

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830058

研究課題名(和文)腸内細菌による腸炎発症・腫瘍転移・感染防御の修飾における糖鎖認識受容体の役割解析

研究課題名(英文)The analysis of roles of C-type lectin receptors in commensal microbiota-mediated colitis development, tumorigenesis and host defence against bacteria-infection

研究代表者

唐 策 (TANG, CE)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・助教

研究者番号：00572166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究最も重要な成果は、糖鎖認識受容体C型レクチンDectin-1の腸管内シグナルを阻害すると、抗菌ペプチドを誘導できなくなるため腸内乳酸桿菌が過剰増殖し、炎症抑制に働く制御性T細胞が誘導され大腸炎の発症を抑制するという成果がCellの姉妹科学誌Cell Host & Microbe(微生物学領域の世界Topジャーナル)に掲載されたこと(Tang C. et al. Cell Host Microbe. 2015;18:183-97.)。更に新聞・テレビを介して研究成果を国民に発信したことに限らず、Dectin-1を標的とした大腸炎の治療を目的とする新薬の開発に重要な科学根拠を提供してある。

研究成果の概要(英文)：The most remarkable achievement in this scientific research is that we found that a member belonging to innate immune C-type lectin receptor family is involved in the regulation of special commensal bacterial population and further influence the development of intestinal inflammation. As the C-type lectin receptor family member, Dectin-1 has been known as the receptor recognizing fungal cell wall component, beta-glucan. In this study, we found that mice deficient with Dectin-1 gene showed drastic suppression of colitis compared with wild-type mice, and this inhibition of intestinal inflammation was caused by over-expansion of commensal Lactobacillus-induced inflammation-suppressing T cells. Treating the mice with Dectin-1-blocade ligand dramatically ameliorated colitis, and these results were published on Cell Host & Microbe (Tang C. et al. 2015;18:183-97) followed by reporting news in Japan. This study suggests a totally new strategy for IBD therapy by targeting on Dectin-1 signaling.

研究分野：粘膜免疫学、感染免疫学

キーワード：C型レクチン 腸内細菌叢 サイトカイン 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。悪性腫瘍、特に黒色腫は悪性最も高い皮膚、口腔粘膜上皮などに発生するメラノサイト由来の悪性腫瘍であり、正確な発生原因は不明である。欧米人の発生率が高く、予後もかなり不良である。結核菌感染症は結核桿菌の気道、消化道経路で肺、腸管の貪食細胞に定着、増殖した後免疫システムから宿主細胞もろとも攻撃するため、広範に組織が破壊され、放置すると重症を起こし高い頻度で宿主を死なせるという世界一の感染症である。それらの疾患に対する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

最近、腸内フローラと腸管免疫細胞の相互作用によって全身免疫システムに影響を及ぼすことが明らかになり、これらの疾患の発症・防御機構にも極めて重要であることが示唆される。そこで申請者は、糖鎖認識C型レクチン受容体 Dectin-1・Dectin-2 に注目し、炎症性腸疾患の発症・悪性黒色腫の転移そして結核菌ワクチン接種の記憶の修飾における腸管内フローラの Dectin-1・2 を介したシグナルの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モデル、黒色腫転移モデルそして結核菌ワクチン免疫モデルの *in vivo* 解析と腸内フローラのメタゲノム解析を組み合わせて行い、最終的には腸疾患・悪性腫瘍・感染症の予防、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

本研究では、第3のPRRであるCLRの中でも特に Dectin-1・2 に注目し、腸管内細菌叢による自然発症大腸炎および Th 細胞分化における Dectin-1・2 を介した獲得免疫系調節機構を明らかにする。そして、悪性黒色腫の転移・増殖、結核菌ワクチン接種による Th 応答・メモリーT細胞分化における Dectin-1/2 の役割を明らかにし、炎症性腸疾患、悪性腫瘍そして感染症の予防と治療法の開発などの創薬への応用を目指す。この際、細菌のメタゲノム解析、腸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。具体的には

- (1) 自然発症大腸炎による腸管 Th 細胞分化のバランス調節における Dectin-1/2 の役割と治療法の検討
- (2) 悪性黒色腫の転移・増殖における

Dectin-1/2 の役割と転移を防止・抑制治療法の開発

(3) 結核菌ワクチン接種による Th 応答・メモリーT細胞分化における Dectin-1/2 の役割検討と Dectin-1/2 アゴニストリガンド投与による結核菌の接種ワクチン効果の増強作用の検証

の4点について、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解明する。

4. 研究成果

平成26年度では、Dectin-1/2 の自然発症大腸炎による腸管 Th 細胞分化のバランス調節における役割の解析を行ったところ、ナイーブT細胞を Rag2-Dectin-1/2 二重欠損マウスに移入した後、Dectin-1 欠損マウスの自然大腸炎の発症は control に比べて緩和されることに対し、Dectin-2 欠損マウスでは顕著の変化が見られなかった。Rag2-Dectin-1 二重欠損マウスではナイーブT細胞が Treg、Th17 細胞により分化しやすくなることに対し、Th1 細胞に分化し難く、その原因は、Dectin-1 欠損マウスでは過剰増殖している腸内乳酸桿菌が Treg、Th17 の分化に重要なサイトカインである TGF- β を強く誘導することが分かった。無菌 Dectin-1 欠損マウスに SPF の野生型マウスの腸内フローラを定着させた後、一月立つと、無菌野生型マウスに比べ、腸内乳酸桿菌の量が20倍以上上昇し、この乳酸桿菌の定着・増殖は、腸管 Dectin-1 シグナルに強く制御されることが分かった。Dectin-2 欠損マウスは Dectin-1 欠損に比べて、腸内乳酸桿菌の変化が顕著でなく、腸管での発現を調べたところ、発現レベルが比較的に低いことから、Dectin-2 は腸管免疫・腸内フローラの制御には有意な役割を果たしていないのではないかと考えられる。Dectin-1 のリガンドである β -glucan フリー飼料を野生型マウスに投与したところ、野生型マウスの腸内乳酸桿菌の定着量が有意に上昇し、更に DSS 大腸炎を誘導したところ、control 群に比べて、有意に炎症の抑制効果が見られた。Dectin-1 欠損マウスの腸管以外の組織の Treg・Th17 を調べたところ、特に野生型マウスとは変化しなかったことから、Dectin-1 シグナル欠損による腸管 Treg/Th17 の上昇は腸管に限定されることが示唆された。

平成27年度において、本研究の重要な実績は、糖鎖認識受容体C型レクチンファミリーメンバーDectin-1 の腸管内シグナルを阻害することによって、抗菌タンパク・抗菌ペプチドを誘導できなくなるため腸内細菌の乳酸桿菌が過剰増殖し炎症抑制に働く制御性T細胞 Treg が誘導され大腸炎の発症を抑制するという前年度の研究内容を更に進んだ後、科学論文として投稿し、平成27年8月に Cell の姉妹科学誌 Cell Host & Microbe (微生物学領域の世界 Top ジャーナル) に掲載されることになっており (Tang C. et al. Cell Host

Microbe. 2015;18(2):183-97.) 論文の掲載と共に、研究内容を国内新聞社日本経済新聞、日刊工業新聞など合計6社に科学ニュースとして取り上げられ、日本テレビからの取材も受け、4月30日夜の番組「世界一受けたい授業」で研究内容を紹介した。

一方、平成27年の研究計画に従って、次の研究テーマにも順調に進んでいた。本研究当初に予定していたメラノーマ悪性黒色腫の転移肺がん転移モデルが、去年 e-Life という科学誌にほぼ同様な研究論文が掲載されたことを受け、前段階の研究に明らかになっていた Dectin-1 シグナルによる腸内細菌の変動が腸管恒常性の維持に重要であることに基づいてC型レクチン受容体Dectin-1の大腸がんの発症・発展における役割の解析に変更した。自然発症家族遺伝性大腸腺がんのマウスモデルであるがん関連遺伝子 APC の遺伝子 mutant マウスと Dectin-1 遺伝子欠損マウスと交配させることによって、腸管ポリープ、そして線がんの発症には Dectin-1 シグナルが関与していることが明らかとなった。一方、抗生物質投与による腸内細菌を除去しても発症程度には変化がなかったため、大腸炎の発症を増悪化するメカニズムとは異なり、Dectin-1 は腸内細菌の変動と無関係で大腸がんの発症に関与することも明らかとなった。平成27年度で、当初の計画に従い研究を実施した上で、前年度の研究内容を論文として発表し、更に新聞・テレビニュースを介して研究成果を国民に発信したことに限らず、Dectin-1 のシグナルを阻害する低分子量βグルカンを用いる腸内細菌・腸管恒常性の維持を目的とする健康食品の開発、そして Dectin-1 を標的とした大腸炎の治療・予防と目的とする新薬の開発に大変重要な科学根拠を提供し、社会還元・社会貢献に力になるため、当初の予定以上に進展していると考えている。

平成28年度において、前年度に実施した自然発症小腸ポリープモデル APCmin マウスと Dectin-1 遺伝子欠損マウスとの交配による小腸腸管ポリープの検証実験に基づいて、更にそれらのマウスに Dextran sulfate sodium salt を飲料水繰り返し投与によって誘導されていた家族遺伝性大腸腺がんのマウスモデルを用いて、Dectin-1 の腺がんの病態形成における役割を解析した。その結果、自然発症小腸ポリープのフェノタイプと真逆で、Dectin-1 欠損マウスでは大腸腺がんの発症は顕著に抑制されることを見出した。大腸腺がんの発症はがん遺伝子の異常発現と炎症環境は両方の存在が不可欠である。Dectin-1 欠損マウスでは、小腸と大腸の腸内細菌の組成がかなり違っていることを腸内細菌 ribosomal RNA のシーケンス解析によって明らかとなり、前年度に発見された腸管乳酸桿菌 *Lactobacillus murinus* は小腸ではなく、APCmin-Dectin-1 欠損マウスの大腸でしか過剰増殖していなかったことが分かった。その

乳酸桿菌の増殖は腸管炎症抑制に働く制御性T細胞の分化誘導を促進させることを前年度に分かったため、Dectin-1 シグナルが腸内細菌と腸管炎症の制御を介して大腸腺がんの形成を促進させることを明らかにした。現在、Dectin-1 シグナルのアンタゴニストの経口投与による大腸腺がんの予防そして治療効果の検証を実施しているところである。

一方、当初予定してある結核菌ワクチン BCG の接種によるT細胞応答における Dectin-1 の役割について解析を実施した。その結果、野生型マウスと比べて、Dectin-1 欠損マウスでは、統計学的に顕著な変化が見られなかった。その対策としては、今まで発表されたことがない全く新しいC型レクチン受容体ファミリーメンバーClecXx の遺伝子欠損マウスを用いて、BCG の接種実験を行い、Th1 細胞の誘導は ClecXx の欠損マウスでは有意に低下したことを見出した。現在、結核菌細胞表面のその受容体のリガンドを同定しているところであり、最終的にそのリガンドと受容体を標的とした新型結核菌ワクチンの開発に繋がる研究を達成すると考えている。

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2件)

1. Inhibition of Dectin-1 signaling ameliorates colitis by inducing *Lactobacillus*-mediated regulatory T cell expansion in the intestine. Tang C, Kamiya T, Liu Y, Kadoki M, Kakuta S, Oshima K, Hattori M, Takeshita K, Kanai T, Saijo S, and Iwakura Y. *Cell Host Microbe*. 2015 August 13; 18(2):183-97. (査読あり)

2. 《化学と生物》「セミナー室 腸内相互作用の理解に基づいた健康の増進・疾患の予防(2) 低分子βグルカン摂取により炎症性腸疾患を予防、改善する」

唐 策、角田茂、岩倉洋一郎 (査読あり、日本語総説) Vol. 55, No. 2, 2017, pp128-134

[学会発表](計6件)

国際学会発表:

1. International Congress of Immunology (ICI) 2016 Aug. 21-26, 2016, Melbourne, Australia

Oral presentation: (Symposia-Mucosal Immunology 3) Ce Tang, Tomonori Kamina, Yoichiro Iwakura. Inhibition of Dectin-1 signaling ameliorates colitis by inducing *Lactobacillus*-mediated regulatory T cell expansion in the intestine.

2. Third Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (ICIS)

Oct. 11-14, 2015, Bamberg, Germany

Oral presentation: S-5, short lecture. Ce Tang, Tomonori Kamina, Yoichiro Iwakura. Inhibition of Dectin-1 signaling ameliorates colitis by inducing *Lactobacillus*-mediated regulatory T

cell expansion in the intestine.

国内学会発表：

1 . 2017 糖鎖免疫研究会. 東京医科歯科大学 M&D タワー、東京. 2017 年 1 月 25 日. (招待講演) **唐策**

炎症性腸疾患と食物アレルギーの病態制御における Dectin-1 と短鎖βグルカンの役割の解析

2 . 第 45 回日本免疫学会学術集会. 沖縄コンベンションセンター. 2016 年 12 月 5-7 日. (口頭発表) **唐策** 1-A-W1-21-O/P

A novel role of Dectin-1 signaling in controlling food antigen-induced mouse intestinal allergy.

3 . 第 43 回日本免疫学会学術集会. 国立京都国際会館. 2014 年 12 月 10-12 日. (口頭発表)

唐策 Inhibition of Dectin-1 signaling ameliorates colitis by inducing *Lactobacillus*-mediated regulatory T cell expansion in the intestine.

4 . 第 61 回日本実験動物学会. 札幌コンベンショナルセンター. 2014 年 5 月. (口頭発表)

唐策

Dectin-1 シグナルを介するマウス腸管炎症の抑制による新規な腸疾患治療法開発.

〔図書〕(計 2 件)

1 . 《サイトカイン・増殖因子キーワード事典》第一章 インターロイキン

IV . その他の受容体を介して作用するサイトカイン

2 2 . IL-23/35 **唐策**、岩倉 洋一郎

2015 年 4 月、pp72-74、日本国内発行

ISBN 978-4-7581-2055-5 羊土社

2 . 《実験医学》Current Topics

デクチン 1 シグナルの阻害は、腸内乳酸桿菌を増殖させ、制御性 T 細胞を増加させることによって、大腸炎を抑制する

唐策、岩倉 洋一郎

2016 年 1 月、Vol. 34、pp83-86、日本国内発行

ISBN 978-4-7581-0147-9 羊土社

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 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

<http://www.rs.tus.ac.jp/iwakuralab/index.html>

研究内容紹介ページ

<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2015/20150817-1.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

唐策 (TANG, Ce)

東京理科大学・研究推進機構・助教

研究者番号：00572166

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

岩倉 洋一郎 (IWAKURA, Yoichiro)

角田 茂 (KAKUTA, Shigeru)