

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390120

研究課題名(和文)腸内細菌会話因子による免疫制御機構の解析

研究課題名(英文)Analysis on immune regulation by a bacterial quorum sensing molecule

研究代表者

竹田 潔 (Takeda, Kiyoshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20309446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌の産生するクオラムセンシング分子、インドールの宿主への作用を無菌マウスを用いて解析した。無菌マウスの糞便中インドールの濃度は著明に減少していた。また無菌マウスの大腸上皮細胞では、細胞間接着装置関連の遺伝子発現が低下しており、インドール封入カプセルを無菌マウスに経口投与することにより上昇した。無菌マウスは、デキストラン硫酸塩による腸管炎症に感受性が高くなっているが、インドール封入カプセルを投与することにより腸管炎症を改善させることができた。以上の結果から、細菌間の会話分子インドールが宿主の腸管上皮に作用し、腸管恒常性維持に関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Microbiota have a great influence on barrier functions of intestinal epithelial cells (ECs). The role of indole as a quorum-sensing molecule mediating intercellular signals in bacteria has been well characterized. We analyzed the effect of indole on ECs using a germ free (GF) mouse model. The feces of specific pathogen-free (SPF) mice contained a high amount of indole; however the amount was markedly decreased in the feces of GF mice. GF mice showed decreased expression of junctional complex molecules in colonic ECs. Oral administration of indole-containing capsules resulted in increased expression of both tight junction - and adherens junction-associated molecules in colonic ECs in GF mice. In accordance with the increased expression of these junctional complex molecules, GF mice given indole-containing capsules showed higher resistance to dextran sodium sulfate-induced colitis. These findings demonstrate the beneficial role of indole in establishing an epithelial barrier in vivo.

研究分野：免疫学

キーワード：腸内環境 上皮 炎症

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管には 1000 種程度、 10^{14} 個にもものぼる細菌が生息している、その数は宿主細胞 (約 10^{13} 個) の 10 倍の数にもなる。これら腸内細菌はそのほとんどが試験管内での培養が困難なものでその実態が長らく不明であったが、近年のメタゲノム解析技術の向上により、さまざまな腸内細菌の同定が可能になってきた。このような腸管に生息する腸内細菌は、腸管から定住環境の提供を受ける一方、宿主に有益な影響を及ぼすことが知られている。このように、腸内に生息する細菌類は宿主とみごとな共生関係を構築している。さらに、腸内細菌に由来する様々な因子が、腸管免疫系の制御に関わっていることが明らかになってきている。しかしながら、腸内細菌は 1000 種を超えることを考えると、これまで、腸管免疫系に作用することが明らかになっている腸内細菌由来の因子は、ごく一部に過ぎず、これらの解析はまだ単著が切り開かれたところで、今後さらにさまざまな因子を同定し、これら複数の因子がどのように相乗的、協調的効果を腸内環境で生み出しているかを、個体レベルで解析していく必要がある。

一方、病原性細菌において、細菌が産生する分子が、細菌の密度に対応して、細菌の遺伝子発現を制御している現象が、細菌間のコミュニケーションを司るクオラムセンシングとして知られている (Ann. Rev. Microbiol. 55, 165-199, 2001)。クオラムセンシングを司る分子は、細菌に作用するだけでなく、細菌の病原性を発揮するために、宿主細胞に作用することも見出されている (Nat. Rev. Microbiol. 6, 111-120, 2008)。そしてクオラムセンシングによる細菌間の遺伝子発現調節は、病原性細菌に限らず腸内に共生する細菌でも見られることが報告された (Folia Microbiol. 53, 221-224, 2008)。しかしながら、腸内細菌間のコミュニケーションを担う分子群が、腸内で宿主に作用するのかについては、ほとんど解析が進んでいない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、腸内細菌が産生し、腸内細菌に作用する分子群 (腸内細菌間のコミュニケーションを担うクオラムセンシング様分子) に着目し、これら分子群が宿主に及ぼす作用を解析する。

まず細菌間コミュニケーション分子であるインドールの宿主免疫系に及ぼす影響を詳細に解析するとともに、他の細菌間コミュニケーション分子の同定、宿主免疫系に及ぼす影響を明らかにし、これら複数の因子による協調的な作用をも明らかにすることで、腸管における共生細菌と宿主の新たな inter-kingdom signaling 機構を明らかにする。

3. 研究の方法

これまでに、SPF マウスと無菌マウスの糞便を用いた HPLC 解析から、腸内細菌間のコミュニケーションを担ういくつかの分子が、無菌マウスで著明に減少していることを見出している。例えば、大腸菌属がトリプトファンを分解し産生するインドールは、大腸菌自身の遺伝子発現のみならず、他の菌種の遺伝子発現をも制御する、複数の細菌間のコミュニケーションを担う分子であることが報告されている (J. Bacteriol. 183, 4210-4216, 2001; J. Biol. Chem. 283, 24245-24253, 2008)。一方、宿主側にとってインドールは糞便の腐敗臭の原因分子として知られている程度で、消化管から吸収後、肝臓などでインドキシルに代謝され、さらに硫酸化され、腎臓より排泄される。このように、宿主にとって毒物として速やかに排泄されるインドールが、試験管内で腸管上皮細胞株に遺伝子発現を誘導することが示された (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107, 228-233, 2010)。これらの事実から、細菌間のコミュニケーションを担うインドールが、宿主にも作用を及ぼす可能性が考えられる。そこで、無菌マウスにインドールを内封した腸溶性シームレスカプセルを経口投与することにより、その後の大腸上皮の遺伝子発現の変化、さらには腸管リンパ組織、粘膜固有層の B, T 細胞分化に及ぼす影響を解析する。さらに、インドールの解析と並行して、SPF マウスと無菌マウスの糞便を用いたメタボローム解析を行う。この解析により、無菌マウスで濃度が低下している分子を見出し、文献検索のうえ、細菌間コミュニケーションに関わる分子を同定し、インドールの場合と同様に無菌マウスに投与し、その宿主免疫系、腸管炎症に及ぼす影響を解析する。

4. 研究成果

SPF マウスと無菌マウスの糞便中のインドールおよびその代謝産物インドール硫酸塩の濃度を HPLC 解析により測定すると、無菌マウスでは著明にその濃度が減弱していた (図 1)。

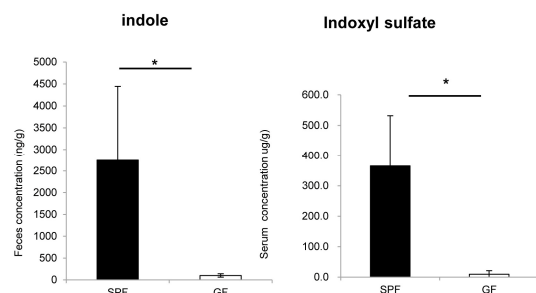


図 1 SPF マウスおよび無菌マウス (GF) における Indole および Indole sulfate の濃度

一方、無菌マウスでは、腸管恒常性が破綻していることが示唆されていたため、大腸上皮におけるバリア関連遺伝子 Claudin-7, occludin, zonula occludens-1 (ZO-1) の発現を解析したところ、SPF マウスに比べてこれらの遺伝子発現が優位に低下していた (図 2)。

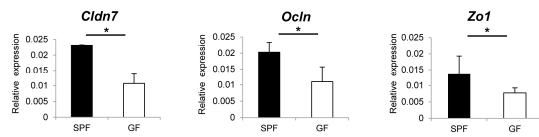


図2 SPF、無菌マウス(GF)の大腸上皮におけるCldn7(claudin-7), Oc1n(occludin), Zo-1のmRNA発現また、これら細胞間接着装置関連遺伝子の発現低下に伴い、デキストラン硫酸塩(DSS)による腸管炎症に対する感受性が無菌マウスでは著明に高かった(図3)。

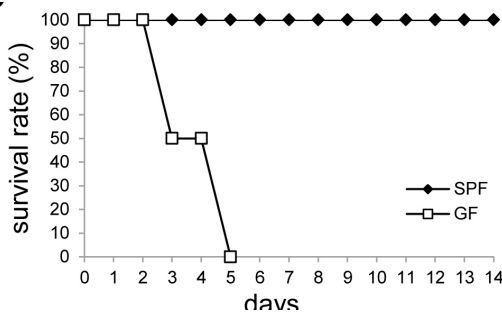


図3 SPF、無菌マウス(GF)に4% DSSを3日間自由飲水させ、その生存率を観察した。

腸管上皮細胞株 Caco-2 細胞にインドールを添加すると、Claudin-7, occludin, ZO-1 の発現が亢進したため、マウス腸管上皮におけるこれら遺伝子発現に対するインドールの影響を解析した。インドールを腸溶カプセルに封入し、無菌マウスに2週間連日投与し、大腸上皮におけるClaudin-7, occludin, ZO-1 の発現を解析した。その結果、インドールの投与により、これら遺伝子の発現が大腸上皮で高くなることが明らかになった(図4)。

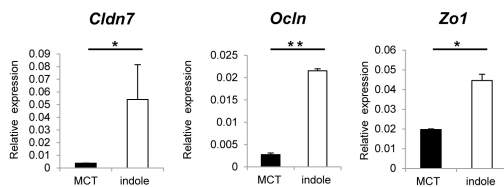


図4 無菌マウスにインドールあるいはコントロール(MCT)を2週間連日経口投与し、大腸上皮のCldn7(claudin-7), Oc1n(occludin), Zo-1のmRNA発現を解析した。

そこで、DSSによる腸管炎症感受性に対するインドールの効果を解析した。その結果、インドールを投与した無菌マウスでは、DSS誘導性腸炎に対して耐性を持つようになることが明らかになった(図5)。

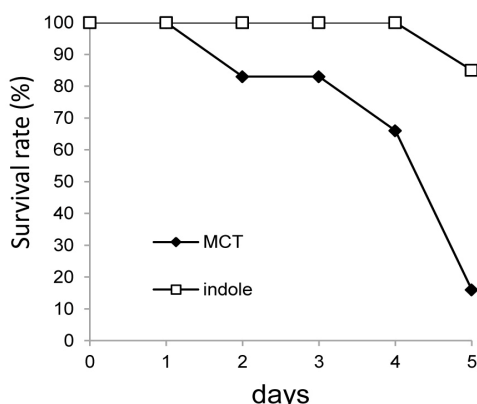


図5 インドールを投与したマウスにDSSを自由飲水させ、生存率を測定した。

以上の結果から、腸内細菌依存性に腸管腔内で産生されるクオラムセンシング分子インドールが、大腸上皮に作用し、バリア機能を強化することにより、腸管恒常性維持に寄与していることが明らかになった。

また、SPFマウスと無菌マウスの糞便中の脂溶性物質を中心に網羅的にメタボローム解析を行ったところ、様々な代謝産物が腸内細菌依存性に産生されていることが明らかになった。今後、これら代謝産物の中でもその宿主への作用が明らかになっていないものを中心に、その宿主への作用を明らかにしていきたい。

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21件)

1. Tsai, S. H., Kinoshita, M., Kusu, T., Kayama, H., Okumura, R., Ikeda, K., Shimada, Y., Takeda, A., Yoshikawa, S., Kurashima, Y., Sato, S., Umemoto, E., Kiyono, H., Karasuyama, H. and *Takeda, K. (2015) Ecto-enzyme E-NPP3 negatively regulates ATP-dependent chronic allergic responses by basophils and mast cells. *Immunity* 42, 279-293. (査読有)
2. Mastumoto, M., Baba, A., Yokota, T., Nishikawa, H., Ohkawa, Y., Kayama, H., Kallies, A., Nut, S. L., Sakaguchi, S., Takeda, K., *Kurosaki, T., and *Baba, Y. (2014) Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* 41,1040-1051. (査読有)
3. Ma, J. S., Sasai, M., Ohshima, J., Lee, Y., Bando, H., Takeda, K. and *Yamamoto, M. (2014) Selective and strain-specific NFAT4 activation by the *Toxoplasma gondii* polymorphic dense granule protein GRA6. *J. Exp. Med.* 211, 2013-2032. (査読有)
4. Masahata, K., Umemoto, E., Kayama, H., Kotani, M., Nakamura, S., Kurakawa, T., Kikuta, J., Gotoh, K., Motooka, D., Sato, S., Higuchi, T., Baba, Y., Kurosaki, T., Kinoshita, M., Shimada, Y., Kimura, T., Okumura, R., Takeda, A., Tajima, M., Yoshie, O., Fukuzawa, M., Kiyono, H., Fagarasan, S., Iida, T., Ishii, M. and *Takeda, K. (2014) Generation of colonic IgA-secreting cells in the cecal patch. *Nat. Commun.* 5, 3704. (査読有)
5. Meunier, E., Dick, M. S., Dreier, R. F., Schürmann, N., Kenzelmann Broz, D., Warming, S., Roose-Girma, M., Bumann, D., Kayagaki, N., Takeda, K., Yamamoto, M. and *Broz, P. (2014) Caspase-11 activation

- requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature* 509, 366-370. (査読有)
6. *Kinoshita, M. and Takeda, K. (2014) Microbial and dietary factors modulating intestinal regulatory T cell homeostasis. *FEBS Lett.* 588, 4182-4187. (査読有)
 7. Ohshima, J., Lee, Y., Sasai, M., Saitoh, T., Ma, J.S., Kamiyama, N., Matsuura, Y., Pann-Ghill, S., Hayashi, M., Ebisu, S., Takeda, K., Akira, S., and Yamamoto, M. (2014) Role of the mouse and human autophagy proteins in IFN- γ -induced cell-autonomous responses against *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 192, 3328-3335. (査読有)
 8. Hyde, J. L., Gardner, C. L., Kimura, T., White, J. P., Trobault D. W., Huang, C., Szretter, K. J., Paessler, S., Takeda, K., Amarasinghe, G., Klimstra, W. B. and *Diamond, M. S. (2014) A viral RNA structural element alters host recognition of non-self RNA. *Science* 343, 783-787. (査読有)
 9. Ogino T, *Nishimura J, Barman S, Kayama H, Uematsu S, Haraguchi N, Uemura M, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Yamamoto H, *Takeda K. Doki Y, and Mori M. (2013) CD14⁺ CD163^{low} cells in human intestinal lamina propria induce Th17 cell differentiation. *Gastroenterol.* 145, 1380-1391. (査読有)
 10. Shimada, Y., Kinoshita, M., Harada, K., Mizutani, M., Masahata, K., Kayama, H. and *Takeda, K. (2013) Commensal bacteria-dependent indole production enhances epithelial barrier function in the colon. *PLoS One* 8: e80604. (査読有)
 11. Kimura, T., Katoh, H., Kayama, H., Saiga, H., Okuyama, M., Okamoto, T., Umemoto, E., Matsuura, Y., Yamamoto, M. and *Takeda, K. (2013) Ifit1 inhibits JEV replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. *J. Virol.* 87, 9997-10003. (査読有)
 12. *Kunisawa, J., Gohda, M., Hashimoto, E., Ishikawa, I., Higuchi, M., Suzuki, Y., Goto, Y., Panea, C., Ivanov, I. I., Sumiya, R., Aayam, L., Wake, T., Tajiri, S., Kurashima, Y., Shikata, S., Akira, S., Takeda, K., and Kiyono, H. (2013) Microbe-dependent CD11b⁺ IgA⁺ plasma cells in early-phase robust intestinal IgA responses in mice. *Nat. Commun.* 23, 1772. (査読有)
 13. Kamiyama, N., Yamamoto, M., Saiga, H., Ma, J.S., Ohshima, J., Machimura, S., Sasai, M., Kimura, T., Ueda, Y., Kayama, H., and Takeda, K. (2013) CREBH determines the severity of sulphurine-induced fatal shock. *PLoS One.* 8, e55800. (査読有)
 14. Kusu, T., Kayama, H., Kinoshita, M., Jeon, S.G., 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., and *Takeda, K. (2013) ENTPDase7 controls Th17 cell responses through regulation of luminal ATP in the small intestine. *J. Immunol.* 190, 774-783. (査読有)
 15. Saiga, H., Kitada, S., Shimada, Y., Kamiyama, N., Okuyama, M., Makino, M., Yamamoto, M. and *Takeda, K. (2012) Critical role of AIM2 in Mycobacterium tuberculosis infection. *Int. Immunol.* 24, 637-644. (査読有)
 16. Kayama, H., and *Takeda, K. (2012) Regulation of gut homeostasis by innate immunity. *Int. Immunol.* 24, 673-680. (査読有)
 17. Kinoshita, M., Kayama, H., Kusu, T., Yamaguchi, T., Kunisawa, J., Kiyono, H., Sakaguchi, S. and *Takeda, K. (2012) Dietary folic acid promotes survival of Foxp3⁺ regulatory T cells in the colon. *J. Immunol.* 189, 2869-2878. (査読有)
 18. Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J. S., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., Ohshima, J., Kayama, H., Okamoto, T., Huang, D. C. S., Soldati-Farve, D., Horie, K., Takeda, J. and *Takeda, K. (2012) A cluster of IFN- γ -inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 37, 302-313. (査読有)
 19. Vandenberg, A., Teraguchi, S., Akira, S., Takeda, K. and *Standley, D. (2012) Toll-like receptor signaling. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 4, 497-507. (査読有)
 20. Jeon, S. G., Kayama, H., Ueda, Y., Takahashi, T., Asahara, T., Tsuji, H., Tsuji, N. M., Kiyono, H., Ma, J. S., Kusu, T., Okumura, R., Hara, H., Yoshida, H., Yamamoto, M., Nomoto, K. and *Takeda, K. (2012) Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathogens* 8, e1002714. (査読有)
 21. Kayama, H., Ueda, Y., Sawa, Y., Jeon, S. G., Ma, J. S., Okumura, R., Kubo, A., Ishii, M., Okazaki, T., Murakami, M., Yamamoto, M., Yagita, H. and *Takeda, K. (2012) Intestinal CX₃C chemokine receptor 1^{high} (CX₃CR1^{high}) myeloid cells prevent T cell-dependent colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 5010-5015. (査読有)
- 〔学会発表〕(計 22件)
1. 竹田潔、粘膜免疫システムの理解に向けて：腸管炎症を標的とした解析、日本薬学会第135年会、2015年3月28日、神戸
 2. Kiyoshi Takeda、Regulation of gut homeostasis: implication of the pathogenesis of inflammatory bowel diseases、The 4th NIF Winter School on Advanced Immunology, Jan 18-23, 2015, Singapore
 3. Kiyoshi Takeda、Regulation of antibody responses in the appendix、2nd Hengstbergewr Symposium on “Microbial sensors in the B lymphocyte response”, Jan 7-8, 2015, Heidelberg, Germany
 4. 竹田潔、腸内細菌の免疫系や疾患との関

- わり、42nd JSI Annual Meeting Dec. 10-12, 2014, 京都
5. 竹田潔、消化管粘膜の免疫応答機構とその異常、第56回歯科基礎医学会学術大会、2014.9.26、福岡
 6. Kiyoshi Takeda、 Regulation of gut homeostasis through segregation of microbiota and colonic epithelia、 The 13th Awaji Forum on Infection and Immunity, Sep. 23-25, 2014, Nara, Japan
 7. 竹田潔、腸管炎症の制御機構の解析、第29回日本乾癬学会、2014. 9.19-20、高知
 8. 竹田潔、上皮・免疫・腸内環境による腸管恒常性の維持と炎症性腸疾患、第35回日本炎症再生医学会、2014. 7. 2-4、沖縄
 9. 竹田潔、感染症とサイトカインシグナル、第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会、2014. 6. 19-20、札幌
 10. 竹田潔、腸管免疫と炎症制御、第56回日本老年医学会学術集会、2014. 6. 13-14、福岡
 11. Kiyoshi Takeda、 Host-microbial interplay. 42nd JSI Annual Meeting Dec. 11-13, 2013, Chiba
 12. 竹田潔、慢性疼痛の病態理解のための免疫・炎症メカニズム、第6回日本運動器疼痛学会、2013年12月7 - 8日、神戸
 13. Kiyoshi Takeda、 Regulation of gut homeostasis by innate immunity、 The 2013 Fall Conference of the Korean Association of Immunologists 2013. Nov. 7-8, Seoul, Korea
 14. 竹田潔、腸管免疫の謎を解く、日本消化器病学会 2013、2013年10月11日、東京
 15. 竹田潔、腸内環境因子と炎症性腸疾患—基礎研究の立場から—、第50回日本消化器免疫学会総会、2013年8月1-2日、東京
 16. 竹田潔、免疫系と腸管環境相互作用による腸管炎症の制御機構、第34回日本炎症・再生医学会、2013年7月2 - 3日、京都
 17. 竹田潔、自然免疫系による腸管炎症の制御機構、第19回日本ヘリコバクター学会学術集会、2013年6月28 - 29日、長崎
 18. Kiyoshi Takeda、 Innate immune responses and gut homeostasis、 The 33rd Korean College of Rheumatology Annual Scientific Meeting、 May 10-11, 2013, Seoul, Korea
 19. Kiyoshi Takeda、 Regulation of gut homeostasis by innate immunity、 Immunology 2013, May3-7, 2013, Hawaii, USA
 20. Kiyoshi Takeda、 Regulation of gut homeostasis by innate immunity、 International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting 2012, October 23-26, 2012, Tokyo
 21. 竹田潔、腸管免疫と炎症制御、第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2012年7月20日、福岡

22. 竹田潔、プロバイオティクス細菌による腸管免疫制御機構、第12回日本抗加齢医学会総会、2012年6月24日、横浜

〔図書〕(計 0件)

〔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
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/ongene/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹田 潔 (TAKEDA, Kiyoshi)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20309446

(2)研究分担者

(3)連携研究者

吉田 優 (YOSHIDA, Masaru)
神戸大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：00419475