

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380073

研究課題名(和文)腸管特有の免疫担当細胞の微生物認識・応答機構の解明と免疫機能食品への応用

研究課題名(英文)Elucidation of recognition and response of intestinal immune cells to microbes in relation to development of immunomodulating functional foods

研究代表者

八村 敏志 (HACHIMURA, SATOSHI)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40238019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：新規免疫機能食品の開発に向けて、腸管特有の免疫担当細胞の微生物認識、応答機構について解析した。まず腸管の免疫組織であるパイエル板の樹状細胞について、複数の微生物成分で刺激された際の応答抑制について明らかにした。また、CD3-IL-2R+細胞のインフルエンザ感染に対する応答特性を解析した。また、食物アレルギーの抑制機構である経口免疫寛容における制御性低応答化T細胞について、その遺伝子発現等について解析した。さらにノトバイオームマウスを用い、BacteroidesのIgA誘導機構等について明らかにした。本研究の結果から、腸管免疫担当細胞を作用点とする食品素材による免疫機能食品への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to elucidate the functions of intestinal immune cells, focusing on their responses to microbes and microbial components, in relation to development of novel immunomodulating functional foods. We examined the suppressive response of Peyer's patch dendritic cells to multiple TLR stimulation. We analyzed CD3-IL-2R+ cells, and found that they were also present in the lungs, and that they responded to influenza virus infection. We also examined gene expression of regulatory T cells induced in oral tolerance. Furthermore, we examined the mechanism of IgA induction by Bacteroides.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：腸管免疫系 腸内共生菌 機能性食品 IgA抗体 TLR 制御性T細胞 樹状細胞 経口免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

近年、食品成分が免疫系に作用することが示され、これらを利用した新規機能性食品の開発が期待されている。腸管には最大級の免疫系が存在し、食品成分の作用をうけるのはこの腸管免疫系である。この腸管には独特の性質を有する特有の細胞が存在することが申請者を含めた最新の研究で明らかになってきた。申請者らはこれまでに (1) 感染防御を担う B 細胞の IgA 抗体産生、および腸管を介した食品タンパク質に対する免疫抑制機構「経口免疫寛容」いずれも制御できる腸管樹状細胞 (2) IgA 抗体産生を増強する CD3⁻IL-2R⁺細胞 (3) 経口免疫寛容に関わる制御性低応答化 T 細胞を研究対象として新知見を得てきた。

2. 研究の目的

本研究では申請者らがこれまでに研究を進めてきた樹状細胞、CD3⁻IL-2R⁺細胞、制御性低応答化 T 細胞等、腸管特有の免疫担当細胞の応答性について明らかにし、これら細胞群を新たな作用点とした新規免疫機能食品の開発につながる基盤研究を行うことを目的とした。

この際に特に注目するのが、微生物認識・応答機構である。これらの腸管免疫担当細胞は、Toll 様受容体 (TLR) をはじめとした微生物成分のレセプター群 (パターン認識レセプター) を介して微生物刺激により調節されることが明らかになりつつある。まず病原微生物を認識し、感染防御にはたらくと考えられる。また腸内には、 10^{13} - 10^{14} の腸内共生細菌が生息しており、これらが免疫系の正常な発達、生体の恒常性に重要であることが明らかになってきている。このような腸管免疫担当細胞の微生物認識・応答機構の解明は、プロバイオティクス、プレバイオティクスをはじめ、上記腸管免疫担当細胞機能を増強する食品成分による免疫機能食品への応用が期待される。そこで、本研究では、腸管特有の免疫担当細胞の微生物成分、腸内共生細菌、病原微生物に対する応答性について検討した上、これをもとに腸管免疫担当細胞を活性化できる食品素材を探索する。

3. 研究の方法

(1) 腸管樹状細胞の解析

BALB/c マウスのパイエル板樹状細胞を分離し、各種 TLR リガンドあるいは腸内共生菌の菌体で刺激し、免疫関連の遺伝子発現を RT-PCR で解析した。

(2) 腸管 CD3⁻IL-2R⁺細胞の解析

腸管・肺においての CD3⁻IL-2R⁺細胞の存在についてフローサイトメトリーで比較解析した。インフルエンザ感染後についても検討した。また、免疫組織染色を用いて、B 細胞を含め、局在性について検討した。

(3) 経口免疫寛容における制御性低応答化 T 細胞の解析

卵白食摂取させることによりアレルギー症状を呈する卵白アルブミン (OVA) 特異的 TCR トランスジェニックマウス RAG2^{-/-}OVA23-3 の Foxp3 発現を検討した。本マウスの CD4⁺T 細胞の培養上清を Foxp3 誘導評価系にて解析した。一方、OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウス D011.10 は、OVA 含有水の摂取により経口免疫寛容が誘導されるが、本マウスに OVA を経口摂取させ、CD62L^{high/int}CD44^{int}T 細胞と CD62L^{low}CD44^{high}T 細胞を蛍光セルソーターにより精製し、これら 2 種類の制御性低応答化 T 細胞の遺伝子発現を検討した。

(4) 腸内共生菌を定着させたノトパイオートマウスの解析

Bacteroides あるいは *Lactobacillus* を無菌マウスに定着させたノトパイオートマウスにおいて、腸管における IgA 抗体産生を解析した。また、制御性 T 細胞の誘導についても検討した。

4. 研究成果

(1) 腸管樹状細胞の解析

腸管パイエル板の樹状細胞において、TLR2 のモデルリガンドであるリポペプチド Pam₃CSK₄、リポタイコ酸による刺激が、CpG オリゴ DNA 刺激による TLR9 を介した応答を抑制する可能性があることが示された。さらに、TLR5 を刺激するフラジェリンが、他の TLR リガンドに対する応答を抑制することが明らかになった。また、異なる腸内共生菌の刺激により、樹状細胞の免疫関連遺伝子の発現パターンが異なることが確認された。腸間膜リンパ節樹状細胞のうち CD11b⁻CD103⁺PD-L1⁺ 樹状細胞が制御性 T 細胞のマスターレギュレーター Foxp3 の発現を誘導することを見出していたが、さらに無菌マウスではこの樹状細胞サブセットの割合が減少していることを明らかにし、腸内共生菌からの作用を受けて腸間膜リンパ節に遊走していることが示唆された。

(2) CD3⁻IL-2R⁺細胞の解析

CD3⁻IL-2R⁺細胞が肺にも存在することが明らかとなり、インフルエンザ感染により細胞表面分子の発現が変化することが示された。またウイルス感染部位において、IgA 産生細胞の多くが、IL-2R⁺細胞の近傍領域に存在していることを見出した。

(3) 経口免疫寛容において誘導される制御性低応答化 T 細胞の解析

RAG2-/-OVA 23-3 マウスにおいて、卵白食摂取によるアレルギー発症時に、T細胞の産生するIL-4によりFoxp3発現制御性T細胞の誘導が抑制されていることが示唆された。

また、経口免疫寛容状態において誘導されるCD62L^{high/int}CD44^{int}T細胞、CD62L^{low}CD44^{high}T細胞では、T細胞の低応答化に関連する*Egr2*および*Grail*の発現が増加しており、これら因子の発現を介して低応答化していることが示唆された。また、これらの細胞群は、無菌マウスで減少しており、腸内共生菌がその誘導、機能発現に関わることが示唆された

(4) ノトバイオームマウスを用いた腸内共生菌による腸管免疫応答制御の解析

腸内共生菌の優勢菌である*Bacteroides*を無菌マウスに定着させたノトバイオームマウスにおいて、腸管粘膜でのIgA抗体産生が誘導される機構の一つとして、大腸部位の腸管関連リンパ組織（盲腸リンパ節・結腸リンパ節）において胚中心の形成が*Bacteroides*の定着によって認められることで、活性化B細胞のリンパ組織への集積が起こることが示唆された。また、結腸リンパ節におけるIgA産生が活性化されたことから、腸内共生菌が直接大腸免疫系の免疫応答に作用していることが示唆された。一方で*Lactobacillus*を単独定着させたノトバイオームマウスにおいて、制御性T細胞の割合が高い傾向が認められた。

(5) 腸管免疫担当細胞を活性化できる食品素材の探索

乳酸菌、多糖をマウスに経口投与する実験において、これら食品素材が腸管樹状細胞に作用し、IgA抗体産生を増強しうることを示す結果を得た。

(6) まとめ

本研究により、腸管特有の免疫担当細胞の微生物成分、腸内共生細菌、病原微生物、および食品素材に対する応答性に関して新たな知見を得ることができた。これらの成果は、これら細胞群を新たな作用点とした新規免疫機能食品の開発につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計17件)

Park, J., Miyakawa, T., Shiokawa, A., Nakajima-Adachi, H., Tanokura, M., Hachimura, S. Attenuation of migration properties of CD4⁺ T cells from aged mice correlates with decrease in chemokine receptor expression, response to retinoic acid and RALDH expression compared to young mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press, 2014, 査読有.

Kikuchi, Y., Kunitoh-Asari, A., Hayakawa, K., Imai, S., Kasuya, K., Abe, K., Adachi, Y., Fukudome, S., Takahashi, Y., Hachimura, S. Oral Administration of *Lactobacillus plantarum* Strain AYA Enhances IgA Secretion and Provides Survival Protection against Influenza Virus Infection in Mice. *PLoS ONE* 9, e86416, 2014, 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pone.00864

Tanioka, A., Tanabe, K., Hosono, A., Kawakami, H., Kaminogawa, S., Tsubaki, K., Hachimura, S. Enhancement of intestinal immune function in mice by β -D-glucan from *aureobasidium pullulans* ADK-34. *Scand. J. Immunol.* 78, 61-8, 2013, 査読有.
DOI: 10.1111/sji.12067

Kaji, T., Furukawa, K., Ishige, A., Toyokura, I., Takahashi, Y., Shimoda, M., Takemori, T. Both unmutated and mutated memory B cells accumulate mutations and renew antibody repertoire optimally adopted to antigen upon re-exposure. *Int. Immunol.* 25, 683-695, 2013, 査読有.
DOI: 10.1093/intimm/dxt030

Takemori, T., Kaji, T., Takahashi, Y., Shimoda, M., Rajewsky, K. Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *Eur. J. Immunol.*, 44, 1258-1264, 2014, 査読無.
DOI: 10.1002/eji.201343716.

Ato, M., Takahashi, Y., Fujii, H., Hashimoto, S., Kaji, T., Itamura, S., Horiuchi, Y., Arakawa, Y., Tashiro, M., Takemori, T. Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon-alpha-dependent apoptosis. *Vaccine* 31, 2184-2190, 2013, 査読有.
DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.02.016.

Yanagibashi, T., Hosono, A., Oyama, A., Tsuda, M., Suzuki, A., Hachimura, S., Takahashi, Y., Momose, Y., Itoh, K., Hirayama, K., Takahashi, K., Kaminogawa, S. IgA production in the large intestine

is modulated by a different mechanism than in the small intestine:

Bacteroides acidifaciens promotes IgA production in the large intestine by inducing germinal center formation and increasing the number of IgA⁺ B cells. Immunobiology 218, 645-651, 2013, 査読有.

DOI: 10.1016/j.imbio.2012.07.033.

Kaji, T., Ishige, A., Hikida, M., Taka, J., Hijikata, A., Kubo, M., Nagashima, T., Takahashi, Y., Kurosaki, T., Okada, M., Ohara, O., Rajewsky, K., Takemori, T. Distinct cellular pathways select germ-line encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. J. Exp. Med. 209, 2079-2097, 2012, 査読有.

DOI: 10.1084/jem.20120127

八村敏志. 腸管における IgA 産生と CD3⁺IL-2R⁺細胞. 臨床免疫・アレルギー科 58, 387-390, 2012, 査読無.

八村敏志. 腸管自然免疫系と腸内細菌. 臨床栄養 120, 685-685-688, 査読無.

Onodera, T., Takahashi, Y., Yokoi, Y., Ato, M., Kodama, Y., Hachimura, S., Kurosaki, T., Kobayashi, K. Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 109, 2485-2490, 2012, 査読有.

DOI: 10.1073/pnas.1115369109.

Kunii, J., Takahashi, K., Kasakura, K., Tsuda, M., Nakano, K., Hosono, A., Kaminogawa, S. Commensal bacteria promote migration of mast cells into the intestine. Immunobiology 216, 692-697, 2011, 査読有.

DOI:10.1016/j.imbio.2010.10.007.

Sugi, Y., Takahashi, K., Nakano, K., Hosono, A., Kaminogawa, S. Transcription of the Tollip gene is elevated in intestinal epithelial cells through impaired O-GlcNAcylation-dependent nuclear translocation of the negative regulator E1f-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 412, 704-709, 2011, 査読有.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.08.035.

Takahashi, K., Sugi, Y., Nakano, K., Tsuda, M., Kurihara, K., Hosono, A., Kaminogawa, S. Epigenetic control of

the host gene by commensal bacteria in large intestinal epithelial cells. J. Biol. Chem. 286, 35755-35762, 2011, 査読有.

DOI: 10.1074/jbc.M111.271007.

Shimizu, M., Hachimura, S. Gut as a target for functional food. Trend. Food Sci. Technol. 22, 646-650, 2011, 査読無.

DOI:

10.1016/j.tifs.2011.06.002.

高橋宜聖, 小野寺大志, 小林和夫. ウイルス感染局所における記憶B細胞応答. 実験医学増刊 29, 81-86, 2011, 査読無.

[学会発表](計17件)

八村敏志, 田之倉優. 加齢による免疫機能変化と食品による調節. 日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 30 日, 明治大学(神奈川).

芝原恭子ら. 経口免疫寛容において誘導される CD62L^{high/int}CD44^{int} および CD62L^{low}CD44^{high/T} 細胞の機能解析. 日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 28 日, 明治大学(神奈川).

八村敏志. 腸内細菌による腸管免疫細胞の制御: アレルギー抑制に関連して. 第 17 回日本病態栄養学会年次学術集会 2014 年 1 月 12 日, 大阪国際会議場(大阪)

KOTAKI Ryutaro ら. Suppression of TLR9-induced response by TLR2 pathway in Peyer's patch dendritic cells. 第 42 回日本免疫学会学術集会 2013 年 12 月 12 日, 幕張メッセ(千葉).

上滝隆太郎ら. 複数の TLR 刺激を受けたパイエル板樹状細胞における応答抑制の解析. 日本農芸化学会 2013 年度大会 2011 年 3 月 25 日, 東北大学(宮城).

横井勇祐ら. 粘膜組織に存在する IgA 産生促進 CD3-IL-2R⁺細胞のユニークな性状. 日本農芸化学会 2012 年度大会 2012 年 3 月 24 日, 京都女子大学(京都).

石井俊祐ら. 腸内共生菌の IgA 産生に関わる免疫担当細胞に対する作用. 日本食品免疫学会 2011 年度大会 2011 年 10 月 18 日, 東京大学(東京).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八村 敏志 (HACHIMURA, Satoshi)
東京大学・農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：40238019

(2) 研究分担者

中山 二郎 (NAKAYAMA, Jiro)
九州大学・農学研究院・准教授
研究者番号：40217930

高橋 宜聖 (TAKAHASHI, Yoshimasa)
国立感染症研究所・免疫部・室長
研究者番号：60311403

細野 朗 (HOSONO, Akira)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：70328706

(3) 研究協力者

足立 (中嶋) はるよ (NAKAJIMA-ADACHI, Haruyo)
東京大学・農学生命科学研究科・特任研究員
研究者番号：20595962