

# 研 究 報 告 書

## 「炎症制御に向けた腸管制御性T細胞の誘導機構の解明」

研究タイプ:通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研 究 者: 新 幸二

### 1. 研究のねらい

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される慢性炎症性腸疾患は、免疫系の異常により発症する難治性疾患であり、病因の解明と根治的な治療法の確立が強く求められている。腸管免疫系は腸管内腔に生息する有用な腸内細菌に対しては寛容状態を維持し過剰に反応しないよう制御されている。一方、経口的に侵入してくる病原性微生物に対しては迅速に排除するため、ある程度活性化された状態を保持している必要がある。このように、腸管では免疫系の寛容状態と活性化状態の微妙なバランスの維持機構が備わっており、このバランスが崩れ持続的な活性化状態になると炎症性腸疾患が引き起こされることが考えられている。近年、この腸管免疫系の形成・活性化さらにはバランスの維持に腸内細菌が重要な役割を担っていることが明らかになってきている。これまでの研究で我々は免疫系の抑制に重要な制御性T細胞(Treg細胞)がマウス腸内細菌のうちクロストリジウム属に属する細菌群によって誘導されていることを明らかにした。実際、炎症性腸疾患の患者の腸内細菌叢の構成割合が健常者とは異なっていること、クロストリジウム属細菌が炎症性腸疾患の患者で減少していることが報告されている。そのため、Treg細胞を誘導する細菌群の減少が腸管Treg細胞の減少につながり、免疫系の制御が効かなくなり炎症性腸疾患の発症につながるということが予想された。そこで、炎症性腸疾患の治療法確立を目指し、現在まだ明らかになっていないヒト腸内細菌の内Treg細胞を誘導する細菌を同定およびTreg細胞の誘導メカニズムの解明を目的とし本研究を行った。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

まず、ヒトの腸内細菌の中にTreg細胞を誘導する細菌が存在しているかを検討するため、健常者の便を腸内細菌が存在していない無菌マウスに経口投与し、ヒトの腸内細菌が定着したマウスを作製した。このヒト腸内細菌定着マウスは無菌マウスと比較して大腸のTreg細胞が多く存在していたことから、ヒトの腸内細菌の中にTreg細胞を誘導する細菌が存在していることが明らかになった。またクロロホルム処理(芽胞を形成しない細菌を死滅させる)をした後、無菌マウスに投与するとさらに強いTreg細胞の増加が確認できたことから、Treg細胞を強く増加させる菌は芽胞形成菌であることが示唆された。次にクロロホルム処理投与マウスの腸内細菌を希釈し無菌マウスに投与することを数回繰り返し、Treg細胞誘導能を保持しつつ細菌数を絞り込むことに成功した。そのマウスの盲腸内容物から腸内細菌を単離・培養し、17種類の細菌株が強いTreg細胞の誘導能を持っていることが明らかになった。この17菌株はすべてクロストリジウム目に属する細菌であり、短鎖脂肪酸を高産生することでTreg細胞の分化・増殖を促進していることが明らかになった。また、この17菌株はTreg細胞の増加とともにTreg細胞からの抗炎症性サイトカインであるIL-10の産生も増強することがわかり、炎

症の抑制に重要な役割を担っていることが強く示唆された。そこで、この17菌株が炎症抑制効果を持っているかについて病態モデルを用いて検討した。通常のSPFマウスに17菌株を投与すると、TNBS腸炎モデルと全身性のOVA誘導性アレルギーモデルにおいてコントロール群と比較して有意に炎症の抑制効果が見られた。以上のことから、ヒト由来Treg細胞誘導17菌株は炎症の抑制効果をもつことが明らかになり、今後様々な炎症疾患の治療法や予防法の開発につながると期待される。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「ヒトのTreg誘導能を持つ腸内細菌の解析」

#### 1. Treg誘導能を持つヒト腸内細菌の同定

我々は以前にマウス腸内からTreg細胞を誘導する46株のクロストリジウム属細菌を同定したが、ヒト腸内にもTreg細胞を誘導する細菌が存在しているのか、それはどのような細菌種かについては不明であった。そのため、まずヒト腸内にTreg細胞誘導細菌が存在しているのかを解析するため、腸内細菌がいない無菌マウスに健常者の便を経口投与しヒト腸内細菌定着マウスを作製した。このヒト腸内細菌を定着させたマウスは無菌マウスと比較して大腸のTreg細胞が多く存在していたことから、ヒト腸内にもマウスにおいてTreg細胞を誘導する細菌が存在していることが明らかになった。また、このヒト腸内細菌定着マウスの大腸には炎症惹起に働くIL-17産生性のTh17細胞も多く誘導されていたことから、このマウスの腸内細菌の中にはTreg細胞を誘導する細菌とTh17細胞を誘導する細菌の両方が含まれていると考えられた。そこでTreg細胞を誘導する細菌のみをセレクションするため、クロロホルム処理をした

ヒト便を無菌マウスに投与した。クロロホルム処理は芽胞形成菌のみを選択的にセレクションする方法であり、以前のマウスTreg細胞誘導細菌を同定したときに用いた方法である。その結果、予想通りクロロホルム処理ヒト便定着マウスではTreg細胞のみが

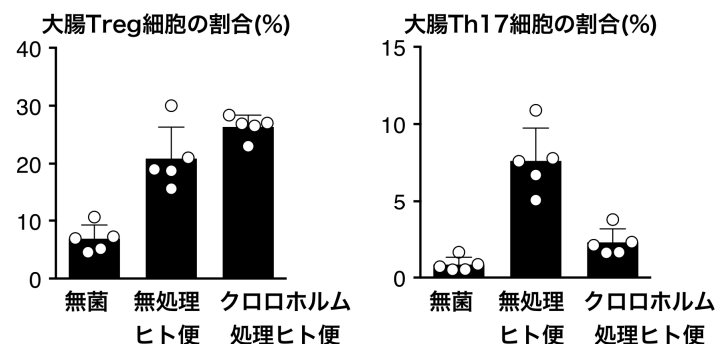


図1.クロロホルム処理ヒト便はTreg細胞を特異的に誘導する。

誘導され、Th17細胞は全く誘導されなかった(図1)。これらのことから、ヒト腸内細菌の内、クロロホルム耐性の芽胞形成菌がTreg細胞を特異的に誘導することがわかった。クロロホルム処理ヒト便定着マウスの腸内には、次世代シーケンサーを用いた解析から約100種類の細菌が存在していたため、希釈投与を数回行うことによりTreg細胞誘導細菌の候補を減らした後、希釈便投与マウスの盲腸内容物を様々な寒天培地に塗布し細菌の単離を行った。その結果、16S rRNA 遺伝子の解析から合計31菌株が単離でき、相同性が近い菌株を除いた17菌株をTreg細胞誘導菌候補として特定した。この17菌株はクロストリジウムクラスターIV、XIVa、XVIII に属す

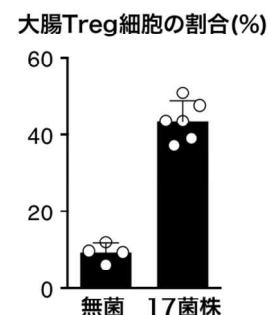


図2.単離したヒト腸内由来17菌株のみで大腸Treg細胞が強く誘導する。

る菌で希釈投与マウスの主要な構成細菌種であった。そこで、培養した17菌株を無菌マウスに経口投与しこれら17菌株のみでTreg細胞が誘導できるかを検討した結果、強いTreg細胞誘導が確認できた(図2)。また同時にこの17菌株はTreg細胞の免疫抑制機能を担うIL-10の産生やCTLA-4の発現を促進することも明らかになり、17菌株はTreg細胞の増加とともに抑制機能の増強にも寄与することが明らかになった。

## 2. ヒト腸内由来17菌株のTreg細胞誘導メカニズムの解明

腸内細菌と密接に関わっている腸管上皮細胞に着目し解析を行った。まず、大腸上皮細胞株(HCT8)に17菌株定着マウスの盲腸内容物抽出液で刺激を行うと、活性化型TGF- $\beta$ の産生が促進されることがわかった。腸内細菌が生成し上皮に影響を与え増殖やバリア機能の強化に役立つものとして、短鎖脂肪酸がよく知られている。実際、17菌株定着マウスの盲腸内容物中には酢酸、酪酸、プロピオン酸が高濃度に含まれており、短鎖脂肪酸が上皮からのTGF- $\beta$ の産生に関与していることが疑われた。そこでHCT8細胞株を短鎖脂肪酸で刺激を行ったところTGF- $\beta$ が強く産生されることがわかり、17菌株によるTreg細胞誘導は短鎖脂肪酸を介して行われていることが強く示唆された。また、17菌株定着マウスの大腸Treg細胞を17菌株で刺激を加えた時に強い応答が確認できたことから、17菌株により誘導されたTreg細胞は17菌株由来の抗原を認識していると考えられる。

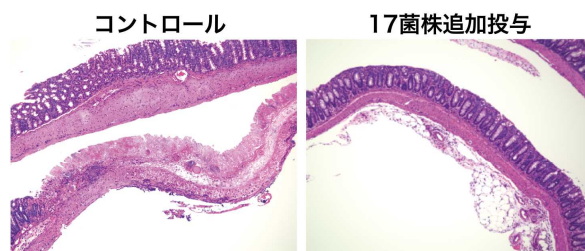


図3.17菌株はTNBS腸炎を抑制する。

## 3. ヒト腸内由来17菌株による炎症抑制作用の検討

単離した17菌株がTreg細胞の増加および抑制機能の増強を行うことから、17菌株投与により炎症性腸疾患の発症が抑えられることが予想された。そこでマウスモデルを用いて検討を行った。まず、SPFマウスに週3回4週間投与すると17菌株がSPFマウスにもある程度定着し、大腸Treg細胞を上昇させることが分かった。この17菌株追加投与マウスとコントロールのSPFマウスを用いて、TNBSを投与することにより腸炎を誘発した。その結果、17菌株追加投与マウスにおいて有意に炎症が抑えられていた(図3)。同様に、OVA誘発下痢モデルでも検討した結果、17菌株を追加投与することにより下痢の症状が抑えられることが明らかになった。また、興味深いことに全身性のアレルギーを引き起こした場合においても17菌株追加投与マウスにおいて血中のOVA特異的IgEが低かったことから、17菌株は腸管だけでなく全身性の炎症も抑制可能であることが明らかになった。

### 研究テーマB「Treg細胞の性質・機能解析」

Treg細胞には胸腺で分化発生する胸腺Treg(tTreg)と末梢でナイーブT細胞から分化誘導される末梢Treg(pTreg)の2種類存在していることが知られている。しかしながら、現在ではこれら2種類のTreg細胞を簡単に見分ける手段がないため、特異的マーカーの特定が求められている。そこで、pTreg細胞しか存在していないことが報告されているCarma1(TCRの下流アダプター分子)欠損マウスのTreg細胞を解析すると、HeliosというtTregで特異的に発現していると考えられていたタンパク質の発現に特徴があることが分かった。通常の野生型マウスでは大腸Treg細胞はHeliosの発現がhigh、mid、lowと3つに分かれるが、Carma1欠

損マウスのTreg細胞にはhighとlowしか存在していなかった。つまり、Helios<sup>mid</sup>のTreg細胞がCarma1欠損マウスで特異的に消失していた。このことから、Helios<sup>mid</sup>のTreg細胞が胸腺由来のtTregの可能性が高いと考えられる。現在、Heliosレポーターマウスの作製を行っているところであり、今後解析予定である。また、同時にIL-10レポーターマウスからIL-10産生Treg細胞を単離し、IL-10産生に関与する遺伝子の特定作業を進めている。

### 3. 今後の展開

本研究ではヒト腸内由来のTreg細胞を誘導する17菌株を同定し、炎症抑制効果を有することを証明できた。今後はこの17菌株を用いた臨床応用に向け研究を進めたい。17菌株を腸内細菌が存在している SPF マウスに投与した場合には定着率が悪いいため、一度抗生剤で腸内細菌を減少させてからの投与を検討する。また、経口的や経肛門的などどのような投与方法が良いかを検討する。現在、偽膜性腸炎において便秘（健常者の便懸濁液を腸管内腔に移植）が極めて良好な結果を示すことが報告されている。そこで偽膜性腸炎のマウスモデル（*C. difficile* 感染）において17菌株が抑制効果を持つかを検討する。さらには自己免疫疾患や炎症性腸疾患の発症に関与していると考えられているTh17細胞についてもヒト腸内由来のどのような細菌が誘導に関与しているのかを明らかにしていきたい。tTreg細胞とpTreg細胞の性質、機能解析については、レポーターマウスの作製や遺伝子欠損マウスの作製を通して、詳細な性質や機能の違いを解明できるようアプローチしていきたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

腸内細菌叢の異常が様々な炎症性疾患の発症に関与していることが強く示唆されている。ヒトのTreg誘導能を持つ腸内細菌の解析に関しては、制御性T細胞を誘導するヒト腸内細菌の単離同定に成功し、同定した17菌株が様々な炎症モデルにおいて抑制効果を有していることを証明でき、ほぼ研究計画通りに進み結果を得ることができた。本研究結果から、炎症性腸疾患のみならず全身の炎症性疾患への創薬ターゲットとして腸内細菌が有望であり、今後の炎症性疾患の治療法や予防法への応用が期待できると考えられる。Treg細胞の性質・機能解析に関しては、本来の予想された成果を出すまでには至らなかったが、非常に興味深い解析結果が出ており一定の目的は達成できたと考えている。

腸内細菌の宿主への影響を解明する上で本さきがけ領域内の研究者との共同研究に発展し、腸内細菌が肝臓がんの発症に関与していることを明らかにできた。また、これまで自分たちでは解析ができなかった質量分析を用いた解析も、領域内の研究者との共同研究で実施することができ非常に有意義な連携ができた。

#### (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）。

無菌マウスなどを用いた実験系で、制御性T細胞を誘導するヒト腸内細菌として、芽胞を形成するクロストリジウム目に属する17菌株を同定した。その制御性T細胞の誘導メカニズムとして、17菌株が産生する短鎖脂肪酸によって刺激された大腸上皮細胞から制御性T細胞の分化に必須のサイトカインであるTGF- $\beta$  が強産生されることを見出している。さらに、その17菌株の



投与により、腸炎モデルや食物アレルギーモデルの病態や症状が抑制されることを確認し、世界的にもインパクトのある発表を行った。現在、本知見の臨床応用に向けた研究を行っており、その展開が大いに期待できる。本課題の研究、さらには研究領域内における他の研究者との共同研究によって、質の高い研究成果の発表を行い国内外において評価され、研究者としての飛躍につながった。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, Suda W, Atarashi K, Doi Y, Tsutsui Y, Qin H, Honda K, Okada T, Hattori M, Fagarasan S. Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* 41, 152–165, 2014
2. Narushima S, Sugiura Y, Oshima K, Atarashi K, Hattori M, Suematsu M, Honda K. Characterization of The 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived Clostridia. *Gut Microbes* 5, 333–339, 2014
3. Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Atarashi K, Nakayama M, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M, Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Tajima S, Masumoto H, Ohara O, Honda K, Hori S, Ohno H, Koseki H, Hase K. The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates The proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nat Immunol.* 15, 571–579. 2014
4. 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 mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500, 232–236. 2013
5. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* 499, 97–101. 2013

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: Kenya Honda, Koji Atarashi, Takeshi Tanoue, Masahira Hattori, Hidetoshi Morita

発明の名称: Human-derived bacteria that induce proliferation or accumulation of regulatory T cells

出 願 人: University of Tokyo, School Corporation, Azabu Veterinary Medicine Educational Institution

出 願 日: 2012 年 11 月 29 日

出 願 番 号: PCT/JP2012/007687

(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)

**主要な学会発表**

1. Atarashi K, Tanoue T, Nagano Y, Honda K. Induction of intestinal Regulatory T cells by Human Clostridium species. 第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸、2012 年 12 月 7 日
2. 新幸二 腸内細菌による T 細胞応答の誘導 第 46 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会、神奈川県伊勢原市、2013 年 1 月 25 日(招待講演)
3. Atarashi K. Human clostridium species promote intestinal accumulation of Treg cells. Keystone Symposium, The Gut Microbiome: The Effector/Regulatory Immune Network, Taos (USA) 2013 年 2 月 11 日
4. 新幸二 腸管 T 細胞の活性化機構における腸内細菌の役割 JCHM 第二回シンポジウム、東京、2014 年 11 月 28 日(招待講演)

**受賞**

1. 新幸二 制御性 T 細胞を誘導するヒトの腸内細菌の同定と培養に成功 理研研究奨励賞 2014 年 3 月 31 日
2. 新幸二 腸内細菌による腸管T細胞の誘導機構の解明 日本ビフィズス菌センター研究奨励賞 2014 年 6 月 11 日
3. 本田賢也、新幸二、田之上大 免疫系に強く影響を与える腸内細菌株の単離 ゴットフリード・ワグネル賞 2014 年 6 月 18 日