

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860375

研究課題名(和文) 濾胞性ヘルパーT細胞の抗原特異性が腸管IgA産生に与える影響の検討

研究課題名(英文) The influence of TCR specificity of T follicular helper cells on gut IgA production

研究代表者

河本 新平 (KAWAMOTO, SHIMPEI)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：40612081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞として知られるFoxp3+ T細胞が、腸内細菌叢の中でも、特にClostridium属の腸内細菌の多様性を維持する上で非常に重要な役割を果たしていることを明らかにした。Foxp3+ T細胞の制御により適切な選択を受けた腸管IgAは、バランスのとれた腸内細菌叢の形成に影響し、逆に、このようにして形成された多様かつバランスのとれた腸内細菌叢は、腸管におけるFoxp3+ T細胞や腸管IgAの産生を効率的に誘導することがわかった。よって、Foxp3+ T細胞、腸管IgAおよび腸内細菌叢の間には相互制御ループが形成されており、それにより宿主と腸内細菌叢の共生関係が維持されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Foxp3+ T cells play a critical role for the maintenance of immune tolerance. We show that in mice, Foxp3+ T cells contributed to diversification of gut microbiota, particularly of species belonging to Firmicutes, Clostridia. Diversified and selected immunoglobulin A (IgA)s, which are regulated by Foxp3+ T cells in germinal centers (GCs) of Peyer's patches, contributed to maintenance of diversified and balanced microbiota, which in turn facilitated the expansion of Foxp3+ T cells, induction of GCs, and IgA responses in the gut through a symbiotic regulatory loop. Thus, the adaptive immune system, through cellular and molecular components that are required for immune tolerance and through the diversification as well as selection of antibody repertoire, mediates host-microbial symbiosis by controlling the richness and balance of bacterial communities required for homeostasis.

研究分野：腸管免疫

キーワード：免疫グロブリンA 腸内細菌叢 Foxp3+T細胞 濾胞性ヘルパーT細胞 濾胞制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸管内腔には、総数 100 兆個、1000 種類にも及ぶ腸内細菌が、ただ一層の上皮細胞層に隔てられて存在している。腸内細菌叢は、食餌成分の消化の補助や、病原菌の侵入や定着の阻止など、宿主にとって有益な役割を果たしつつ、宿主免疫系と密接な相互作用を形成している。宿主と腸内細菌の共生関係を維持する上で、免疫グロブリン A (IgA) は、非常に重要な役割を果たしていることが知られている。IgA は、主にパイエル板の胚中心において濾胞性ヘルパー T 細胞 (T_{FH} 細胞) 依存的に産生される。実際に、申請者らのこれまでの研究により、 T_{FH} 細胞の機能欠陥が、胚中心内における IgA 選択の低下、すなわち IgA の質的劣化 (腸内細菌への結合力の低下) を生じさせ、腸内細菌叢のバランス破綻、さらには全身免疫系の過剰な活性化につながるということが明らかとなっている。

(2) 制御性 T 細胞として知られる $Foxp3^+$ T 細胞は、腸内細菌叢のバランスに影響を与えていることが指摘されている。実際に、 $Foxp3^+$ T 細胞のうち、腸内細菌由来の抗原によって誘導される $Foxp3^+$ T 細胞サブセットが腸管において欠失することにより、 T_H2 型の炎症が誘発され、腸内細菌叢の構成に変化が生じることが報告されている。興味深いことに、 $Foxp3^+$ T 細胞はパイエル板において T_{FH} 細胞に分化することで、腸管 IgA 産生に関与していることが示されており、さらに、抗 CD25 抗体を投与することで $Foxp3^+$ T 細胞を生体内で除去すると、腸管における特異的な IgA 応答が消失することが報告されている。以上の結果をふまえて、 $Foxp3^+$ T 細胞と腸管 IgA を中心として腸内細菌叢のバランスが維持されている可能性が考えられた。しかしながら、 $Foxp3^+$ T 細胞および腸管 IgA がどのように宿主と腸内細菌叢との間の相互作用を制御しているのかに関しては不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、 $Foxp3^+$ T 細胞と腸管 IgA に注目し、これら 2 つの因子がどのように作用することで腸内細菌叢のバランスを制御しているのか、また逆に、腸内細菌叢がこれらの因子にどのような影響を与えているのかについて明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) T 細胞移植マウスの作製

$Foxp3^+$ T 細胞を含む種々の T 細胞が、IgA 及び腸内細菌叢に与える影響を検討するため、T 細胞欠損マウス (CD3 α 欠損マウス) に T 細胞を移植した「T 細胞移植マウス」を作製した。T 細胞移植をして 2-3 ヶ月経た後に、マウスの解析を行った。

(2) 腸内細菌叢の解析

マウスの盲腸内容物から DNA 抽出を行い、

腸内細菌由来の 16S rRNA の塩基配列を次世代シーケンサーにより解析することで、腸内細菌叢の多様性及び構成を検討した。

(3) 腸内細菌に対する IgA の結合性の検討

IgA がどのような腸内細菌に結合しているのかを明らかにするため、セルソーターを用いて、糞便中に含まれる、IgA が結合している腸内細菌を単離し、さらに、次世代シーケンサーを用いて、単離した腸内細菌の 16S rRNA の塩基配列を解析することで、IgA が結合している腸内細菌の種類を同定を行った

(4) 腸内細菌叢移植マウスの作製

腸内細菌叢が腸管免疫系に与える影響を検討するため、T 細胞移植マウスより得られた糞便を無菌マウスに経口投与した「腸内細菌叢移植マウス」を作製した。投与してから 2 週間後にマウスの解析を行った。

4. 研究成果

(1) 腸内細菌叢のバランスを維持する上で獲得免疫系が果たす役割の解明。

バランスのとれた腸内細菌叢を形成する上で、免疫系がどのような役割をはたしているのかを明らかにするため、免疫系が機能していないさまざまな免疫不全マウスの腸内細菌叢を解析した。その結果、すべての免疫不全マウス、すなわち T 細胞欠損マウス (CD3 ϵ 欠損マウス)、B 細胞欠損マウス (μ MT マウス) およびリンパ球欠損マウス (Rag 欠損マウス) において、腸内細菌叢の多様性が正常マウスに比べて有意に低いことが明らかとなった。また、これらの免疫不全マウスの腸内細菌叢の構成を正常マウスと比較したところ、正常マウスとは明らかに異なる腸内細菌叢の構成を持っていることが明らかとなった。よって、宿主免疫系の中でも獲得免疫系が腸内細菌叢のバランス、すなわち多様性や構成を維持する上で非常に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(2) $Foxp3^+$ T 細胞が *Clostridium* 属細菌の多様性形成に関与していることを発見。

T 細胞欠損マウスに種々の T 細胞を移植する系を用いて、どの T 細胞が腸内細菌叢のバランスを形成する上で重要な役割を果たしているのかを検討した。ナイーブ T 細胞 ($Foxp3^+$ CD25 $^{-}$ T 細胞) を移入したところ、腸管において顕著な炎症が確認され、移植する前の T 細胞欠損マウスと比較して、腸内細菌叢の多様性が有意に減少した。一方で、ナイーブ T 細胞と $Foxp3^+$ T 細胞を同時に移入したマウスにおいては、腸管の炎症が抑制され、腸内細菌叢の多様性も正常マウスと同等の水準にまで回復した。非常に興味深いことに、 $Foxp3^+$ T 細胞のみを移植した場合においても、腸内細菌叢の多様性が正常マウスと同様の水準にまで回復することが明らかとなった。以上の結果から、 $Foxp3^+$ T 細胞が腸内細菌叢

の多様性形成において重要な役割を果たしていることが示唆された。

Foxp3⁺T 細胞が、腸内細菌叢の多様性だけでなく腸内細菌叢の構成にどのように影響を及ぼしているのかを明らかにするため、Foxp3⁺T 細胞を移植したマウスの腸内細菌叢の構成の詳細な解析を試みた。Foxp3⁺T 細胞を移植したマウスにおいては、T 細胞欠損マウスやナイーブT細胞を移植したマウスと比較して、腸内細菌叢の中でも *Firmicutes* 門の *Clostridium* 属細菌、特に *Clostridium* クラスタ XIVa、クラスタ VI、クラスタ XVIII に属する腸内細菌の多様性が有意に増加していることが明らかとなった。これらのクラスタに属する *Clostridium* 属細菌は、これまでの研究により、腸管における Foxp3⁺T 細胞の誘導に関与していることが報告されている。本結果は、*Clostridium* 属細菌が Foxp3⁺T 細胞の誘導に影響を与えているという報告とは逆に、Foxp3⁺T 細胞が *Clostridium* 属細菌の多様性形成および増殖に影響を及ぼしていることを強く示唆している。よって以上の結果から、*Clostridium* 属細菌と Foxp3⁺T 細胞の間には、お互いに影響し合う相互作用が形成されていることが新たに明らかとなった。

(3) Foxp3⁺T 細胞は腸管 IgA を介して腸内細菌叢を制御していることを解明。

Foxp3⁺T 細胞は、主に2つの方法により腸内細菌叢に影響を及ぼしている可能性が考えられた。まず、Foxp3⁺T 細胞は、Foxp3⁺T 細胞の増殖やこれらのT細胞より産生される炎症性サイトカインの産生を抑制することで、腸管の炎症を抑え、腸内細菌叢を制御している可能性が考えられる。さらに、Foxp3⁺T 細胞は、パイエル板の胚中心内部において、T_{FR}細胞もしくは濾胞制御性T細胞(T_{FR}細胞)として機能することで、IgA 産生に関与し、腸内細菌叢を制御している可能性が考えられた。

そこで、Foxp3⁺T 細胞が腸管 IgA を介して腸内細菌叢に制御を与えている可能性を検討するため、Foxp3⁺T 細胞を CD3ε/AID 欠損マウスに移植し、移植後の腸内細菌叢を検討することにした。このマウスは、腸管 IgA 産生に必須の酵素である AID を欠損しているため、Foxp3⁺T 細胞を移植しても腸管 IgA を産生することができない。Foxp3⁺T 細胞を CD3ε欠損マウスに投与した場合には、移植前の CD3ε欠損マウスと比較して腸内細菌叢の多様性が大きく増加していたのに対し、Foxp3⁺T 細胞を CD3ε/AID 欠損マウスに移入した場合には、移植前の CD3ε/AID 欠損マウスと比較して腸内細菌叢の多様性に増加は見られなかった。よって、Foxp3⁺T 細胞は、腸管 IgA の産生を介して腸内細菌叢の多様性形成に影響を与えていることが明らかとなった。

(4) 腸内細菌叢のバランス形成における T_{FR}

細胞の機能の解明。

T_{FR}細胞および T_{FR}細胞の分化には、転写因子である Bcl6 の発現が必須であることが知られている。そこで、Bcl6 の機能に異常をもつ Bcl6^{yfp/yfp} マウスより単離した Foxp3⁺T 細胞と正常マウスより単離したナイーブT細胞を 1:1 の割合で T 細胞欠損マウスに移植し、T_{FR}細胞欠損マウスを作製した。

非常に興味深いことに、T_{FR}細胞欠損マウスにおいては、パイエル板における腸管 IgA の選択に問題が生じ、腸内細菌に対する結合性に変化が生じていることが明らかとなった。実際に、正常マウスやこれらの移植マウスの糞便より精製した腸管 IgA の腸内細菌に対する結合性を確認したところ、正常マウスや Foxp3⁺T 細胞を移植したマウスにおいて産生される腸管 IgA と比較して、IgA が、腸内細菌の種類に関係なく非特異的に結合する傾向が見られた。さらに、こうした腸管 IgA の質的变化により、T_{FR}細胞欠損マウスにおいては、腸内細菌叢の多様性が移植前の T 細胞欠損マウスと比べて回復せず、腸内細菌叢の構成も正常マウスなどと比べて明らかに異なっていた。よって以上の結果から、Foxp3⁺T 細胞は、T_{FR}細胞に分化することでパイエル板における腸管 IgA 産生を制御し、腸内細菌叢のバランス形成に影響を与えていることが明らかとなった。しかし、T_{FR}細胞がどのようなメカニズムで IgA 産生に影響を及ぼしているのか詳細にわかっておらず、今後さらなる検討を必要とする。

(5) バランスのとれた腸内細菌叢が効果的な腸管免疫系の誘導に重要であることを新たに発見。

多様性の異なる腸内細菌叢を無菌マウスに定着させ、腸管免疫系にどのような影響が生じるのかについて検討した。

その結果、Foxp3⁺T 細胞移植マウスより得られた多様性の高い腸内細菌を投与したマウスにおいては、ナイーブT細胞移植マウスより得られた多様性の低い腸内細菌を投与したマウスと比較して、腸管における IgA 産生と Foxp3⁺T 細胞の誘導がより効率よく行われることが明らかとなった。さらに興味深いことに、これらの腸内細菌叢を無菌マウスだけでなく、通常的环境下で飼育されている3週齢のマウスに投与しても、多様性の高い腸内細菌叢を投与した際に効率のよい腸管 IgA 産生が確認された。以上の結果から、すでに腸管内に腸内細菌叢が存在している状態においても、外部からの腸内細菌叢の投与によって腸内細菌叢の構成および免疫系に影響を与えること、さらに、バランスのとれた多様性の高い腸内細菌叢が Foxp3⁺T 細胞や IgA の産生といった効果的な腸管免疫系の形成に有効であることが明らかとなった。

以上の結果から、免疫系による腸内細菌叢のバランス制御と、腸内細菌叢のバランスによる免疫系の制御という双方向の制御によ

って健康が保たれているという新しい概念が示され、さらに、外部からの腸内細菌叢の投与で人為的に腸内細菌叢および免疫系を制御できる可能性が示唆された。本成果は、腸内細菌が影響を及ぼすと考えられるさまざまな疾患の予防や、新規治療法を考える上で非常に役立つと期待される。

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4件)

Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin A selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis.

Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, Suda W, Atarashi K, Doi Y, Tsutsui Y, Qin H, Honda K, Okada T, Hattori M, Fagarasan S. *Immunity*, 査読有, 41(1), 152-65, 2014

The role of the adaptive immune system in regulation of gut microbiota.

Kato LM, Kawamoto S, Maruya M, Fagarasan S. *Immunol Rev*, 査読無(編者による査読有), 260(1), 67-75, 2014

Gut TFH and IgA: key players for regulation of bacterial communities and immune homeostasis.

Kato LM*, Kawamoto S*, Maruya M, Fagarasan S. (* equal contribution) *Immunol Cell Biol*, 査読無(編者による査読有), 92(1), 49-56, 2014.

Impaired selection of IgA and intestinal dysbiosis associated with PD-1-deficiency.

Maruya M, Kawamoto S, Kato LM, Fagarasan S.

Gut Microbes, 査読無(編者による査読有), 4(2), 165-71, 2013.

[学会発表](計6件)

Foxp3+T細胞および免疫グロブリンAによる腸内細菌制御機構

河本新平

Midwinter Seminar 2015、2015年2月25-28日、「ANA インターコンチネンタル万座ビーチホテル(沖縄県、国頭郡恩納村)」

Symbiotic regulatory loop between Foxp3+ T cells, IgA and gut microbiota.

KAWAMOTO Shimpei, MARUYA Mikako, KATO M Lucia, ATARASHI Koji, HONDA Kenya, OKADA Takaharu, FAGARASAN Sidonia

第43回日本免疫学会学術集会、2014年12月10-12日、「京都国際会議場(京都府京都市)」

Foxp3+T細胞、IgA及び腸内細菌叢の間に見

られる相互制御ループの解明

河本新平

第42回日本臨床免疫学会総会、2014年9月25日、「京王プラザホテル(東京都、新宿区)」

腸内細菌叢と腸管免疫

河本新平

第56回日本老年医学会学術集会、2014年6月12-14日、「福岡国際会議場(福岡県、福岡市)」

Foxp3+ T細胞、IgA及び腸内細菌叢の間に見られる相互制御ループの解明

河本新平

第23回東京免疫フォーラム、2014年2月24日、「東京大学医科学研究所(東京都港区)」

The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut.

KAWAMOTO Shimpei, TRAN H Thinh, MARUYA Mikako, SUZUKI Keiichiro, DOI Yasuko, TSUTSUI Yumi, KATO M Lucia, FAGARASAN Sidonia

15th International Congress of Immunology、2013年8月22-27日、「ミラノ(イタリア)」

[図書](計1件)

腸管IgA産生におけるPD-1の役割

河本新平、Fagarasan Sidonia

医学のあゆみ、査読無、246巻4号、320-322、2013.

[産業財産権]

特になし

[その他]

ホームページ等

http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140711_1/digest/

6. 研究組織

(1)研究代表者

河本新平(KAWAMOTO, Shimpei)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号: 40612081

(2)研究協力者

丸谷美香子

加藤ルシア