

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590563

研究課題名(和文)腸内細菌による抑制性T細胞の誘導機構と必要抗原の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the roles of regulatory T cells in symbiosis with commensal bacteria

研究代表者

西尾 純子(Nishio, Junko)

東京大学・生産技術研究所・特任助教

研究者番号：40598679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：病原体排除のために進化してきた免疫システムでは、同時に自己組織には免疫反応が生じない機構(自己免疫寛容)が存在する。一方、共生する腸内細菌は非自己にも関わらず免疫による排除がないことから、腸内細菌に対する免疫寛容が作用している。

免疫細胞の活性化を制御する抑制性T細胞(Treg)は、腸管に多数存在する。腸管のTregが共生常在菌に対する免疫寛容への貢献のしかたや分化機構は不明であった。本研究では、T細胞の種類が少ないマウスを用い、腸管Treg細胞が腸内細菌抗原により分化し、樹状細胞の活性化の抑制を介したエフェクターT細胞活性化の抑制により腸内細菌に対する免疫寛容が確立していることを証明した。

研究成果の概要(英文)：Immune system, which has been evolved to exclude pathogens, also has various mechanisms of avoidance of reaction to self tissue, which is called self-tolerance. Although intestinal immune cells continuously stimulated by intestinal commensal microbiota (CM), strong immune response to eradicate CM never occurs, suggesting intestinal mucosa bear very specific mechanisms of immune tolerance to CM.

Regulatory T cells (Tregs), which play a critical role in maintenance of self-tolerance by regulating immune cell activation, are known to be accumulated in the intestinal mucosa. However, it has been remained unclear how these cells are significant and are differentiated in steady state intestinal mucosa. By using a mouse model mouse bearing limited repertoire of TCR, we demonstrated that CB-derived antigens are important for differentiation of Tregs in the intestine and these Tregs contribute to intestinal homeostasis via suppressing DC activation which results in effector T cell activation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫

キーワード：腸管粘膜 抑制性T細胞 免疫寛容 Helios

1. 研究開始当初の背景

抑制性T細胞(regulatory T cell : Treg細胞)は、免疫反応を多岐に制御するT細胞である。Tregの重要な役割の一つは、自己に対する免疫を抑えること(免疫寛容)である。Treg細胞欠損マウスは全身性の細胞浸潤を来し短命であることが示すように、Treg細胞が自己免疫性疾患や炎症性疾患の発症に大きく関与していることは明らかである^{1) 2) 3)}。一方、Treg細胞を増やすことで、これらの疾患の予防や治療ができる⁴⁾。

腸粘膜固有層では、末梢リンパ組織に比べTregが多く存在する。それらは腸内細菌や食餌由来の抗原によりナイーブT細胞がTregに分化した induced Treg (iTreg細胞)であり、腸管での防御機構の一つと推測されているが、実証されていない。また細菌由来抗原の刺激が関わっているかについても不明である。近年、無菌マウス腸管に定着した、正常常在菌の一つであるクロストリジウムが、大腸固有粘膜層にTregを蓄積させ、炎症性腸疾患や全身的な免疫反応を抑制する現象が発見された^{5) 6)}。大腸固有粘膜層に増加するTreg細胞には、転写因子 Helios が陰性Treg細胞(H-Treg細胞)が多いことが最近報告された。H-Treg細胞が、末梢でのiTreg細胞であることが示唆されていることから⁷⁾、正常常在菌由来抗原が、iTreg細胞の誘導に関与している可能性が予測される。しかし、どのような機構で、すなわち腸内細菌抗原特異的な反応により、あるいは、常在菌定着による腸管粘膜の微少環境に反応してTreg細胞が蓄積するのか、また、Treg細胞が他の腸管細胞にどのように作用して、“腸内常在菌に対する免疫寛容”を実現させているのかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

我々は、予備実験段階でTCRレパトワの多様性が限られた”Limitedマウス”に、iTreg細胞が著しく減少していることを発見した。本研究課題では、このマウスの解析を通して大腸粘膜内Treg細胞の分化・機能について行った。

3. 研究の方法

マウス Vβ5 Limitedマウス(Immunity 2001)とTCRαノックアウトマウスは、Harvard Medical SchoolのDiane Mathis・Christophe Benoist研究室より、Foxp3^{hCD2}レポーターマウスは、理化学研究所の堀昌平研究室よりそれぞれ分与していただき、当研究所のマウス

施設にて維持した。Vβ8 Limitedマウスは、93Vboj TCRαトランスジェニックマウス(Jaxon Laboratoryより購入)と、Vb5 Limitedマウスを交配させ、作製した。

フローサイトメトリー解析 細片にした脾臓及び末梢リンパ節は、collagenase D、DNaseIを含有した4%FBS/RPMI1640中で、37°Cにて15分間振とう後、洗浄し、ストレイナーを通した。大腸は、摘出後切り開きPBS中で糞便を除去し、5mM/EDTA中で37°Cにて20分間振とうした。その後、PBS中で上皮を除去した。さらに、collagenase D、DNaseIにて、37°Cにて30分間振とう後、洗浄、その後40%及び80%パーコールにて比重分離を行い、血球細胞を採取した。

これらの細胞を、各表面マーカー特異的な抗体で染色した。細胞内染色には、Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set Kit (eBioscience)に従い各特異的な抗体で染色した。染色後の細胞は、BD LSR Fortessa フローサイトメーターで解析した。

混合骨髄移植 レシピエントマウスには、5.5GyのX線照射を3時間間隔にて2回行った4-6週齢のTCRαノックアウトマウスあるいはB6(CD45.1)コンジェニックマウスを用いた。ドナーマウスには、Vβ5 Limitedマウス(CD45.2)とB6(CD45.1)マウス骨髄細胞を採取し、 5×10^6 /mlずつ移植後、8-10週後に解析した。

細胞移入 Foxp3^{hCD2}レポーターマウスの脾臓及び末梢リンパ節より採取した血球細胞から、セルソーターにてhCD2+CD4+細胞を採取し、ドナーの6週齢のVβ5 Limitedマウスに輸注した。16週齢まで、体重、下痢の有無、脱肛の有無をモニターした。

定量的 RT PCR 大腸組織、及び脾臓組織を、RNA iso Plus(タカラバイオ)中に入れ、ホモジナイズ後、製品のプロトコールに従いRNAを抽出後、total RNA10ug分をテンプレートとして、PrimeScript[®] 1st strand cDNA Synthesis Kit(タカラバイオ)によりcDNA合成を行い、LightCycler[®] 480 SYBR Green システムにて、定量的 RT PCR を行った。

4. 研究成果

(1) TCRレパトワの多様性が限られている Limitedマウスでは、週齢を重ねるに従い腸管恒常性維持が破綻する。

前述ように、TCRレパトワの多様性が限られた”Limitedマウス(Vβ5 Limitedマウス)“は、意外にもH⁺Treg細胞が著しく減少しているマウスであることが判明し(図1a)。興味深いことに、Limitedマウスは10週齢以降より腸炎を自然発症する。従って、TCRレパトワの多様性が限られたLimitedマウスは、H⁺Treg細胞の生理的状況下での機能解析に格好のマウスであることが判明し、本研究はこのLimitedマウスを用いて、H⁺Treg細胞の分化や機能を解析する研究へと移行させることとした。Limitedマウスの観察結果より、TCRレパトワが限られた状況で、H⁺Treg細胞の欠損を来すことから、H⁺Treg細胞分化に際してのTCRレパトワ多様性の重要性が示唆された。Limitedマウスは、T細胞受容体(TCR) トランスジェニックマウスであることから、特定のHelios-Treg細胞の欠失がトランスジェニックTCR特異的に起きている可能性があったため、同様にTCRレパトワの多様性が限られた別

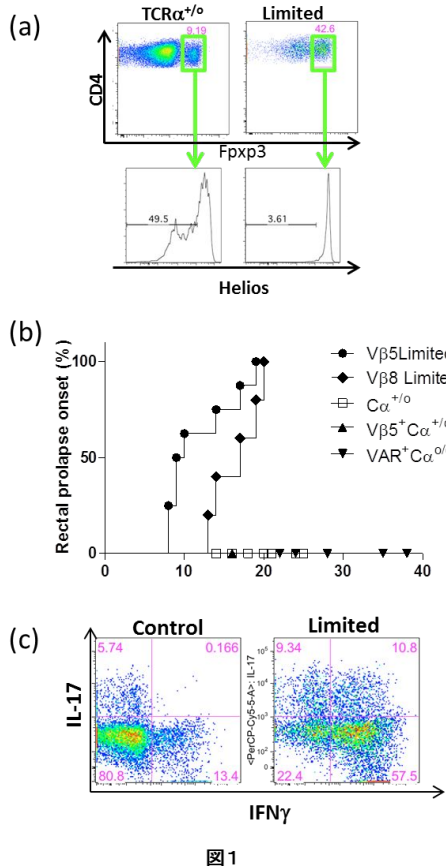


図1

のマウス、”Vβ8 Limitedマウス“を作製したところ、前者のVβ5 Limitedマウスと同様に、大腸炎を発症することが観察された。腸管粘膜免疫細胞の、フローサイトメトリー解析の結果から、両者のマウスでTh17細胞の割合が多く、中でも、IFNγ⁺IL-17⁺細胞が増加していた(図1b)。また、

炎症性サイトカインである、TNFα、IL-1βが上昇している(図1c)ことから、Limitedマウスにおける腸炎は、炎症性腸疾患における炎症と類似していることがわかった。特に、IFNγ陽性Th17細胞は、マウス腸炎でもヒト腸炎でも、pathogenicに作用するT細胞として知られていることから⁸⁾、TCRレパトワが限られていることにより、腸管の恒常性が破綻し、炎症性腸疾患様の病態が発症したと考えられた。

(2) 腸内細菌を広域にカバーする混合抗生剤の投与により、Limitedマウス腸管のTh17細胞による炎症は抑制される。

腸内細菌叢の構成の違いにより、Dextran sodium sulfate 誘導性腸炎の感受性が増したり、ヒトの炎症性腸疾患患者の腸内細菌叢の構成が健常人と比し特徴があることが近年報告されたことから、Limitedマウスで、腸内細菌叢に変化が生じるかを、腸管内容物の抽出DNAより、bacterial 16S ribosomal DNAプローブを用い、Bacteroides、Clostridium ClusterIV、Clostridium ClusterXIVa、Lactobacillus、Enterobacteriaceae、Bifidobacterium、Segmented filamentous bacteriaについて定量を行なった(図2)。その結果、Limitedマウスと野生型マウスで差はないことから、TCRレパトワの多様性が限られることで、腸内細菌叢に変化を来さず、Limitedマウスで見られる恒常性の破綻は腸内細菌叢に変化によるものではないと考えられた。しかし、図3に

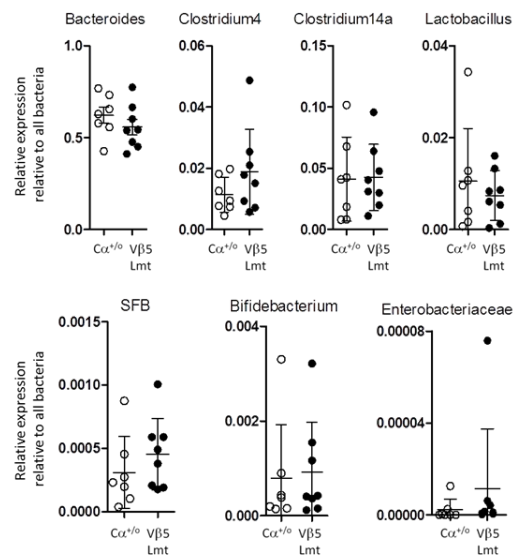


図2

示すように、コントロール及びLimitedマウスに、腸内細菌の大部分を除去する4種の抗生剤(アンピシリン、ネオマイシン、バンコマイシン、メロニダゾール)を投与したところ、IFNγ⁺Th17細胞

は低下し、抗生剤を飲ませないコントロールマウスとほぼ同程度になることから、TCRレパトワの多様性が低下することにより、正常の腸内細菌叢に対する、免疫寛容が破綻して

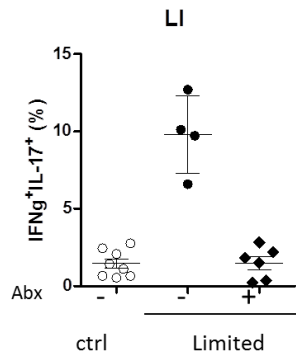


図3

いるために腸炎が起こると考えられた。

(3) 多様性が十分にある Treg 細胞の移入により Limited マウスの腸炎発症は抑制された。

さらに、Limited マウスの腸炎は、TCR のレパトワの多様性が十分にある WT の Treg 細胞を移入することにより、発症を抑えることができた(図 4a)、粘膜固有層の Th17 産生も、正常化し(図 4b)、Treg 細胞中の、H⁺Treg 細胞の割合は有為に増加していた(図 4c)。以上から、H⁺Treg 細胞は腸管恒常性維持に貢献しており、しかもその分化には、多様な TCR レパトワが必要なことが強く示唆される結果をえた。

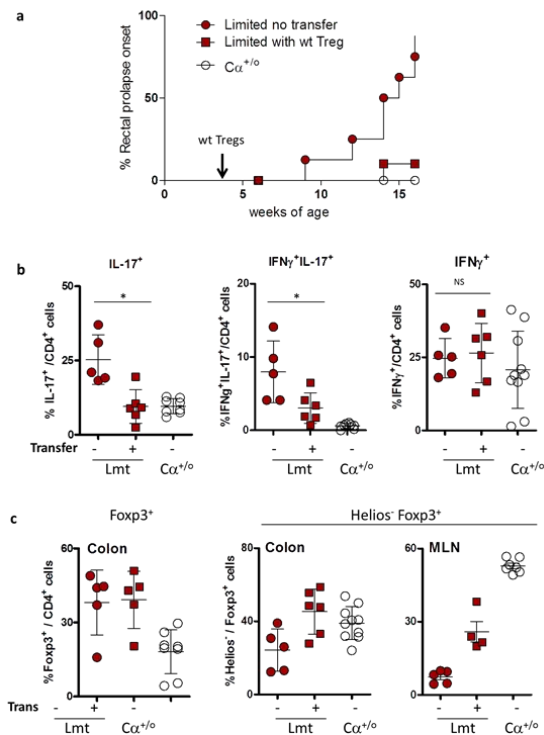


図4

(4) まとめ

TCR レパトワの多様性が限られている Limited マウスでは、1個体のマウスが持つ TCR の種類

が野生型に比べ 1/1000 程度のレベルで少ない。そのようなマウスでは、Th17 細胞による炎症を主軸とする腸炎を自然発症することを本研究で発見した。この Th17 細胞による炎症は、抗生物質投与によりほぼ消失することから、TCR のレパトワの多様性の低下により、腸内細菌との共生に障害があると考えられた。

一方で、Limited マウスの腸管粘膜 Treg 細胞の Helios⁻Treg 細胞分画が減少していること、Limited マウスの腸炎は TCR レパトワの多様性が十分である野生型の Treg 細胞を移入することで抑制されることから、TCR レパトワの多様性の低下が、腸管粘膜固有層における Treg 細胞の分化あるいは活性化に障害があることを示している。トランスクリプション因子である Helios 分子については、近年、胸腺で分化した Treg 細胞(thymic Treg 細胞; tTreg 細胞)のマーカーであることを示唆する報告があり(7) Helios 陰性 Treg 細胞が、末梢で誘導される Treg 細胞(induced Treg 細胞; iTreg 細胞)ではないかと推測されているため、Helios⁻Treg 細胞は注目を浴びている分子である。しかし、その後、それらの報告に反する結果も報告されており“Helios 陰性 Treg 細胞が、末梢で誘導される iTreg 細胞である”という見解は、現段階では議論の余地がある。Helios⁻Treg 細胞が、腸内細菌存在下の腸管粘膜で特異的に蓄積していることはすでに報告されているが⁵⁾⁶⁾、Helios⁻Treg 細胞が腸内細菌との共生においてどのような機能を持つか、また、どのように分化するのかはよく解明されていない。このような視点から、本研究で得られた TCR の多様性を欠くマウスにおいて腸内細菌との共生に障害があり、そのメカニズムとして、Helios 陰性 Treg 細胞の分化障害による可能性が示唆される結果を得た点で大変意義深い。さらに、TCR 多様性の低下により Treg 細胞の末梢での分化の異常があるとすれば、分化は抗原依存的な分化異常であることが推測される。今後、Helios 陰性 Treg 細胞を欠如している Limited マウスの腸管 Treg 細胞と、WT マウス腸管 Treg 細胞のマイクロアレイ解析を行い、どのような遺伝子発現に差異があるかを検討することにより、Helios⁻Treg 細胞の質的解明を行う。また、Helios⁻Treg 細胞が、腸内細菌由来抗原特異的に分化するか否かについて検討するために、腸管粘膜固有層に存在し、Treg 細胞誘導能を有する CD103⁺樹状細胞に提示されている抗原の検討を行っていく予定である。

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 6 件)

1. Li L, Nishio J, van Maurik A, Mathis D, Benoist C. Differential Response of Regulatory and Conventional CD4+ Lymphocytes to CD3 Engagement: Clues to a Possible Mechanism of Anti-CD3 Action? **J Immunol.** 191(7):3694-704 (2013) (査読あり)
2. 西尾純子. 秀潤社、「抗 CD3 抗体などによる自己免疫疾患の制御」細胞工学掲載決定 (査読なし)
3. Yanai H, Matsuda A, An J, Koshiba R, Nishio J, Negishi H, Ikushima H, Onoe T, Ohdan H, Yoshida N, Taniguchi T. Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its protective function against endotoxemia and bacterial infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 110(51):20699-704. (2013) (査読あり)
4. Nishio J, Honda K. Immunoregulation by the gut microbiota. **Cell Mol Life Sci.** 2012 Nov;69(21):3635-50. (2012) (査読あり)
5. Negishi H, Miki S, Sarashina H, Taguchi-Atarashi N, Nakajima A, Matsuki K, Endo N, Yanai H, Nishio J, Honda K and Taniguchi T. Essential contribution of IRF3 to intestinal homeostasis and microbiota-mediated Tslp gene induction. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 18;109(51): 21016-21021. (2012) (査読あり)
6. Negishi H, Yanai H, Nakajima A, Koshiba R, Atarashi K, Matsuda A, Matsuki K, Miki S, Doi T, Aderem A, Nishio J, Smale ST, Honda K, Taniguchi T. Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. **Nat Immunol.** 13(7):659-666. (2012) (査読あり)

[学会発表](計 2 件)

1. Junko Nishio, Impact of TCR repertoire on Intestinal Homeostasis, The Gut Microbiome: The Effector/Regulatory Immune Network, Taos, New Mexico, USA, February 10-15, 2013
2. 西尾純子, Impact of TCR repertoire on intestinal homeostasis, 日本免疫学会、千葉県、幕張メッセ、2013-12-13

[図書](計 1 件)

西尾純子. シーエムシー出版. 「新しい乳酸菌の機能と応用」. 腸管の恒常性維持や免疫機構における腸内細菌の役割. 17-27

2013年5月20日

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

西尾純子 (NISHIO, Junko)
東京大学・生産技術研究所・特任助教
研究者番号: 40598679

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし