様式Ｆ－１９

科研費 KAKENHI

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５月３１日現在

機関番号：８２４０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：２３７９０５２４
研究課題名（和文）　腸内細菌制御による炎症性腸疾患治療への応用
研究課題名（英文）Characterization of intestinal microbiota for the treatment of inflammatory bowel disease

研究代表者
新　幸二（ATARASHI　KOJI）
独立行政法人理化学研究所・免疫細胞システム研究グループ・客員研究員
研究者番号：６０５４６７８７

研究成果の概要（和文）：炎症性腸疾患の発症・増悪に腸内細菌叢の異常が関与していることが強く示唆されている。本研究では制御性 T 細胞（Treg 細胞）を誘導する腸内細菌に焦点を当て研究を行った。ヒト便から細菌を単離し Treg 細胞の誘導能を持つ細菌の同定を行った結果、マウスの腸内細菌と同様にクロストリジウム属細菌が強い誘導能を持っていることが明らかになった。また、SPF マウスにヒト便から単離したクロストリジウム属細菌を投与するとアレルギー性の下痢を抑制する効果を持っていることがわかり、治療への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）： Many studies suggest that altered intestinal microbiota may play a major role in the onset and exacerbation of several inflammatory diseases, including inflammatory bowel diseases (IBDs). We previously reported that murine commensal bacteria Clostridium spp. have the capacity to induce intestinal regulatory T (Treg) cells. This study was focused on the human intestinal bacteria which can induce Treg cells in the intestine. I successfully isolated the bacteria with the ability to induce Treg cells from human stool, and administration of these bacteria attenuated disease in models of colitis and allergic diarrhea.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学
キーワード：制御性 T 細胞、腸内細菌、炎症性腸疾患

１．研究開始当初の背景

ヒトの腸管内腔にはおよそ 1000 種類、100 兆個以上の常在細菌が生息し、互いに共生し細菌叢（コミュニティー）を形成、維持している。腸内常在細菌は宿主にとって非常に有用であり、消化の補助、ビタミンの供給、病原菌の排除に機能していることがよく知られている。また、腸内常在細菌の重要な機能として免疫系の形成促進、維持、活性化があげられる。そのため、腸内細菌叢の構成細菌のバランスが崩れると免疫系のバランスの異常を引き起こし、その結果として様々な炎症疾患の原因となるとこが示唆されている。一方で近年、免疫系の主体である T 細胞の新しいサブセットが同定された。一つが IL-17 産生性ヘルパーT 細胞(Th17 細胞)であり、もう一つが Treg 細胞である。Th17 細胞は自己免疫疾患の発症、増悪に関与しており、Treg 細胞は活性化したエフェクターT 細胞を抑制することで自己免疫疾患を抑制している。炎症性腸疾患を含む様々な自己免疫疾患において、Treg 細胞の減少および Th17 細胞の増加が病態の発症、増悪に関与していることが明らかになってきた。そのため、Th17 細胞と Treg 細胞のバランスを保つことが炎

症性腸疾患の予防、治療に重要であると考えられる。

２．研究の目的

これまで我々は大腸粘膜固有層に存在する Treg 細胞がマウス腸内常在細菌のクロストリジウム属によって強く誘導されていることを発見した。しかし、クロストリジウム属の細菌群による Treg 細胞の誘導メカニズムの詳細はまだ未解明である。またヒトにもマウスと同様に Treg 細胞誘導細菌が存在しているかは解析されていない。そこで、本研究では腸管での Treg 細胞の腸内常在細菌による誘導メカニズムについてヒト腸内細菌を用いて詳細な解析を行い、炎症性腸疾患の治療、予防に応用できる新たな知見を提供することを目的とする。

３．研究の方法

(1) ヒトの腸内常在細菌による Treg 細胞の誘導

これまでの研究結果からマウスの腸内細菌であるクロストリジウム属細菌によって大腸 Treg 細胞が誘導されていることが明らかになったので、ヒトの腸内にも Treg 誘導細菌が存在しているのか、またどのような細菌なのかを特定した。まず、無菌マウスにヒト糞便を投与しヒト腸内細菌を持つマウスを作製し、Treg 細胞が誘導されるか検討した。ヒト腸内細菌定着マウスの便もしくは盲腸内容物から細菌 DNA を精製しどのような細菌が存在しているか検討した。また、嫌気条件下で培養し、培養可能な細菌のみで Treg 細胞が誘導されるか検討した。その後、細菌を絞り込んでいくため細菌数を減らし無菌マウスに投与し Treg 細胞の誘導を解析した。腸内細菌により誘導された Treg 細胞の機能を解析するため、炎症性腸疾患のモデルやアレルギーモデルを行った。

(2) クロストリジウム属細菌による Treg 細胞誘導メカニズムの解析

Treg 細胞の誘導に重要なサイトカインである TGF-b がクロストリジウム属細菌を定着させたマウスの上皮細胞から産生されていることから、どのような刺激が上皮細胞からの Treg 細胞からの TGF-b 産生に関与しているかを検討した。クロストリジウム属細菌そのものや培養上清、定着マウスの盲腸内容物を上皮細胞にふりかけ TGF-b が産生されるかを測定した。また無菌マウスとクロストリジウム属細菌定着マウスの盲腸内容物にどのような物質が含まれているかを GC-MS によって解析を行った。

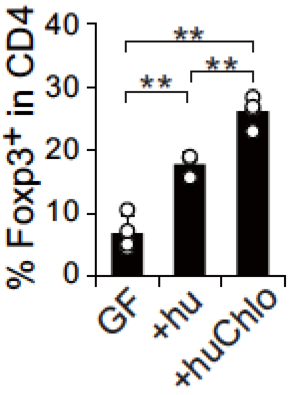
(3) Treg 細胞からの IL-10 産生メカニズムの解析

無菌マウスにクロストリジウム属細菌を定着させると Treg 細胞が誘導されると同時に Treg 細胞からの IL-10 産生も促進される。IL-10 は抗炎症性サイトカインであり免疫抑制に非常に重要である。そこで Treg 細胞からの IL-10 産生メカニズムを解明するため、以前に作成した IL-10 レポーターマウスを用いて IL-10 産生 Treg 細胞と IL-10 を産生していない Treg 細胞をソーティングにより単離し、遺伝子発現を比較検討した。

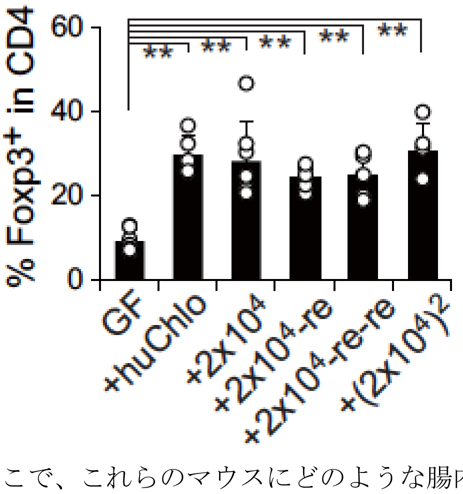
４．研究成果

(1) ヒトの腸内常在細菌による Treg 細胞の誘導

ヒト便を無菌マウスに投与し大腸 Treg 細胞が増加するかを解析した結果、ヒト便定着マウス (+hu) では Treg 細胞が顕著に増加することが明らかになった。ヒト便をクロロホルムで処理した後 (+huChlo)、無菌マウスに投与すると無処理と比較して強い Treg 細胞の誘導が見られた（下図）。

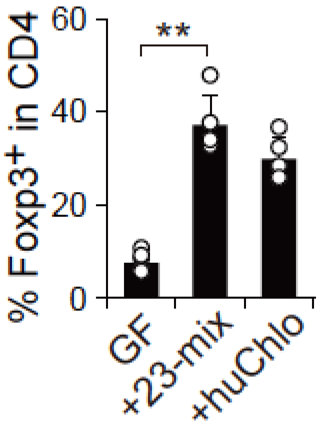


さらに、クロロホルム処理便投与マウスの盲腸内容物を 2 万倍希釈し、無菌マウスに再投与 ($+2x10^4$)、このマウスの盲腸内容物を再投与 ($+2x10^4$-re)、再々投与 ($+2x10^4$-re-re) さらに 2 万倍希釈し投与 ($+(2x10^4)^2$) してもコンスタントに強い Treg 細胞の増加が見られた（下図）。

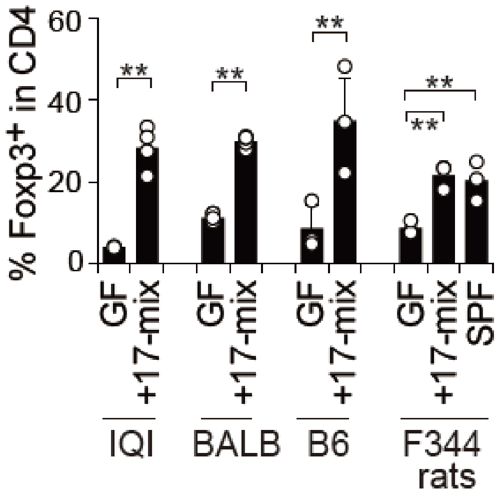


そこで、これらのマウスにどのような腸内細菌が存在しているのかを 16S rRNA 遺伝子の網羅的解析により検討した。その結果、主に 20 数種の細菌が存在していることが分かり、嫌気条件下で盲腸内容物を培養することに

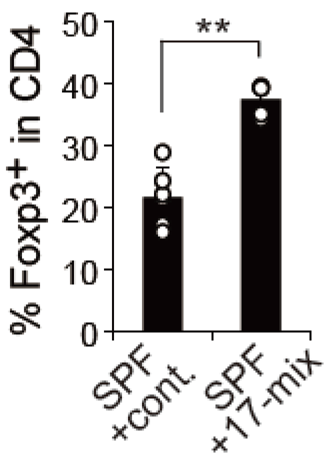
より、菌の単離を試みた。その結果、23 種類の菌が単離でき、これらの 23 種類の細菌を無菌マウスに投与すると(+23-mix)、Treg 細胞が強く誘導された(下図)。以上のことから、ヒトの腸内に存在する Treg 細胞誘導能をもつ 23 種類の細菌を特定することができた。

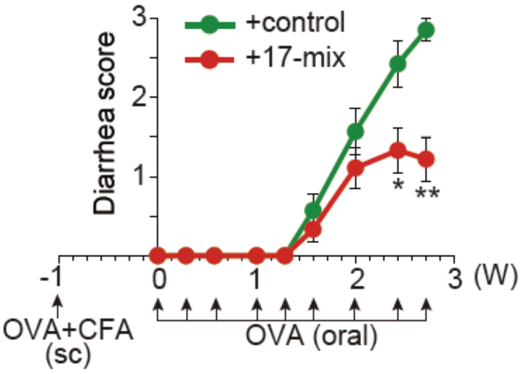


さらに検討を行った結果、23 菌株投与マウスに多く定着していた 17 菌株のみを無菌マウスに投与(+17-mix)しても強く Treg 細胞が誘導された。また、マウスの系統による応答性に差があるのかを検討するため、IQI, Balb/c, C57BL/6 のそれぞれの無菌マウスを用いて 17 菌株を定着させ Treg 細胞の誘導レベルを検討した。その結果、どの系統を用いても 17 株細菌の投与により強く Treg 細胞が増加することが明らかになった。また無菌ラット F344 を用いて同様の実験を行ったところ、マウスと同様に 17 菌株投与により強く Treg 細胞が増加することが明らかになった(下図)。



無菌マウスではなく腸内細菌が存在している SPF マウスにおいても、これら 17 菌株が Treg 細胞を誘導することができるかを検討した。SPF マウスに週 3 回、4 週間 17 菌株を投与すると有意に大腸 Treg 細胞が増加した(右図)。また、このマウスを用いて OVA 誘導性アレルギー下痢モデルを行うと、17 株投与 SPF マウスにおいてコントロールマウスと比較して有意に下痢症状が改善されることが明らかになった(下図)。このことからヒト腸内由来の１７菌株の投与は腸内細菌が存在している状況においても Treg 細胞の誘導効果を発揮し、腸管炎症を抑制できると考えられた。そのためこれら１７菌株を用いたヒトへ

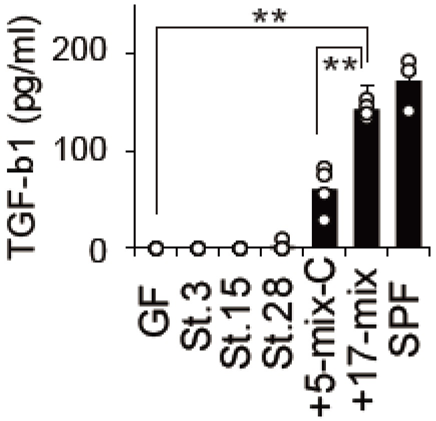




の臨床応用が期待できると考えられる。

(2) クロストリジウム属細菌による Treg 細胞誘導メカニズムの解析

無菌マウスとクロストリジウム属細菌定着マウスの上皮を単離し、DNA マイクロアレイ解析を行った結果、TGF-b のプロセシングに働く遺伝子がクロストリジウム属細菌定着マウスに強く発現していることがわかった。そこで、ヒト上皮の培養細胞、プライマリー細胞を用いて、クロストリジウム属細菌や細菌培養上清、クロストリジウム属細菌定着マウスの盲腸内容物を上皮細胞にふりかけ TGF-b が産生されるかを測定した。その結果、細菌そのものや培養上清を加えても TGF-b は産生されないが、盲腸内容物を水で懸濁しフィルターを通したものを加えると TGF-b が上清中に強く産生されることが明らかになった。また、TGF-b の産生量は 1 株のみ(St.3, St.15, St.28)では少ないが、5 株(+5mix-C)では中程度、17 株投与マウスでは SPF マウスと同程度まで増加することが明らかになった(次頁図)。



そこで無菌マウスと 17 株定着マウスの盲腸内容物にどのようなものが含まれているかを GC-MS を用いて、特に短鎖脂肪酸を中心に解析した。その結果、酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸が 17 株定着マウスの盲腸内容物に高濃度に存在していることがわかった。これらの短鎖脂肪酸を上皮細胞の培養液に添加すると TGF-b の産生が促進された。このことから 17 株定着マウスの盲腸内容物に含まれる TGF-b 産生誘導因子の一つとして短鎖脂肪酸が考えられた。

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５件）

① Mucida D, Husain MM, Muroi S, van Wijk F, Shinnakasu R, Naoe Y, Reis BS, Huang Y, Lambolez F, Docherty M, Attinger A, Shui JW, Kim G, Lena CJ, Sakaguchi S, Miyamoto C, Wang P, Atarashi K, Park Y, Nakayama T, Honda K, Ellmeier W, Kronenberg M, Taniuchi I, Cheroutre H. Transcriptional reprogramming of mature CD4+ helper T cells generates distinct MHC class II–restricted cytotoxic T lymphocytes. Nat Immunol. 査読有 14, 281–289 (2013)

② Kusu T, Kayama H, Kinoshita M, Jeon SG, Ueda Y, Goto Y, Okumura R, Saiga H, Kurakawa T, Ikeda K, Maeda Y, Nishimura J, Arima Y, Atarashi K, Honda K, Murakami M, Kunisawa J, Kiyono H, Okumura M, Yamamoto M, Takeda K. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7 controls Th17 cell responses through regulation of luminal ATP in the small intestine J Immunol. 査読有 190, 774-783 (2013)

③ 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, and Taniguchi T. Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. Nat Immunol. 査読有 13, 659–666 (2012)

④ Atarashi K, Honda K. Microbiota in autoimmunity and tolerance. Curr Opin Immunol. 査読有 23, 761-768 (2011)

⑤ Atarashi K, Umesaki Y, Honda K. Microbiotal influence on T cell subset development Semin Immunol. 査読有 23, 146-153 (2011)

〔学会発表〕（計４件）

① Atarashi K、Human clostridium species promote intestinal accumulation of Treg cells、Keystone Symposia “The Gut Microbiome: The Effector/Regulatory Immune Network”、 Feb. 11, 2013、Taos, New Mexico

② 新幸二、腸内細菌による T 細胞応答の誘導、第 46 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会、2013 年 1 月 25 日、神奈川県伊勢原市

③ Atarashi K、Induction of intestinal Regulatory T cells by Human Clostridium species、第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012 年 12 月 7 日、兵庫県神戸市

④ 新幸二、腸管での T 細胞誘導における腸内細菌の役割、食品免疫学会第 6 回宿泊セミナー、2011 年 11 月 26 日、東京都台東区

〔図書〕（計１件）

① Honda K, Atarashi K, Nishio J. Microbial Recognition and Pathogen-Associated Molecular Pattern Receptors in Inflammatory Bowel Disease Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. pp. 97-110 (2012)

〔産業財産権〕
○出願状況（計１件）
名 称 : Composition for inducing proliferation or accumulation of regulatory t cells
発明者 : HONDA Kenya、ATARASHI Koji、ITOH Kikuji, TANOUE Takeshi

権利者：The University Of Tokyo
種類：特許
番号：PCT/JP2011/063302
出願年月日：2011 年 6 月 3 日
国内外の別：国際

○取得状況（計０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
新　幸二（ATARASHI　KOJI）
独立行政法人理化学研究所・免疫細胞システム研究グループ・客員研究員
研究者番号：６０５４６７８７

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし