

CD8陽性T細胞の誘導を介して感染症を制御する腸内常在菌の探索

田之上 大

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター 基礎科学特別研究員

緒言

哺乳類にはCD8陽性T細胞と呼ばれる免疫細胞が存在し、病原性微生物、特にウイルス排除に中心的な役割を果たすことが知られている。CD8陽性T細胞は様々な組織に存在するが、腸管にも豊富に存在し、その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の分泌を介して腸管腔内からの病原性微生物の侵入を防御していると考えられている。腸管におけるIFN γ 産生CD8陽性T細胞の誘導機構を解明することで、将来的に腸内ウイルス感染症に対する新規治療法開発につながる可能性が高い。そこで本研究では腸管CD8陽性T細胞に着目し、その集積に関わる因子を検討した。その結果、その誘導に腸内常在細菌の関与が認められた。

実験方法

腸管粘膜固有層からのリンパ球の単離は従来から用いられている方法にて行った¹⁾。単離した細胞をPMA、イオノマイシンおよびゴルジストップ存在下、37℃で3.5時間培養した。細胞回収後、表面マーカーと細胞内サイトカインの染色を行い、フローサイトメトリーにて解析した。抗生剤は、出生5日後から8週間 (3週齢で離乳)、飲水に混ぜ自由摂取にて投与した。

結果

1. 消化管粘膜にはIFN γ 産生CD8T細胞が存在する

消化管粘膜におけるウイルス感染防御を担う細胞を考察するうえで、その実行因子であるIFN γ に着目し、その産生源となる細胞を検討した。その結果、小腸におけるIFN γ のメインソースはCD3陽性細胞であった。このことは、Tリンパ球が腸管における主なIFN γ 産生源であることを示唆している。さらには、そのCD3陽性Tリンパ球のうち、CD8陽性T細胞および、CD4陽性T細胞がIFN γ を産生していた (図1)。IFN γ 産生CD8陽

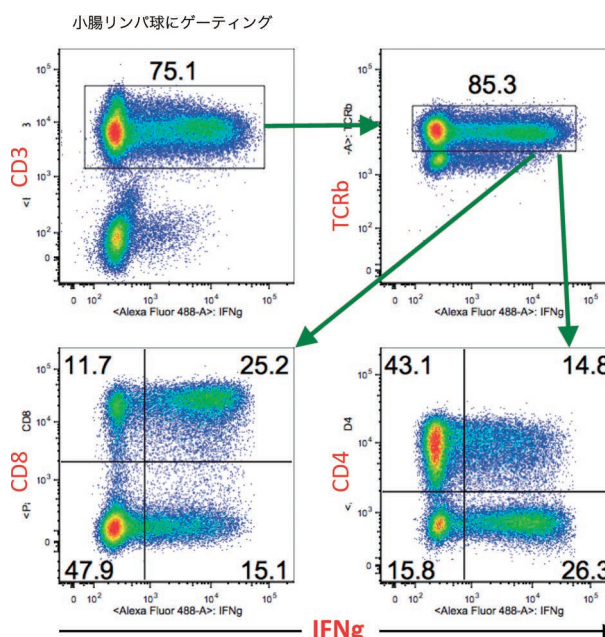


図1 腸管にはIFN γ 産生CD8陽性T細胞が存在する

SPFマウス小腸リンパ球を単離し、PMAとイオノマイシンで刺激後、IFN γ 産生細胞を解析した。

性T細胞は病原性細菌の排除に関わるサイトカインであるIL-17を産生していなかった。

2. 消化管IFN γ 産生CD8T細胞の集積は常在菌により誘導される

IFN γ 産生CD8陽性T細胞の集積に対して腸内細菌の関与が考えられる。そこで、無菌マウス小腸粘膜固有層におけるIFN γ 産生CD8陽性T細胞を解析した。その結果、無菌マウスのIFN γ 産生CD8陽性T細胞数は通常マウス (Specific pathogen free : SPFマウス) に比べ著しく少なかった (図2)。この結果から、小腸IFN γ 産生CD8陽性T細胞は腸内常在細菌依存的に誘導されることが示唆された。また、無菌マウスにSPFマウスの便懸濁液を投与すると、IFN γ 産生CD8T細胞数が増加し

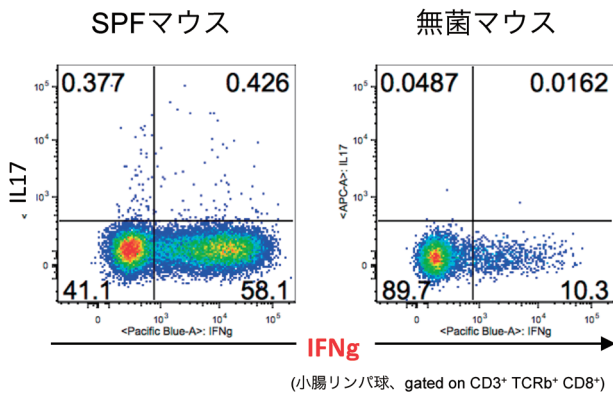


図2 IFN γ 産生CD8陽性T細胞は腸内常在菌依存的に誘導される

無菌マウスおよびSPFマウスの小腸リンパ球を単離し、PMAとイオノマイシンで刺激後、CD8陽性T細胞に占めるIFN γ 産生細胞の割合を比較した。

た。このことから、IFN γ 産生CD8T細胞の集積は常在菌依存的に誘導されることがわかった。

3. PAMPs非依存的な誘導

IFN γ 産生CD8陽性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 patterns (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、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プター分子の欠損マウス)の小腸IFN γ 産生CD8陽性T細胞数を解析した。Toll-like receptorsシグナル欠損(Myd/Trif DKO)マウスの小腸には正常のIFN γ 産生CD8陽性T細胞数が集積していた(図3)。また、NOD-like receptorsおよびDectin-1 receptorsシグナル欠損(Rip2/Card9 DKO)マウスの小腸においても野生型と同じレベルのIFN γ 産生CD8陽性T細胞数が検出された。これらの結果から、小腸粘膜面におけるIFN γ 産生CD8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可能性が示唆された。

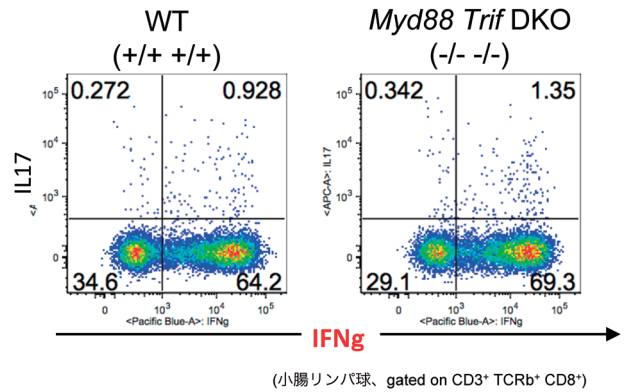


図3 IFN γ 産生CD8陽性T細胞はToll-like receptors非依存的に誘導される

Myd88 Trif二重欠損および野生型SPFマウスの小腸リンパ球を単離し、PMAとイオノマイシンで刺激後、CD8陽性T細胞に占めるIFN γ 産生細胞の割合を比較した。

4. 特定細菌種による誘導

PAMPs非依存的なIFN γ 産生CD8T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剤を投与したマウスの小腸CD8陽性T細胞を解析した。マウスを出生5日後から、ペーララクタム系、マクロライド系、セフェム系などの種々の抗生剤を投与した結果、小腸IFN γ 産生CD8T細胞数が、抗生剤非投与マウスにくらべ特定の抗生剤投与マウスで少なかった。また、それとは別の抗生剤投与マウスでは、非投与マウスとほぼ同じであった。これらの結果から、SPFマウスの小腸常在菌のうち、特定の抗生剤に対して感受性で、一方それとは別の抗生剤に対しては抵抗性の特定腸内常在菌種が小腸IFN γ 産生CD8T細胞を誘導することが示唆された。

考 察

IFN γ はウイルス感染症に対する抵抗性を強める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CD8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わかった。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わかった。今後、責任細菌種が特定の抗生剤抵抗性であることを利用して絞り込み、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を用いて検討する予定である。

要 約

IFN γ はマクロファージやB細胞を活性化して、ウイルス感染症に対する抵抗性を強めるサイトカインとして知られている。消化管粘膜ではIFN γ 産生性CD8陽性Tリンパ球が存在する。無菌マウスを用いた実験により、IFN γ 産生CD8陽性T細胞は腸内常在菌により誘導されることが示唆された。その誘導は、細菌に共有な菌体構成モチーフ（PAMPs）非依存的であり、特定の抗生剤投与により影響されることから特定の細菌種による関与

が考えられた。今後、その同定・単離と医療への応用効果の検証が求められる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり助成いただきました公益財団法人三島海雲記念財団に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) K. Atarashi, et al.: *Cell*, **163**, 367–380, 2015.