

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860818

研究課題名(和文)腸内細菌によるネガティブセレクションへの関与

研究課題名(英文)Commensal bacteria regulate thymic Aire expression

研究代表者

中島 章人(Nakajima, Akihito)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30439294

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)：腸内細菌は腸管内の免疫系の維持に重要な役割を果たしているだけでなく、全身の免疫系に対しても重要な影響を与えている。本研究では腸内細菌が腸管とは遠隔の臓器である胸腺にも影響を及ぼしているかを、胸腺上皮細胞特異的に発現している転写因子autoimmune regulator (Aire)の発現量の解析を介して検討した。その結果、腸内細菌由来の免疫活性物質であるペプチドグリカンとStaphylococcal Enterotoxin BがAireを誘導することが明らかになった。この研究成果は腸管と胸腺という免疫系の重要な2つの臓器が腸内細菌由来の産物によってリンクしていることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：Commensal bacteria are reported to function as an environmental factor to regulate intestinal inflammation and immune responses. However, it remains largely unknown whether such bacterial function exerts any effect on other immune organs distant from the intestine. In this study, the influence of commensal bacteria in the thymus was investigated using germ-free mice and Nod1-deficient mice lacking an intracellular recognition receptor for certain bacterial components. Interestingly, autoimmune regulator (Aire) expression in thymic epithelial cells (TECs) was decreased in comparison to specific pathogen-free mice and Nod1 wild-type mice, respectively. The in vitro analysis using a fetal thymus organ culture system showed that Aire expression in TECs was increased in the presence of a bacterial component or a bacterial product. These results suggest that through their products, commensal bacteria have potential to give some effect on the epithelial cells of thymus.

研究分野：免疫学

キーワード：Aire commensal bacteria thymic epithelial cell peptidoglycan superantigen

1. 研究開始当初の背景

腸管内には数百種類もの腸内細菌が宿主と共生しており、腸内の免疫系の発達やバランスに関与しているとされている。これまでの研究は主に「腸内環境にメリットをもたらす腸内細菌の作用」に限定されていたが、最近では、腸内細菌は腸管内だけではなく、全身の免疫系にも影響を及ぼすことが示唆され始めている。たとえば代表的な自己免疫疾患である 1 型糖尿病を自然発症するモデルマウスは、通常の SPF 飼育環境下よりも腸内細菌がない germ free (GF) 環境下で飼育した方が糖尿病の発症が早く、重篤化することが発表された。腸内細菌叢の変化は、糖尿病のほかにも、喘息、アトピーを含む様々な自己免疫疾患やアレルギー疾患への関与が指摘されている。しかし、その詳しいメカニズムは不明なままである。

このような腸内細菌による腸管外の免疫系に及ぼす影響を明らかにするために、私たちは腸内細菌が胸腺に及ぼす影響に焦点を当てて研究を進めることにした。胸腺は T 細胞を産生するとともに自己反応性 T 細胞を選択的に排除する機構 (ネガティブセレクション) をもち、免疫の中核となるべき臓器であるが、腸内細菌との関わりは全く明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

腸内細菌は腸の病気だけでなく、全身の様々な病気に関わる。その中で特にリウマチ、1 型糖尿病、多発性硬化症などは自己免疫疾患と呼ばれ、免疫の異常によって引き起こされる病気である。自己免疫疾患の原因の一つとして胸腺での T 細胞選択の異常があげられる。T 細胞は胸腺で分化・成熟していく過程の中で、自己と反応する T 細胞クローンはネガティブセレクションによって胸腺内で消去される。ネガティブセレクションに異常があると、自己に反応する T 細胞が末梢に出て

自己免疫疾患が起きる。このことから著者らは、自己免疫疾患の発症に腸内細菌が関与しているならば、腸内細菌は胸腺内での T 細胞選択にも影響している可能性があるのではないかと、すなわち腸内細菌は腸管免疫だけでなく免疫の中核である胸腺にも影響を与えていることがあるのではないかと考えた。

そこで本研究では、胸腺のネガティブセレクションの誘導に関与する重要な転写因子である autoimmune regulator (Aire) に着目した。Aire は胸腺上皮細胞 (thymic epithelial cell: TEC) に特異的に発現している転写因子で、様々な自己抗原を発現させることで胸腺髄質での自己反応性 T 細胞を取り除くネガティブセレクションに重要な役割を果たすことが明らかにされているが、詳しい発現制御のメカニズムは分かっていない。一般的に自己免疫疾患の原因として遺伝的な要因のほかに環境因子が重要と考えられていることから、腸内細菌が有力な自己の環境因子として Aire の発現を調節しているのではないかと考えた。本研究では、腸内細菌が Aire 遺伝子の発現に関与するかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 腸内細菌が欠損した無菌マウス (Germ free: GF マウス) と Nod1 欠損 (Nod1^{-/-}) マウスを用いての Aire の発現解析

腸内細菌が Aire に及ぼす影響を研究するために腸内細菌が欠損した GF マウスを用いた。SPF 化マウスは GF マウスの同腹仔の半分を生後直後に SPF に移し SPF マウスの仮親に育てさせて作製した。実験では GF マウスの同腹仔の SPF 化マウスと GF マウスとを比較した。Nod1^{-/-} マウスの解析では、5 週齢での同ケージ内で飼育された同腹仔の Nod1^{+/+} マウスとの比較を行った。

(2) TEC 細胞の採取と発現解析

TEC は非常に少ない細胞であるため、TEC

を採取するために、胸腺をコラゲナーゼ D 処理して細胞調整した後、まずは自動磁気分離装置(オートマックス)を使って CD45⁺細胞を大部分取り除いた。その後、Aire の real-time PCR 解析を行うときは、セルソーターを使って MHC class II⁺CD45⁺細胞を採取した。Aire のタンパク発現の解析を行う場合は、オートマックスで CD45⁺細胞を除いた後、MHC class II 抗体、CD45 抗体、UEA-1 抗体で染色し、その後、細胞を fixation して Aire 抗体で染色し、フローサイトメータを用いて MHC class II⁺CD45⁺UEA-1⁺分画における Aire の発現を解析した。

(3) 胎児胸腺臓器培養 (fetal thymus organ culture: FTOC)

E17 の胎児マウスから胸腺を摘出し、メンブレンの上にのせ RPMI で培養した。PGN の合成リガンドである C12-iE-DAP、もしくはスーパー抗原である SEB 存在下で 3 日間培養し、胸腺上皮細胞を採取して Aire の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) GF マウスでは Aire の発現が低下する

GF マウスと GF マウスの同腹仔で出生直後に SPF 環境下に移して飼育した SPF 化マウスとで、全胸腺細胞数、CD4⁺細胞、CD4⁺CD8⁺細胞の数や割合、さらには T 細胞受容体の V_H レパトアに大きな差はなかった。次に、TEC に特異的に発現する Aire 遺伝子を GF マウスと SPF 化マウスの胸腺から比較した。Aire は TEC 細胞の中で転写因子として働き、数多くの臓器特異的自己抗原を発現させて自己反応性 T 細胞の除去、すなわちネガティブセレクションに関与するとされている。実験結果から、real-time PCR による解析では GF マウスの方が SPF 化マウスよりも有為で Aire の発現が低く、フローサイトメータの解析においても、Aire が発現している髄質胸腺上皮細胞 (mTEC) の割合や数は変わらないものの、Aire

の発現が低下していることが明らかになった。この結果は、腸内細菌の有無によって mTEC 細胞 1 つあたりに発現している Aire の発現量に差が認められることを示唆している。そこで次に、腸内細菌がどのようにして胸腺 Aire の発現誘導に関わるのかを検討した。

(2) Nucleotide-binding oligomerization domain protein 1 (Nod1) 欠損マウス (Nod1^{-/-}) においても Aire の発現は低下する

GF マウスで Aire の発現量が低下したことから、何らかの腸内細菌由来の産物が胸腺 Aire の発現誘導に関与しているのではないかと考えた。それを確かめるため、血中にわずかに漏れ出ている腸内細菌由来の代謝産物や微量なエンドトキシンを手がかりにすることにした。血中に漏出した腸内細菌の成分は腸管外であっても Toll 様受容体や Nod タンパクなどのパターン認識受容体によって認識され、免疫反応に関与することがある。Nod1 は NOD-like receptor protein family に属する細胞内タンパクで、細胞内に侵入した(取り込まれた)細菌の成分であるペプチドグリカン (Peptidoglycan, PGN) を認識する。PGN はグラム陽性菌、グラム陰性菌ともに細胞壁を構成する成分であり Nod1 特異的に認識されるリガンドとなりうる。過去の報告でも、腸内細菌由来の PGN が骨髄中の好中球に発現する Nod1 を介して、細菌感染時の好中球の活性化に重要であるということが報告されている。通常飼育下で 5 週齢の Nod1^{-/-} マウスでは、同ケージの同腹仔の野生型マウスと比べて Aire の発現が遺伝子レベル、タンパクレベルにおいて低下が認められた。フローサイトメータの解析から、Aire の発現は mTEC 細胞において 2 峰性になっており、特に発現ピークの弱い方で大きく差が認められた。さらに、Aire 依存的に転写される自己抗原として知られている複数の遺伝子の発現を調べた

ところ、Nod1^{-/-}マウスにおいて発現量が低下しており、Aire 非依存的な遺伝子の発現は低下していなかった。GF マウスで見られた Aire の低下は腸内細菌の欠損によるものであり、Nod1^{-/-}マウスで見られた Aire の発現低下は、腸内細菌の細菌成分である PGN のレセプターが欠損していることによるものと考えた。これらの結果は、腸内細菌由来の PGN が TEC において Aire の発現誘導に関わっている可能性を示唆している。

(3) Nod1 リガンドは胸腺 Aire を直接誘導する

上記のマウスを用いた in vivo の結果から、PGN が胸腺 Aire の誘導に関わることが示唆されたため、次に in vitro の実験系において PGN が Aire を発現誘導するか検証を行った。E17 の胎児胸腺を胎児胸腺組織培養 (FTOC) のシステムで、Nod1 合成リガンドである C12-iE-DAP 存在下で培養した。48 時間後、TEC に発現する Aire を real-time PCR とフローサイトメータで解析したところ、C12-iE-DAP 存在下で上昇していた。Aire の発現誘導のメカニズムはいまだに不明な点が多いが、T 細胞が発現する RANKL が TEC の発現する RANK に結合して Aire を発現誘導することが示されている。そこで、C12-iE-DAP が T 細胞の RANKL を介して TEC の Aire を発現誘導したのか、あるいは TEC に直接働きかけて Aire を誘導したのかを検討した。FTOC において、デオキシグアノジンを数日間処理すると T 細胞のみを死滅させることができることが知られているので、デオキシグアノジンで処理して T 細胞を除去した後、C12-iE-DAP 存在下で培養した。その結果、T 細胞を除去しても Aire の発現は上昇しており、フローサイトメータ解析においても、C12-iE-DAP 濃度依存的に Aire の発現上昇が認められた。このことから、C12-iE-DAP は TEC の Nod1 に直接結合して Aire を発現誘導した可能性が示唆された。Aire の発現誘導は

まだ分からないことが多く、これまでに T 細胞の RANKL や CD40L を介するという報告があるが、Nod1 リガンドが直接 TEC の Nod1 を介して Aire を発現誘導するという経路は初めての報告となった。

(4) SEB は RANK-RANKL 依存的に Aire を誘導する

次に、腸内細菌が胸腺 Aire を発現誘導させるメカニズムとして、腸内細菌の成分で PGN 以外の可能性を検討した。Staphylococcus aureus が産生する Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) は微量に存在するスーパー抗原として知られており、胸腺の中では TCR の鎖と TEC の MHC 鎖と結合し、その結果 TCR と MHC の結合による強力な TCR シグナルが誘導される。強力な TCR シグナルは T 細胞にネガティブセレクションを誘導するが、同時に T 細胞上に RANKL の発現も誘導する。ネガティブセレクションを免れた T 細胞は TEC に RANKL を提示し、TEC に発現する RANK と結合することで、RANK-RANKL 経路によって TEC における Aire の発現を上昇させるのではないかと考えた。そこで、FTOC の系を用い、E17 の胎児胸腺を SEB 存在下で培養し、Aire の発現を検討した。48 時間の SEB 刺激を加えることにより多くの T 細胞は死滅するが、TEC 細胞の数には変わりなかった。TEC に発現する Aire を検討したところ、real-time PCR にて、Aire の発現上昇が認められた。次に RANKL が Aire の発現誘導に関与しているか確認するため、RANKL のブロッキング抗体を SEB とともに FTOC に加えて培養したところ、Aire の発現は低下した。このことから、スーパー抗原である SEB 刺激により T 細胞に RANKL が誘導され、RANK-RANKL の経路によって TEC において Aire が誘導されたことが示唆された。以上の結果をまとめると、胸腺 Aire の発現誘導に関わる腸内細菌由来の産物として PGN と SEB を示し、PGN は TEC 細胞の Nod1 に直接作用し

て Aire を誘導する経路を、SEB は T 細胞の RANKL の誘導を介して Aire を誘導する経路を明らかにした。

今回の研究成果から、腸内細菌の新たな役割として、腸内細菌由来の PGN やバクテリア産物である SEB を介して、腸管とは遠隔臓器であり、免疫系の中核であるもある胸腺に特異的に発現する Aire の制御に影響していることを示すことができた。このことは腸内細菌が全身に及ぼす影響の新たな一例になると思われる。

今後更なる検討が必要であるが、今回の結果から腸管と胸腺という免疫をつかさどる上で重要な二つの臓器を腸内細菌の産物が結びつけ、Aire の発現調節を介して自己のトランスの維持や誘導に関与している可能性が示唆された。この研究成果が将来的にアレルギーや自己免疫疾患など難治性疾患の問題を解決する新たな糸口になるようにしたい。

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1件)

- 1) Nakajima A, Negishi N, Tsurui H, Kadowaki-Ohtsuji N, Maeda K, Nanno M, Yamaguchi Y, Shimizu N, Yagita H, Okumura K, Habu S. (2014) Commensal Bacteria Regulate Thymic Aire Expression. PLoS one 9: e105904. 査読あり

[学会発表](計6件)

2014年

- 1) Akihito Nakajima, Naoko Negishi, Hiromichi Tsurui, Naomi Ohtsuji-Kadowaki, Masanobu Nanno, Ko Okumura and Sonoko Habu, Commensal bacteria regulate thymic Aire expression. 第38回 **日本免疫学会**, 京都, 日本, December, 2014.

- 2) 第53回日本実験動物環境研究会、11月29日、東京、「腸内細菌と胸腺の知られざる関係」中島 章人

- 3) 第29回自己免疫疾患研究会、7月12日、東京、

「腸内細菌は胸腺上皮細胞の Aire の発現に影響する」中島 章人

2013年

- 4) Akihito Nakajima, Naoko Negishi, Hiromichi Tsurui, Naomi Ohtsuji-Kadowaki, Masanobu Nanno, Ko Okumura and Sonoko Habu, Commensal bacteria influence on thymic Aire expression. 第37回 **日本免疫学会**, 幕張, 日本, December, 2013.

- 5) Akihito Nakajima, Naoko Negishi, Hiromichi Tsurui, Naomi Ohtsuji-Kadowaki, Masanobu Nanno, Ko Okumura and Sonoko Habu, Commensal bacteria influence on thymic Aire expression. The 15th international congress of immunology, Milan, Aug, 2013.

- 6) Akihito Nakajima, Naoko Negishi, Hiromichi Tsurui, Naomi Ohtsuji-Kadowaki, Masanobu Nanno, Ko Okumura and Sonoko Habu, Commensal bacteria influence on thymic Aire expression. **KTCC**, Kyoto, June, 2013.

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 章人 (NAKAJIMA, Akihito)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30439294