

130. IFN γ 産生 T 細胞を誘導する腸内常在菌の探索

田之上 大

*理化学研究所 統合生命医科学研究センター

Key words : IFN γ

緒言

ヒトの腸管には約 1,000 種類、およそ 100 兆個の腸内常在菌が生息していて、一種の生態系（腸内フローラ）を形成している。健常時の腸内フローラはそれぞれの細菌数および種類が微妙なバランスに保たれて成立している。近年、そのバランスの破綻が様々な疾患の発症・増悪につながる事が明らかになってきた。

腸内フローラを構成する個々の細菌はそれぞれが異なる様式で宿主に影響している。そのため、腸内フローラの影響を正確に理解し、医療に応用するには、個々の細菌種の生理機能を個別に把握していく必要がある。しかしながら、フローラを構成する細菌種が膨大なこと、および多くが難培養性細菌であることから、実際には病態悪化の原因となる菌種や、逆に病態改善へと繋がる菌種を同定できた例は非常に少ない。逆にいえば、この解明が進めば疾患治療法の開発につながる可能性が大いに期待できる。

そのコンセプトのもと著者が所属する研究室では、特に消化管に特有な免疫細胞に焦点を当て、それを誘導する腸内常在菌の同定を独自のアプローチを用いて行ってきた。無菌マウスに目的の細菌のみを定着させるノトバイオートマウス作製技術、嫌気チャンバーを用いた難培養性嫌気性細菌の培養技術、そして次世代シーケンスを用いた腸内細菌叢解析技術である。この技術を用いて、著者らの所属する研究室ではマウスから単離したセグメント細菌と呼ばれる腸内常在菌が免疫反応をアクセレートさせる Th17 という免疫細胞を特異的に誘導することを同定した¹⁾。加えて、Th17 細胞を誘導するヒトの腸内細菌を同定し、その単離培養に成功した²⁾。一方で、著者らの研究室では炎症反応にブレーキをかける Treg という免疫細胞にも着目している。実際、マウスから単離した 46 株の Clostridium 属菌³⁾およびヒト腸内細菌から単離した 17 菌株の Clostridia 菌⁴⁾が、Treg 細胞を特異的に誘導することを同定した。

腸内感染症は細菌やウイルスなどの病原性微生物による感染が原因で生じる疾患であり、重篤な症状を伴って死に至るケースが多い。その流行は新興国のみならず先進国でも引き起こることから世界的な脅威となっている。その代表例として、腸管出血性大腸菌 (O157) やノロウイルスの集団感染が挙げられる。近年、それらの治療には様々な抗生剤および抗ウイルス薬が利用されてきた。しかし、その利用は薬剤耐性細菌・ウイルスの出現と流行を招くことから、これらの薬剤にとって替わる、より安全で効果的な腸内感染症治療方法の開発が社会的急務になっている。哺乳類には T 細胞と呼ばれる免疫細胞が存在し、病原性微生物の排除に中心的な役割を果たす。なかでもインターフェロンガンマ (interferon-gamma; IFN- γ) というサイトカインを分泌する T 細胞はおもに細胞内寄生病原性微生物の侵入を防御する。そこで本研究では宿主に元来備わっている IFN- γ 産生性 T 細胞に着目する。すなわち、腸管における IFN- γ 産生 T 細胞の誘導機構を解明することで腸内感染症の新規治療法開発を見据えた研究成果を目指す。具体的な目的として、IFN- γ 産生 T 細胞を誘導する腸内常在細菌の単離・同定を試みた。その後、特定した IFN- γ 誘導菌の治療効果を検証する。以上によって様々な腸内感染症に対する現実的な創薬シーズを探索し、新規治療法開発の原動力となる研究成果を目指す。

方法および結果

Specific pathogen free 環境で飼育した、C57BL/6 マウスから臓器を摘出した。腸管については 5mM EDTA-HBSS に入れ、37°C で 20 分間ウオーターバスで振盪することにより、腸管上皮を除去した。その後、ピンセットにて脂肪組

*現所属：慶應義塾大学

織、筋層および上皮細胞を丁寧に除去し粘膜固有層を分離した。ハサミで細切したのち、コラゲナーゼ・ディスパーゼを加え 37°C で 60 分間振盪することにより single cell を遊離した。5mM EDTA でコラゲナーゼ・ディスパーゼの反応を止めたあと、40%パーコールに懸濁した。下層に 80%パーコールを装填し、密度勾配遠心法によりリンパ球を濃縮した。リンパ球層を回収し、50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate および 750 ng/mL ionomycin で 3.5 時間 37°C で刺激培養した。その後、細胞を回収し、死細胞染色、fixation と permeabilization と CD3・細胞内 IFN- γ 染色を行った。LSR Fortessa を用いてフローサイトメトリーを実施した。

その結果、大腸において IFN- γ 産生細胞が観察された (図 1)。IFN- γ 産生細胞のほとんどが CD3 陽性 $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞であった (図 1)。実際、CD3 陽性 $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞の約 24% が IFN- γ 産生細胞であった (図 1)。一方、CD3 陰性 IFN- γ 産生細胞はほとんど検出されなかった (図 1)。これらの結果から、大腸の IFN- γ 産生細胞のほとんどが CD3 陽性 $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞であることが分かった。また、その他の臓器についても IFN- γ 産生細胞を検討した。肺、肝臓、脾臓を調べた結果、いずれの臓器においても IFN- γ 産生細胞が観察された (図 1)。そのほとんどが CD3 陽性 $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞であり、それらの 10~20% が IFN- γ 陽性であった。このことから、IFN- γ 産生 T 細胞は消化管だけでなく様々な組織に存在することが分かった。

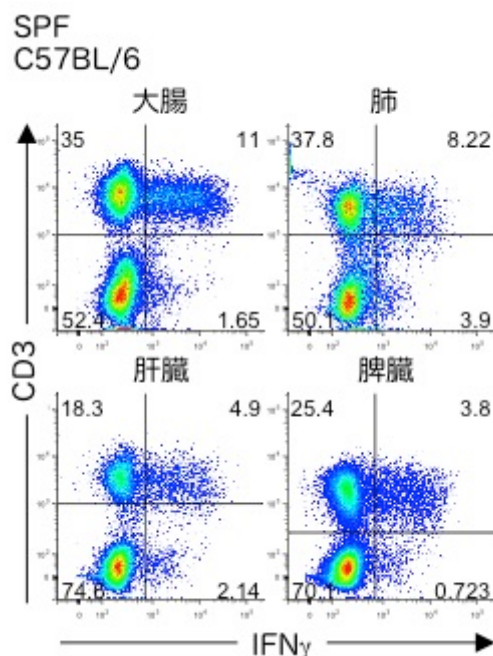


図 1. 各臓器における IFN- γ 産生細胞 (リンパ球のみを表示)

各臓器からリンパ球を単離し、PMA/ionomycin で刺激後、IFN- γ 産生細胞をフローサイトメトリーにより解析した。

次に、IFN- γ 産生 T 細胞の誘導に、細菌が common に持つ構成成分が関与しているのかを検討した。細菌が共有する構成成分のうち、Pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) が広く知られる。PAMPs は PRRs (pattern recognition receptors) と呼ばれる一連の受容体群により認識される。たとえば、Toll-like receptors は、リポ多糖やペプチドグリカン、細菌由来の特定 DNA を認識する PRRs として知られている。また、NOD-like receptors は特定のペプチドグリカンモチーフを認識する一方、Dectin-1 receptors は多糖を認識する受容体として知られている。

これら細菌が広く共有する PAMPs の関与を調べるために、上述した各レセプターの機能が欠損したマウス (各受容体シグナルのアダプター分子の欠損マウス) の消化管 IFN- γ 産生 T 細胞数を解析した。Toll-like receptors シグナル欠損 (*Myd/Trif*DKO) マウスを解析した。また、NOD-like receptors および Dectin-1 receptors シグナル欠損 (*Rip2/Card9*DKO) マウスの消化管 T 細胞を解析した。その結果、*Myd/Trif*DKO マウスの消化管には正常の IFN- γ 産生

T細胞数が集積していた。また、NOD-like receptors および Dectin-1 receptors シグナル欠損 (*Rip2/Card9* DKO) マウスの消化管においても野生型と同じレベルの IFN- γ 産生 CD3 陽性 $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞数が検出された。これらの結果から、消化管粘膜面における IFN- γ 産生 CD3 陽性 $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞の集積は、PAMPs 非依存的な機構により誘導されることが示唆された。

PAMPs 非依存的な IFN- γ 産生 T 細胞の集積は、特定細菌種による誘導を暗示している。そこで、異なるスペクトラムを持つ抗生物質を投与したマウスの消化管 CD3 陽性 T 細胞を解析した。タイロシンはマクロライド系の抗生物質として、実験動物を含めた動物によく処方される。また、セフォペラゾン はセフェム系の抗生物質としてよく知られている。マウスを出生 5 日後から、タイロシンまたはセフォペラゾンを 8 週間投与した。その後、消化管リンパ球を回収し、フローサイトメトリーにて解析を行った。その結果、消化管 IFN- γ 産生 $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞数が、抗生物質非投与マウスにくらべタイロシンおよびセフォペラゾン投与マウスで少なかった。これらの結果から、タイロシンおよびセフォペラゾン感受性の特定腸内常在菌種が消化管 IFN- γ 産生 $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞を誘導することが示唆された。

考 察

IFN- γ はウイルス感染やがん細胞のサーベイランスを担うサイトカインである。本研究により、マウス消化管には IFN- γ を高産生する CD3 陽性 T 細胞が集積していて、それらは腸内常在菌によって誘導されることが分かった。またその誘導は、広く細菌間で保有されている菌体構成成分 (PAMPs) によるものではなく、ある特定の細菌種が担っていることが分かった。今後、責任細菌種絞り込み、同定・単離を行う予定である。そして、単離した細菌種が感染症に対する抵抗性を強化するかをノロウイルスやインフルエンザウイルス感染モデル、抗がん効果を有するかをがんモデルを用いて検討する予定である。

文 献

- 1) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria.
Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR.
Cell. 2009 Oct 30;139(3):485-98. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033.
- 2) Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells.
Atarashi K, Tanoue T, Ando M, Kamada N, Nagano Y, Narushima S, Suda W, Imaoka A, Setoyama H, Nagamori T, Ishikawa E, Shima T, Hara T, Kado S, Jinnohara T, Ohno H, Kondo T, Toyooka K, Watanabe E, Yokoyama S, Tokoro S, Mori H, Noguchi Y, Morita H, Ivanov II, Sugiyama T, Nuñez G, Camp JG, Hattori M, Umesaki Y, Honda K.
Cell. 2015 Oct 8;163(2):367-80. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.058. Epub 2015 Sep 24.
PMID: 26411289
- 3) Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species.
Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K.
Science. 2011 Jan 21;331(6015):337-41. doi: 10.1126/science.1198469. Epub 2010 Dec 23.
PMID: 21205640
- 4) Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota.
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.
Nature. 2013 Aug 8;500(7461):232-6. doi: 10.1038/nature12331. Epub 2013 Jul 10.
PMID: 23842501