

令和元年5月21日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19165

研究課題名(和文)腸管におけるIFN $\gamma$ 産生性CD8T細胞の誘導機構解明研究課題名(英文)Understanding of the mechanism for inducing IFN $\gamma$ -producing CD8T cells in the gut

研究代表者

田之上 大(Tanoue, Takeshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：60732972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において通常環境下で飼育したSPFマウスの腸管にはインターフェロンガンマ(IFN $\gamma$ )を産生するCD8T細胞が多く局在し、それが腸内細菌によって誘導されることを見出した。というのも、IFN $\gamma$ 産生CD8T細胞数は無菌マウスならびに抗生剤投与マウスで著しく少なく、無菌マウスにSPFマウス便の菌叢を定着させると誘導が認められる。また、マウスの飼育施設や同居実験の結果から特定の腸内細菌種がその誘導に関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IFN $\gamma$ 産生CD8T細胞を強く誘導する我々の単離菌カクテルを経口投与すると、CD8T細胞依存的にリステリアモノサイトゲネス感染症の症状が緩和されたことから、IFN $\gamma$ 産生CD8T細胞は病原性微生物感染に対する抵抗性を強めることが示唆された。このことから、腸内常在菌によって誘導されたIFN $\gamma$ 産生CD8T細胞は腸管での微生物感染に対するバリア機能に貢献していることが推察され、同細胞を介した新しい感染症治療法の開発に繋がる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that interferon-gamma; (IFN $\gamma$ )-producing CD8+ T cells were highly abundant in the intestine of specific pathogen-free (SPF) mice and which were driven by microbiota. This is because IFN $\gamma$ +CD8+ T cells were severely depleted in germ-free (GF) mice and SPF mice treated with antibiotics-mixture, and we could see the induction by oral inoculation of GF mice with SPF feces. Specific members of microbiota were corresponded to induce IFN $\gamma$ +CD8+ T cell since the relative abundance of this cell population in SPF mice varied with housing conditions, and co-housing resulted in all mice ultimately displaying a high-frequency phenotype. Using our bacterial isolate which robustly induce IFN $\gamma$ +CD8+ T cells in intestines, repetitive administrations of the mixture enhanced host resistance against *Listeria monocytogenes* infection.

研究分野：腸内細菌学、免疫学

キーワード：Microbiota CD8T

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管には約 1000 種類、およそ 100 兆個の腸内常在菌が生息しており、一種の生態系(腸内フローラ)を形成している。健常時の腸内フローラはそれぞれの細菌数および種類が微妙なバランスに保たれて成立している。近年、そのバランスの破綻が様々な疾患の発症・増悪につながる事が明らかになってきた。

腸内フローラを構成する個々の細菌はそれぞれが異なる様式で宿主に影響している。そのため、腸内フローラの影響を正確に理解し、医療に応用するには、個々の細菌種の生理機能を個別に把握していく必要がある。しかしながら、フローラを構成する細菌種が膨大なこと、および多くが難培養性細菌であることから、実際には病態悪化の原因となる菌種や、逆に病態改善へと繋がる菌種を同定できた例は非常に少ない。逆にいえば、この解明が進めば疾患治療法の開発につながる可能性が大いに期待できる。

そのコンセプトのもと申請者らは、特に消化管に特有な免疫細胞に焦点を当て、それを誘導する腸内常在菌の同定を独自のアプローチを用いて行ってきた。無菌マウスに目的の細菌のみを定着させるノトバイオームマウス作製技術、嫌気チャンバーを用いた難培養性嫌気性細菌の培養技術そして次世代シーケンスを用いた腸内細菌叢解析技術である。特にノトバイオーム技術と嫌気静菌培養技術は、世界的にも申請者らの研究室に priority がある(実際、他の研究者から多数の共同研究提案を受けている)。この技術を用いて、申請者らはマウスから単離したセグメント細菌と呼ばれる腸内常在菌が免疫反応をアクセラートさせる Th17 という免疫細胞を特異的に誘導することを同定した。加えて、つい最近になって、Th17 細胞を誘導するヒトの腸内細菌を世界に先駆けて同定し、その単離培養に成功した。一方で、申請者らは炎症反応にブレーキをかける Treg という免疫細胞にも着目している。実際、マウスから単離した 46 株の Clostridium 属菌およびヒト腸内細菌から単離した 17 菌株の Clostridia 菌が、Treg 細胞を特異的に誘導することを同定した。こうした研究で、炎症制御に関わる個々の細菌コミュニティの生理機能について理解を深めると共に、それが起因となる炎症性腸疾患や自己免疫疾患に対する新規治療法開発の可能性を提供出来たと考えている。

一方で、病原体排除に貢献する腸管 CD8T 細胞についてはその誘導機構が解明されておらず、腸内常在菌の影響が未だ不明である。そのため現在のところ、当該学術分野は実際の腸内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

近年、腸内感染症の治療には様々な抗生剤が利用されてきたが、薬剤耐性細菌の発生・流行が懸念されることから、より安全で効果的な治療方法の開発が社会的急務になっている。そこで本研究では宿主に元来備わっている病原性細菌の排除に寄与する CD8 T 細胞に着目する。すなわち腸管における CD8T 細胞の誘導機構を解明することで腸内感染症に対する新規治療法の開発につながる研究成果を目指す。具体的な目的として、CD8 T 細胞と腸内常在菌との関わりを調べ、感染症に対する寄与を検討する。長期的には、腸内フローラを構成する個々の細菌種が宿主に及ぼす生理機能を明らかにすることで、生体維持機構の理解に努めると共に感染症に対する新規治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

腸内細菌の関与を想定し、腸内細菌叢解析による候補細菌の予測、嫌気培養技術による単離、腸管リンパ球のフローサイトメトリー解析による同定、およびその誘導メカニズムの考察を行い、腸内感染症への臨床応用をマウスモデルを用いて検討する。具体的には、無菌マウスや抗生剤投与マウス、種々のノックアウトマウス等を用いて検討する。感染症については CD8T 細胞による免疫応答が関与することが知られる *Listeria monocytogenes* 感染モデルなどを用いて検討する。

### 4. 研究成果

本研究において通常環境下で飼育した Specific Pathogen Free マウスの腸管にはインターフェロンガンマ (IFN $\gamma$ ) を産生する CD8T 細胞が多く局在することを見出した。そして、それが腸内細菌によって誘導されることを見出した。というのも、IFN $\gamma$  産生 CD8T 細胞数は無菌マウスならびに抗生剤投与マウスで著しく少なく、無菌マウスに SPF マウス便の菌叢を定着させると誘導が認められる。また、飼育施設ごとのマウスを解析したところ、それぞれで IFN $\gamma$  産生 CD8T 細胞数が異なっていた。さらには、それら細胞数が異なるマウスを同一ケージで co-housing した結果、すべてのマウスにおいて多くの IFN $\gamma$  産生 CD8T 細胞数が認められた。また異なるスペクトラムをもつ抗生剤の単剤投与を行った結果、アンピシリンを経口投与したマウスでは IFN $\gamma$  産生 CD8T 細胞数が同じか上昇したのに対し、メトロニダゾールやタイロシンを処理したマウスでは IFN $\gamma$  産生 CD8T 細胞数が減少した。これらの結果から特定の腸内細菌種がその誘導に関与することが明らかとなった。

我々は独自に単離・同定した IFN $\gamma$  産生 CD8T 細胞を強く誘導する菌株カクテルを用いてその誘導機構の詳細を検討した。たとえば、MyD88Trif、IRF9、IL18、IL1R ノックアウトマウスに定着させたところ十分な IFN $\gamma$  産生 CD8T 細胞誘導が認められなかった。この結果から、細菌の病原

体関連分子パターンを介したシグナルは関与しないことが示唆された。加えて、死菌の経口投与は IFN 産生 CD8T 細胞を誘導しないことが分かった。これらの結果から、菌株カクテルは生菌状態で産生する代謝産物を介して IFN 産生 CD8T 細胞を誘導する事が強く示唆された。また、BATF3 や IRF4 ノックアウトマウスなどの特定の樹状細胞が欠損したマウスでは菌株カクテルによる誘導が認められなかったことから、ある特定の樹状細胞を介することが分かった。

IFN 産生 CD8T 細胞を強く誘導する我々が新規に単離した単離菌カクテルを経口投与すると、CD8T 細胞依存的にリステリアモノサイトゲネス感染症の症状が緩和された。実際、体重減少、大腸組織病変などの症状が緩和された。また、complex な microbiota が定着したマウスへの単離菌カクテルの経口投与もまたその症状を緩和した。実際、体内侵入性の *Listeria monocytogenes* 株および非侵入性株のそれぞれについて検証したが、両株ともに対して症状抑制効果を認めた。実際、単離菌株カクテルを予め投与したマウスでは、*Listeria monocytogenes* の体内での増殖が抑制されていた。また、この単離菌株による改善効果には腸管における抗原特異的な CD8T 細胞の集積増強を伴っていた。さらに、これらの症状緩和効果は抗 CD8 中和抗体の投与でブロックされたことからこれらの感染症抵抗性を強める効果が CD8T 細胞を介することが示唆された。これらの結果から IFN 産生 CD8T 細胞は病原性微生物感染に対する抵抗性を強めることが示唆された。このことから、腸内常在菌によって誘導された IFN 産生 CD8T 細胞は腸管での微生物感染に対するバリア機能に貢献していることが推察され、同細胞を介した新しい感染症治療法の開発に繋がる可能性が考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件、全て査読有り)

Tanoue T\*, Morita S\*, Plichta DR, Skelly AN, Suda W, Sugiura Y, Narushima S, Vlamakis H, Motoo I, Sugita K, Shiota A, Takeshita K, Yasuma-Mitobe K, Riethmacher D, Kaisho T, Norman JM, Mucida D, Suematsu M, Yaguchi T, Bucci V, Inoue T, Kawakami Y, Ollie B, Roberts B, Hattori M, Xavier RJ, Atarashi K, Honda K. "A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity." *Nature*. 565: 600-605. 2019 doi: 10.1038/s41586-019-0878-z. (\*These authors contributed equally to this work.)

Stein RR\*, Tanoue T\*, Szabady RL, Bhattarai SK, Ollie B, Norman JM, Suda W, Oshima K, Hattori M, Gerber GK, Sander C, Honda K, Bucci V. "Computer-guided design of optimal microbial consortia for immune system modulation." *Elife*. 7: e30916. doi: 10.7554/eLife.30916. 2018. (\*These authors contributed equally to this work.)

Atarashi K, Suda W, Luo C, Kawaguchi T, Motoo I, Narushima S, Kiguchi Y, Yasuma K, Watanabe E, Tanoue T, Thaïss CA, Sato M, Toyooka K, Said HS, Yamagami H, Rice SA, Gevers D, Johnson RC, Segre JA, Chen K, Kolls JK, Elinav E, Morita H, Xavier RJ, Hattori M, Honda K. "Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives T(H)1 cell induction and inflammation." *Science*. 358: 359-365. 2017.

Chai JN, Peng Y, Rengarajan S, Solomon BD, Ai TL, Shen Z, Perry JSA, Knoop KA, Tanoue T, Narushima S, Honda K, Elson CO, Newberry RD, Stappenbeck TS, Kau AL, Peterson DA, Fox JG, Hsieh CS. "Helicobacter species are potent drivers of colonic T cell responses in homeostasis and inflammation." *Science Immunology*. 2: eaal5068. 2017.

〔学会発表〕(計 2 件)

Takeshi TANOUÉ, Ashwin SKELLY, Satoru MORITA, Seiko NARUSHIMA, Koji ATARASHI, Kenya HONDA "Induction of IFN  $\gamma$ -producing CD8 T cells by human derived commensal bacteria" 第 47 回日本免疫学会学術集会, 2018 年

Takeshi TANOUÉ, Koji ATARASHI, Kenya HONDA "Commensal bacteria that can induce CD8 T cells and cancer immunity." 第 77 回日本癌学会学術総会 シンポジウム S3-4, 2018 年 (招待講演)

〔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〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：須田互  
ローマ字氏名：SUDA, Wataru

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。