- β 放出に integrin $\beta 8$ が重要である事⁴が報告され、TGF- β が Treg 細胞表面に結合し活性化されるメカニズムが明らかにされた。

更に、GARP/TGF- β 複合体に対するモノクローナル抗体が Treg の免疫制御機能を阻害する事⁵、integrin $\alpha v \beta 8$ が Treg の IBD モデル抑制に重要である事が報告され⁶、細胞表面結合 TGF- β 活性化調節の治療への応用が期待される。

(2) 腸内細菌による Treg の誘導

近年、腸内細菌叢の構成の乱れと IBD 発症の関連が示されている。また、腸内細菌の中には Treg を誘導するものがあることが発見され、腸内細菌による IBD 制御の可能性が注目されている。

Clostridium や *Bacteroides* により Treg が誘導される^{7,8}。*Clostridium* による Treg 誘導は細菌の発酵産物である酪酸により引き起こされる⁹ ことより、酪酸または酪酸産生菌による IBD 治療の可能性が期待される。しかし、腸内細菌や酪酸により Treg 細胞表面 TGF- β の発現が誘導され、Treg の免疫制御機能が促進されるのかどうかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

腸内細菌・発酵産物により Treg 細胞表面 TGF- β 発現が誘導され Treg 免疫制御機能が促進されるかどうかを明らかにし、IBD 治療への応用が可能かを検討する。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* での酪酸による Treg 誘導能・Treg 細胞表面 TGF- β 誘導能の検討

正常マウスに通常の餌、難消化性食物繊維含有・酪酸非含有餌 (high-amylose maize starches: HAMS)、難消化性食物繊維・酪酸含有餌 (high-amylose maize starches butyrate: HAMS B) を 4 週間給餌し、脾臓、腸管粘膜よりリンパ球を分離した。細胞を抗 CD4 抗体、抗 CD25 抗体、抗 CD45 抗体、抗 Foxp3 抗体、抗 TGF- β (LAP) 抗体で染色しフローサイトメトリーで解析した。

(2) *in vitro* での酪酸による Treg 誘導能・Treg 細胞表面 TGF- β 誘導能の検討

マウス脾細胞より単核球を分離、磁気ビーズを用いて CD4⁺CD25⁺ T 細胞を分離した。分離した細胞を無血清培地にて抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体ビーズ、IL-2 2000U/ml で刺激

した。酪酸無添加、酪酸 0.1mM 添加、酪酸 1mM 添加の 3 条件で 3 日間培養し、細胞を抗 CD4 抗体、抗 CD25 抗体、抗 CD45 抗体、抗 Foxp3 抗体、抗 TGF- β (LAP)抗体で染色しフローサイトメトリーで解析した。

(3) *in vivo* での酪酸による Treg 誘導の腸管炎症抑制効果の検討

正常マウスに HAMS または HAMS B を 4 週間給餌し、その後 1 週間 1.8% dextran sulfate sodium salt (DSS)含有水を自由飲水させ DSS 大腸炎を誘導した。体重を毎日測定し、1 週間の DSS 投与終了後にマウスを安楽死させ、大腸の長さを測定した。また、脾臓、腸管粘膜よりリンパ球を分離した。細胞を抗 CD4 抗体、抗 CD25 抗体、抗 CD45 抗体、抗 Foxp3 抗体、抗 TGF- β (LAP)抗体で染色しフローサイトメトリーで解析した。

4. 研究成果

(1)マウスに普通の餌、食物繊維含有・酪酸非含有餌 (HAMS)、食物繊維含有・酪酸含有餌 (HAMS B) を 4 週間投与後、脾臓 CD4⁺ T 細胞中 CD25⁺Foxp3⁺ Treg の割合を解析したところ、普通餌群 6.54%、HAMS 群 9.0%、HAMS B 群 11.5%であり、食物繊維と酪酸投与により Treg が増加した (図 1)。しかし、Treg 細胞表面の TGF- β 発現レベルは HAMS 群と HAMS B 群間で明らかな差を認めなかった (図 1)。腸管リンパ球では CD4⁺ T 細胞中の Foxp3⁺ Treg の割合は HAMS 群 10.5%、HAMS B 群 10.6%と両群間で明らかな差を認めず、Treg 細胞表面 TGF- β 発現レベルも両群間で差を認めなかった (図 2)。

図1

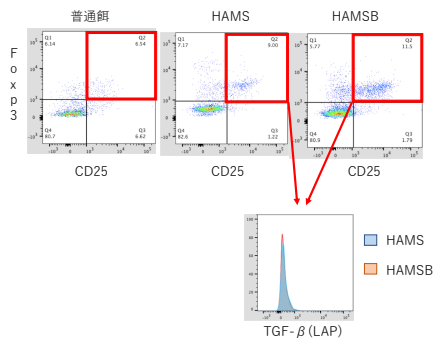
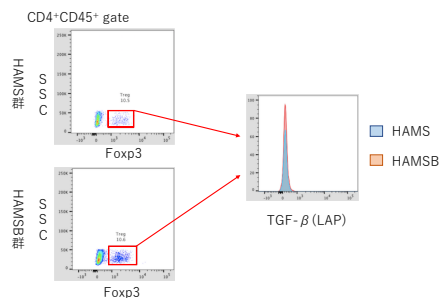
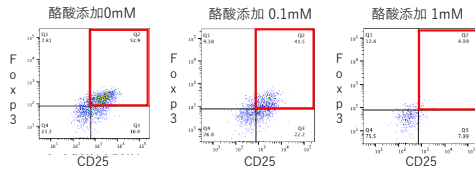


図2



(2)酪酸の *in vitro* での Treg 誘導能を検討した。マウス脾臓リンパ球より分離した Treg を酪酸存在下、非存在下に抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体、IL-2 で 3 日間、*in vitro* で刺激培養し Foxp3⁺CD25⁺細胞の割合を検討したところ、酪酸無添加で 52.9%、酪酸添加 0.1mM で 41.5%、酪酸添加 1mM で 4.1%と酪酸に *in vitro* で Treg 誘導作用を認めなかった (図 3)。

図3



(3)HAMS B 投与による Treg 誘導が腸管炎症を抑制するかどうか検討した。HAMS B または HAMS を 4 週間投与後、DSS 大腸炎を誘導したところ、HAMS B 群では HAMS 群と比較してより高度の体重減少を来し、大腸の長さもより短縮しており、高度の大腸炎を起こしていた (図 4)。DSS 腸炎誘導後の脾細胞では CD4⁺ T 細胞中の Foxp3⁺CD25⁺ Treg 割合が HAMS 群で 14.8%、HAMS B 群で 21.8%と HAMS B 群で増加していたが、Treg 細胞表面の TGF- β 発現レベルは両群間で差を認めなかった (図 5)。同様に腸管リンパ球では、DSS 腸炎誘導後 CD4⁺ T 細胞中の CD25⁺ Treg 割合が HAMS 群で 38.5%、HAMS B 群で 77.8%と HAMS B 群で増加していたが、Treg 細胞表面の TGF- β 発現レベルは両群間で差を認めなかった (図 6)。

図4

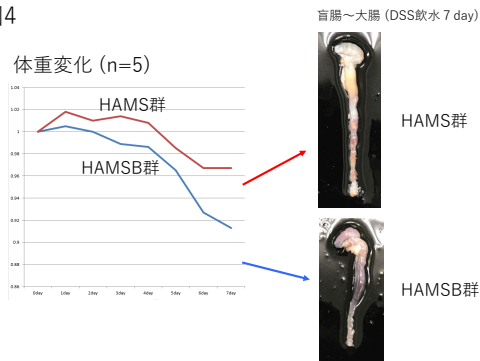


図5

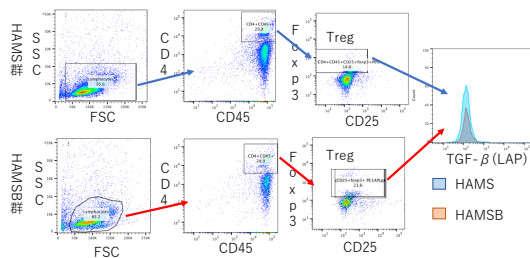
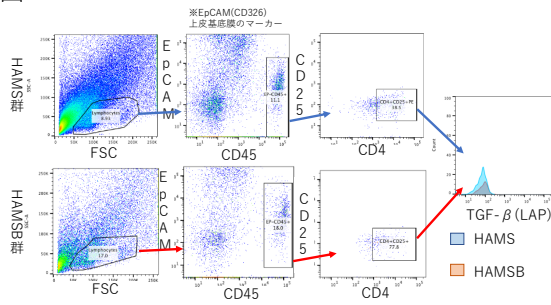


図6



〈引用文献〉

1. Nakamura et al. *Journal of Experimental Medicine* 194: 629, 2001
2. Nakamura et al. *Journal of Immunology* 172: 834, 2004
3. Wang et al. *PNAS* 106: 13439, 2009
4. Edwards et al. *J Immunol* 193:2843, 2014
5. Cuende et al. *Science Translational Medicine* 2015
6. Worthington et al. *Immunity* 42: 903, 2015
7. Atarashi et al. *Science* 331: 337, 2011
8. Round et al. *PNAS* 107: 12204, 2010
9. Furusawa et al. *Nature* 504:446, 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：伊原 栄吉

ローマ字氏名：IHARA, eikichi

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：80612390

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。