

研究報告書

「腸内共生系におけるエピジェネティックな免疫修飾」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 長谷 耕二

1. 研究のねらい

近年、免疫系の成立や維持においてエピジェネティクス制御が必須な役割を果たすことが明らかになりつつある。こうした免疫担当細胞におけるエピゲノム状態はサイトカインや外部環境因子の影響を受けて変化することが予想されるが、その実態については不明な点が多い。生体内で最大の免疫器官である腸管の内腔には、約 100 兆個もの常在菌が棲息している。腸内細菌は、宿主の消化酵素では分解できない食物繊維などを微生物発酵(腸内発酵)により分解し、終末代謝産物として様々な低分子化合物を産生している。こうした代謝産物の中には、エピゲノム修飾作用を有する化合物が含まれている。腸内細菌の定着は免疫系の司令塔であるヘルパーT細胞の分化を調節し、腸管免疫系の成熟を促すことも知られている。例えば、クロストリジウム目に属する細菌群は、炎症やアレルギー応答の抑制に重要な役割を果たす制御性T細胞の分化を促進するが、この際に腸内発酵が活性化し代謝産物が豊富に産生される。こうした事実から、本研究では「腸内共生細菌は、発酵代謝産物の作用により宿主側の遺伝子発現をエピジェネティックに調節することで、免疫担当細胞の分化を制御し、結果的に免疫系のホメオスタシス維持に寄与している」との仮説を立て、その検証を試みた。

2. 研究成果

(1) 概要

腸管免疫系の最大の特徴は、病原性微生物など有害な抗原には免疫応答を発動し排除する一方で、食物性タンパク質など無害な抗原には経口免疫寛容を誘導することである。つまり腸管免疫系は高度に制御されており、この免疫バランスの破綻が食物アレルギーや炎症性腸疾患の主因と考えられている。無菌状態で飼育したマウスでは腸管内の制御性 T 細胞 (Treg) の分化・発達が未熟であり、経口免疫寛容も起こりにくくなっている。このように共生細菌と宿主の相互作用は腸管免疫系の恒常性維持に重要であるが、その分子機構には不明な点が多い。

本研究では、Treg 誘導作用のあるクロストリジウム目細菌を定着させたマウスでは、腸内発酵が活性化し、酪酸が多量に産生されることを見出した。その作用機序を検討した結果、酪酸はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害作用を介して、制御性 T 細胞の分化に必要な *Foxp3* 遺伝子のヒストンアセチル化を促進し、遺伝子発現を高めることが判明した。さらに実験的大腸炎モデルにおいて、酪酸化スターチを摂取させたところ、制御性 T 細胞が増え、大腸炎の発症が抑制された。以上の結果より、腸内細菌によって産生される酪酸は、ヘルパー T細胞のエピゲノム修飾状態を変化させることで、制御性T細胞を分化誘導し、腸管の免疫恒常性維持に貢献していることを明らかとした。クローン病や潰瘍性大腸炎など炎症性腸疾患

のヒト患者の腸内では、酪酸を作る腸内細菌が少ないことが知られている。今回の発見は、腸内細菌が作る酪酸には炎症性腸疾患の発症を防ぐ役割があることを示しており、病態の解明や新たな治療法の開発に役立つものと期待できる。

(2) 詳細

1) 腸内代謝産物による Treg 誘導のメカニズム

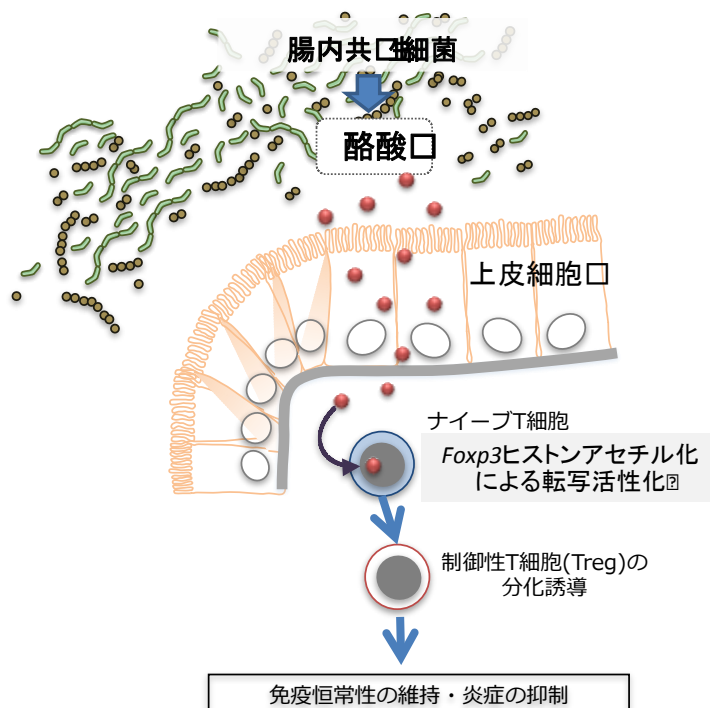
腸内共生菌の定着は Treg の分化誘導を促すことが報告されている。Treg は胸腺内で分化する thymus-derived Treg (tTreg) と、胸腺外の末梢組織で分化する peripherally generated Treg (pTreg) に分類される。共生菌はこのうち pTreg の分化誘導を促す。共生菌のなかでもクロストリジ目目に属する細菌群が pTreg 誘導において主要な役割を果たすがそのメカニズムは不明である。無菌状態で飼育したマウスにクロストリジ目細菌を定着させると、腸内発酵の顕著な促進が認められることから、発酵代謝産物が pTreg 誘導に重要な役割を果たすことが示唆された。代謝産物の解析から、クロストリジ目細菌の定着によって、特に短鎖脂肪酸(酢酸、酪酸、プロピオン酸)、アミノ酸(L-ロイシン、L-イソロイシン)、および、GABA の産生が高まることが分かった。そこで、これらの代謝産物の Treg 誘導に対する効果を、*in vitro* T 細胞培養系において評価したところ、酪酸に最も強い Treg 誘導能が観察された。プロピオン酸にも緩和な誘導能が認められた。それ以外の代謝産物には効果が認められなかった。Treg 誘導作用を示したプロピオン酸と酪酸はいずれも、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC) 阻害活性を有しており、その活性の強さと Treg 誘導能は比例していた。これより、酪酸やプロピオン酸の HDAC 阻害作用が Treg の誘導に重要であることが示唆された。

ナイーブ T 細胞(最終分化前のヘルパー細胞)は転写因子である *Foxp3* を発現することで Treg に分化する。*Foxp3* 遺伝子は、プロモーター領域に加えて、イントロン領域に進化的に保存された 3 つの転写制御エレメント(CNS1,2,3)を有しており、これら転写制御領域におけるエピゲノム修飾状態が、*Foxp3* の発現誘導や維持に重要とされている。そこで、酪酸がヘルパーT細胞のエピゲノム状態を変化させるかどうかを調べるために、ナイーブ T 細胞を酪酸で 24 時間処理し、抗アセチル化ヒストン H3(AcH3)抗体を用いて、クロマチン免疫沈降-シーケンシング解析を行った。*Foxp3* のプロモーターおよび CNS3 領域におけるヒストンアセチル化は、酪酸処理によって増加させることが分かった。この変化は *Foxp3* 発現誘導に先立って認められた。さらに CNS1 と CNS2 におけるヒストンアセチル化も経時的に増加する傾向が認められた。これらの結果から、酪酸は *Foxp3* プロモーターおよびエンハンサー領域のヒストンアセチル化を促進することで、*Foxp3* の発現を促し、Treg の分化を誘導することが示唆された。興味深いことに酪酸は、Treg の分化は促進するものの、免疫応答や炎症を促進するエフェクター T 細胞の分化には影響しなかった。またエフェクター T 細胞の分化に関わる遺伝子群(*Tbx21*, *Gata3*, *Rorc*)のプロモーター領域では顕著な変化は認められなかった。

2) 生体内における酪酸による Treg 誘導の検証とその生理的意義

酪酸による Treg 誘導効果を生体内で検証するために、難消化性でんぷんに酪酸を共有結合した特殊でんぷん(酪酸化でんぷん)を飼料に添加し、マウスに 2 週間摂取させた。大腸における Treg の数を調べたところ、酪酸化デンプン摂取群では、通常飼料を摂取した対照群に比べて有意な増加が観察された。一方で、エフェクター細胞である 1, 2, 17 型ヘルパー T

(T_{H1} , T_{H2} および T_{H17})細胞の数には変化が認められなかった。大腸 Treg は腸内細菌に対する過剰な免疫応答を抑制し、大腸炎の発症を防止する役割を担っている。そこで酪酸が大腸炎の発症を弱めることができるどうかを検討した。CD45RB^{hi} ナイーブ T 細胞を Rag1 欠損マウスに移入する実験的大腸炎モデルにおいて、酪酸化スターチ摂取群では対照群に比べて大腸炎の病態スコアが改善した。この際に大腸粘膜の Treg を除去すると酪酸の抗炎症作用は消失したことから、酪酸は Treg を誘導することで大腸炎の発症を抑制することが明らかとなった。以上の結果から、腸内細菌によって産生される酪酸は、ヘルパーT細胞のエピゲノム修飾状態を変化させることで、制御性T細胞を分化誘導し、腸管の免疫恒常性維持に貢献していることを明らかとした(下図)。



3. 今後の展開

クローン病や潰瘍性大腸炎など炎症性腸疾患のヒト患者の腸内では、腸内細菌の組成が変化することが知られているが、特に酪酸を産生する腸内細菌の減少が報告されているが、その病理学的意義については分かっていなかった。今回の研究により、酪酸の産生や利用能の低下は大腸 Treg の減少を招き、炎症性腸疾患の病態形成に関わる可能性が示唆された。よって今回の発見は、炎症性腸疾患の病態の解明や新たな治療法に役立つことが期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究では、腸内細菌は、宿主側の遺伝子発現をエピジェネティックに調節することで、免疫担当細胞の分化を制御し、結果的に免疫系のホメオスタシス維持に寄与していることを証

明することができた。本成果は、これまで主に現象論として観察された、腸内細菌と宿主の相互作用に関して新たなパラダイムの構築に繋がるものである。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

マウスおよびヒト腸内細菌の代謝産物である酪酸は、*Foxp3* 遺伝子のヒストンアセチル化を促進することで制御性 T 細胞の分化を促すことを明らかにした。さらに実験的大腸炎モデルを用いて、酪酸摂取により制御性 T 細胞が増え、大腸炎の炎症が改善されることを示した。

このことは代謝産物の酪酸が宿主側の遺伝子発現をエピジェネティックに調節することで、T 細胞の制御性 T 細胞への分化誘導を行い、その結果炎症性腸疾患の発症を防ぐ役割があることを示している。なお、制御性 T 細胞増殖と DNA メチル化関連については今後より包括的な研究を期待する。今回の発見は、環境因子によるエピゲノム修飾に関する新たなパラダイムの形成につながるものであり、ヒト炎症性腸疾患の病態解明、診断マーカーとしての応用、あるいは治療法の開発にも役立つことが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. #Furusawa Y, #Obata Y, **Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NR, Murakami M, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, #*Hase K & *Ohno H. Commensal microbe-derived butyrate induces colonic regulatory T cells. **Nature**, 2013, online publication on Nov13th. (#First equal contribution, *Corresponding author)
2. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M, *Honda K. Treg induction by a rationally selected Clostridia cocktail from the human microbiota. **Nature** 500: 232–236, 2013.
3. #Hase K, #Nakatsu F, Ohmae M, Sugihara K, Shioda N, Takahashi D, Obata Y, Furusawa Y, Fujimura Y, Yamashita T, Fukuda S, Okamoto H, Asano M, Yonemura S and Ohno H. AP-1B-mediated protein sorting regulates polarity and proliferation of intestinal epithelial cells in mice. **Gastroenterology** 145: 625–635, 2013.
4. Okada T, Fukuda S, Hase K, Nishiumi S, Izumi Y, Yoshida M, Hagiwara T, Kawashima R, Yamazaki M, Oshio T, Otsubo T, Inagaki-Ohara K, Kakimoto K, Higuchi K, Kawamura Y.I., Ohno H and *Dohi H. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. **Nat. Commun.** 4: 1654, 2013.
5. Kanaya T, Hase K, Takahashi D, Fukuda S, Hoshino K, Sasaki I, Hemmi H, Knoop KA,

Kumar N, Sato M, Katsuno T, Yokosuka O, Toyooka K, Nakai K, Sakamoto A, Kitahara Y, Jinnohara T, McSorley SJ, *Kaisho T, *Williams IR and *Ohno H, The Ets Transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold (M) Cells. **Nat. Immunol.** 13: 729-736, 2012.

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【受賞】

1. 平成 22 年 12 月 日本免疫学会 学会奨励賞
2. 平成 23 年 6 月 日本ビフィズス菌センター 研究奨励賞

【主な招待講演】

1. Hase K. Commensal microbiota shapes the gut immune system through epigenetic modifications. The 8th RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2013. June 27-28, 2013, Yokohama, Japan.
2. Hase K. et al., A commensal microbe-derived short-chain fatty acid epigenetically induces colonic regulatory T cells. The 12th Awaji International Forum on Infection & Immunity. September 10-13, 2013.
3. Hase K. Intestinal microbiota shapes intestinal T cell balance via epigenetic modifications. 第 71 回日本癌学会総会. 2012 年 9 月 19-21 日. 札幌