

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：23700508

研究課題名（和文） 腸内細菌叢による炎症性腸疾患修飾におけるPRRとサイトカインの役割の解析

研究課題名（英文） The roles of PRR and cytokines in the development of intestinal microbiota-dependent inflammatory bowel diseases

研究代表者

唐 策（TANG CE）

東京理科大学・生命医科学研究所・助教

研究者番号：00572166

研究成果の概要（和文）：平成23年度にDectin-1遺伝子欠損マウスに急性大腸炎を誘導し、急性大腸炎の発症程度が野生型マウスより減輕することを確認した。メタゲノム解析法で野生型マウスに比べDectin-1欠損マウスの腸内細菌叢の中にグラム陰性細菌の割合が亢進していることが分かって、増加した細菌はDectin-1下流に誘導されている抗菌ペプチドレベル変化と関係することも明らかとなった。Dectin-1のアンタゴニスト糖鎖物質の投与実験を行い、Dectin-1を標的とした急性大腸炎の予防法は効果があることを明らかにした。平成23年度に得られた結果を基にして、平成24年度に急性大腸炎と異なる獲得免疫系のTh細胞の分化と増殖が発症要因とした慢性大腸炎の発症におけるDectin-1の役割を検討し、Dectin-1の欠損宿主でnaiveT細胞から制御性T細胞、Th17細胞への分化が顕著に亢進し、Th1細胞への分化が低下したことが分かった。それは原因でDectn-1欠損マウスの慢性大腸炎の発症が軽減し、Dectin-1は腸管Th細胞分化のバランスを制御していることが明らかとなった。ApcMin-Dectin-1欠損マウスを作出し、腸管ポリープ形成におけるDectin-1の機能について検討したところ、Dectin-1欠損によってポリープの形成は著しく亢進していたことが分かった。

研究成果の概要（英文）：The intestinal immune system has to take dual tasks; the system should fight against invading pathogens and, at the same time, the system should be tolerant toward commensal microbiota or food components. Dectin-1 is the receptor for beta-glucans expressed in fungal cell walls and activates the immune system to prevent infection. Because beta-glucans are contained in wide variety of foods and commensal microbiota, we investigated the effects of Dectin-1 signaling on the intestinal immunity. We found that Dectin-1-deficient mice were refractory to dextran sodium sulfate-induced colitis, a model for inflammatory bowel diseases, due to expansion of one genus of Gram-positive commensal bacteria in the colon associated with remodeling of T cell subpopulations. Furthermore, oral administration of a seaweed-derived Dectin-1 antagonist, inhibited the proinflammatory cytokine production in colonic lamina propria cells and suppressed the development of colitis. These observations suggest that inhibition of Dectin-1 signaling in the colon regulates the balance of intestinal microbiota and cellular immunity, and further suppresses the development of inflammatory bowel diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：粘膜免疫学

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：C型レクチン、腸内細菌叢、サイトカイン、炎症性腸疾患、遺伝子欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は主として消化管に原因不明の炎症を起こす疾患であり、ヒトではクローン病、潰瘍性大腸炎の二疾患からなる。近年、食生活の欧米化、即ち動物性タンパク質や脂質の大量摂取や、ストレスの増大などにより罹患率が大きく上昇しており、現在日本における患者数は2万人以上と報告されている。そのため、その予防法及び新たな治療法の開発が強く求められている。

2. 研究の目的

これら腸疾患の発症には腸内細菌叢と免疫細胞の相互作用が極めて重要であることが知られている。そこで研究代表者は、 β グルカン認識に関わるC型レクチン受容体Dectin-1に注目し、炎症性腸疾患および腸管ポリープ形成修飾における腸管内細菌叢のDectin-1を介したシグナルと自然免疫および獲得免疫系調節機構の解明を目指す。本研究では遺伝子欠損マウスを用いた誘導型大腸炎やポリープ自然発症モデルの*in vivo*解析と腸内細菌叢のメタゲノム解析を組み合わせを行い、最終的には腸疾患の予防、治療法の開発などの創薬への応用の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1)DSS飲料水内投与することによってCLRメンバーのDectin-1遺伝子欠損(*Clec7a*^{-/-})マウスに急性大腸炎を誘導し、野生型マウスと比べて発症程度の差異を評価する。また、メタゲノム解析法で野生型とDectin-1欠損マウスの腸内細菌叢の中に β グルカン産生性細菌、真菌などが存在するか検討する。続いて無菌マウスを作出して、同定された細菌或いは真菌を経口感染してから大腸炎を誘導し、その病態を評価することにより、これら β グルカン産生菌とDectin-1の関係を明らかにする。最後に急性大腸炎の発症を防ぐ、あるいは治療のためにDectin-1の中和抗体あるいはアンタゴニスト物質の投与実験を行い、Dectin-1を標的とした予防・治療法は効果があるかを評価する。

(2)自然免疫細胞及びそれらが産生するサイトカインが病態形成を担っている急性大腸炎と異なる獲得免疫系のTh細胞の分化と増殖、そしてTh細胞から産生されるサイトカ

インが発症要因とした慢性大腸炎の発症におけるDectin-1の役割を検討する。続いて*Apc*^{Min}-*Clec7a*^{-/-}マウスを作出し、腸管ポリープ形成におけるDectin-1の機能について検討する。最後にDectin-1の抗体・リガンド物質の投与実験を行い、Dectin-1を標的とした腸管ポリープ・腫瘍形成の予防・治療法は効果があるかを評価する。

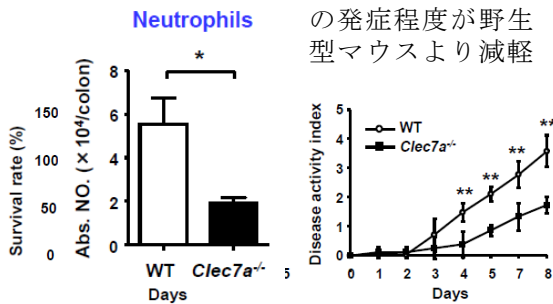
4. 研究成果

Dectin-1は、II型Cタイプレクチンファミリーメンバーであり、真菌細胞壁の主な成分である多糖類 β 1-3,1-6グルカン(β グルカン)を特異的に認識することが知られている。 β グルカンは食品添加物として利用され、免疫力を上げ抗がん作用があると思われているが、そのレセプターであるDectin-1のシグナルが腸管粘膜免疫においてどういう役割を果たしているのかがまだ不明である。そこで研究代表者は、Dectin-1欠損(*Clec7a*^{-/-})マウスを用いて、ヒト腸疾患の誘導型モデルであるDSS経口投与による潰瘍性大腸炎に対して*Clec7a*^{-/-}マウスは有意に耐性を示したことを見出した。野生型マウスより*Clec7a*^{-/-}マウスの大腸粘膜固有層の炎症性自然免疫細胞の浸潤やTNFなど炎症性サイトカインの産生が顕著に低下し、 β グルカンフリーの餌をたべさせても同様な現象が見られたことから、食物中の β グルカンから直接的な刺激というより、遺伝子改変による腸内細菌の変化が*Clec7a*^{-/-}マウスのDSS誘導大腸炎に対する感受性に影響及ぼすことが示唆される。炎症性腸疾患の発症には腸内細菌叢と免疫細胞の相互作用が極めて重要であることが知られている。細菌16s領域rDNAのメタゲノム解析から*Clec7a*^{-/-}マウスの大腸腸内細菌叢の組成が野生型マウスに比べ著しく変化したことが見られ、無菌マウスにSPF状態*Clec7a*^{-/-}マウスの腸内フローラを投与した後野生型マウスの腸内フローラを投与した無菌マウス宿主よりDSS大腸炎にSPFの*Clec7a*^{-/-}マウスと同様な耐性を示した。これらの結果からDectin-1シグナルが炎症性サイトカインを直接誘導する一方で腸内フローラのバランスを調節することによって大腸炎の病態形成に促進的な役割を果たすことが示唆される。Dectin-1のアンタゴニスト

リガンドを事前投与することによって、DSS 大腸炎の発症を強く抑制した結果から、Dectin-1 シグナルがターゲットとしてヒトの炎症性腸疾患に対する新たな予防・治療法の開発への応用の可能性が示唆される。本研究では、第3の PRR である CLR の中でも特に Dectin-1 に注目し、腸管内細菌叢による炎症性腸疾患修飾における Dectin-1 を介した自然免疫および獲得免疫系調節機構を明らかにした。そして、炎症性腸疾患の予防、治療法の開発などの創薬への応用を目指し、この際、細菌のメタゲノム解析、腸炎疾患モデルと遺伝子欠損マウスの組み合わせを用いることにより、微生物・食物といった腸管内容物と宿主免疫の相互作用の包括的な理解に繋がると考えられる。当初の「到達目標」としては (1) Dectin-1 の急性、慢性大腸炎 (DSS 誘導大腸炎およびナイーブ T 細胞移入大腸炎モデル) の発症における役割; (2) Dectin-1 シグナルのナイーブ CD4 T 細胞の Th1・Th17 への分化における役割; (3) Dectin-1 の特異性中和抗体、あるいはアンタゴニスト作用を持つ多糖類物質の投与による大腸炎発症の軽減、治療法の開発 以上 3 項目について、申請者が有する PRR 遺伝子およびサイトカイン欠損マウスを駆使して、3 項目すべてメカニズムを解明し、当初の目標を到達した後、さらに腸管ポリープ形成における Dectin-1 の役割についてポリープ発症メカニズムを探り、Dectin-1 シグナル下流のポリープ発症との関与因子を探し、幾つかの candidate を着目し解析した。

具体的に説明すると、
 (1) Dectin-1 の急性大腸炎の発症における役割の解明

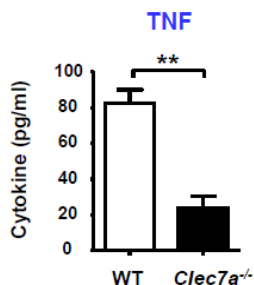
について、*Clec7a*^{-/-} マウスにおいては、DSS 誘導性急性大腸炎の発症程度が野生型マウスより軽減



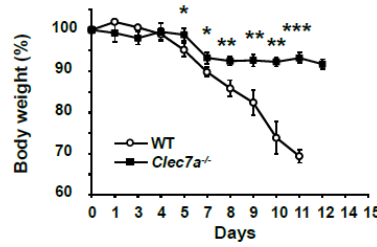
することを見出し、その分子機構の解明をしました。

(下図、*Clec7a*^{-/-} マウス好中球の浸潤、炎症性サイトカインの分泌能の低下が見られる) (下図、β グルカンフリー食を食べさせても野生型マウスの炎症症状改善できないため、食物由来のβ グルカンが大腸炎の発症には直接関与していないと示唆される)

(下図、無菌野生型マウスと *Clec7a*^{-/-} マウス両方もと DSS 大腸炎発症できないため、



腸内細菌の存在が大腸炎の発症とは関与すると示唆される)

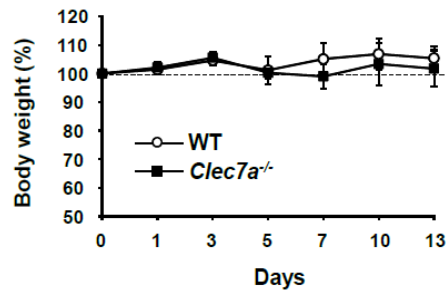


(下図、SPF *Clec7a*^{-/-} マウスの腸

内フローラを無菌マウスに投与した後、無菌マウスが DSS 大腸炎に対する耐性になったため、

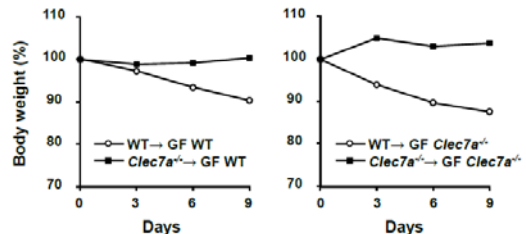
Clec7a^{-/-} マウスの遺伝子欠損による変化した腸内細菌叢が大腸炎の発症を抑制すること

Germ-free WT&Dectin-1KO

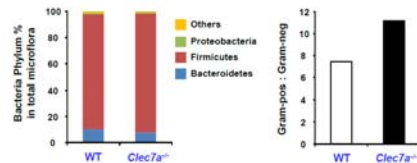


が示唆される)

(2) Dectin-1 に認識される抗原を持つ腸内細菌・真菌の同定



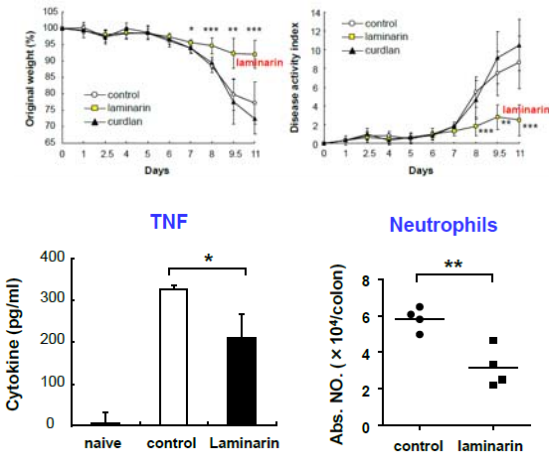
について解析したが、本研究室のマウスの腸内フローラに真菌が定着していないことが明らかになった。野生型マウスに比べ、*Clec7a*^{-/-} マウス腸内グラム陽性菌が特に増えていることが分かった (下図)。



(3) 急性大腸炎に対する治療法の開発

については、海藻由来 Dectin-1 の antagonist リガンド laminarin を事前餌中に投与することによって、DSS 大腸炎の発症を著しく抑制することができたため、Dectin-1 を標的としたこれらの腸疾患の予防・治療法開発などの

創薬への応用の可能性が示唆される（下図）。



(4) Dectin-1 の慢性大腸炎発症における役割の解明

については、Dectin-1 シグナルが直接ナイーブ CD4 T 細胞の Th1・Th17 への分化に関与するののかについて、CD45RB⁺CD25⁻CD4 T 細胞を Dectin-1-Rag2 二重欠損マウスへ移入することによって Dectin-1 欠損環境下で Th1 への分化能が低下、Th17 細胞への分化が亢進したことが明らかとなった。Th1 分化の減弱、そして Th17 分化の亢進の原因で、慢性大腸炎の発症が Dectin-1-Rag2 二重欠損マウスで明らかに軽減したことが分かって、Dectin-1 シグナルが Th1 細胞分化を促進し、Th17 細胞分化を抑制することによって慢性大腸炎の発症を抑制する役割を解明した。

(5) 腸管ポリープ形成と Dectin-1 の役割の解明

については、Apc^{Min} Clec7a^{-/-}マウスを作出し、遺伝子発現解析、ERK を中心としたシグナル伝達解析の他、細胞増殖、アポトーシス、血管新生などについて組織学的検討を行い、腸管ポリープ形成における Dectin-1 の役割について詳細な検討を行った結果、Clec7a^{-/-}マウスで Dectin-1 シグナル下流の抗細胞増殖因子の発現が低下したことから APC^{min} 背景マウスの腸管で細胞増殖が亢進して、大腸ポリープが亢進していたことが分かった。

(6) 食餌性βグルカンが腸管ポリープ形成に与える影響の解析

については、Dectin-1リガンド物質を投与し、腸管ポリープ・腫瘍形成の抑制効果を検討し、現在まで有意な予防・治療効果がまだ再確認する必要がある。

本研究は、二年に渡って、急・慢性大腸炎または腸管ポリープ・腫瘍の病態形成における Dectin-1 の役割を解明した上で、Dectin-1 を標的としたこれらの腸疾患の予防・治療法開発などの創薬への応用にも手をつけ、最後に得られた結果を取りまとめ、学会発表を行い、現在論文投稿中で、当初の予定より大分進ん

でいるため、「到達目標」以上の成果が得られました。

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 2 件)

1. The Antimicrobial Protein REG3A Regulates Keratinocyte Proliferation and Differentiation after Skin Injury. Yuping Lai, Dongqing Li, Changwei Li, Beda Muehleisen, Katherine A. Radek, Hyun Jeong Park, Ziwei Jiang, Zhiheng Li, Hu Lei, Yanchun Quan, Tian Zhang, Yelin Wu, Paul Kotol, Shin Morizane, Tissa R. Hata, Keiji Iwatsuki, Ce Tang, and Richard L. Gallo. *Immunity*. 2012 Jul 27; 37(1):74-84. (査読有)
2. IL-23 in colitis: targeting the progenitors. Ce Tang and Yoichiro Iwakura. *Immunity*. 2012 Dec 14; 37(6):957-9. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. 第 60 回日本実験動物学会総会、平成 25 年 5 月 15 日-17 日、つくば国際会議場
口頭発表：O-12, 唐策、神谷知憲、角木基彦、大島健志朗、服部正平、岩倉洋一郎。炎症性大腸炎の病態形成における Dectin-1 の新規の役割解析。
2. 10th Joint Conference of the ISICR and the ICS, Cytokines 2012
September 11-14, 2012, Geneva, Switzerland
Oral presentation: O40, Ce Tang, Tomonori Kamina, Motohiko Kadoki, Yoichiro Iwakura. A novel role of dectin-1 signaling in promoting intestinal inflammation.
3. 9th Joint Conference of the ICS and ISICR, Cytokines (ISICR)
October 9-12, 2011. Florence, Italy
Poster presentation: PS1-015, Ce Tang, Shigeru Kakuta, Motohiko Kadoki, Yoichiro Iwakura. IL-17F, rather than IL-17A promotes CD4⁺ T cell activation and Th1-type immunity.

6. 研究組織

研究代表者

唐 策 (Tang Ce)

東京理科大学・生命医科学研究所・助教

研究者番号：00572166