

# 食事と腸内細菌による消化管 T 細胞誘導機構の解明

本田賢也

東京大学大学院医学系研究科免疫学講座 准教授

## 緒言

消化管には約 1000 種類の腸内細菌が、それぞれのニッチに定着し、お互いに一定のバランスを取りつつ生息している。腸内細菌は消化の補助、栄養素の供給、病原性微生物の排除など有益な働きをしてくれていることが古くから知られている。最近では、腸内細菌からの刺激が免疫系の構築や機能の発達、維持に貢献していることも明らかになってきている<sup>1)</sup>。

制御性 T 細胞 (regulatory T 細胞; Treg 細胞) は、CD4 陽性 T 細胞の一亜群であり、転写因子 forkhead box P3 (Foxp3) を発現することを特徴としている<sup>2)</sup>。自己反応性 T 細胞の増殖・活性化を抑え、免疫寛容の維持、過剰な免疫応答の抑制に必須の細胞として働く。Treg 細胞は、全身のあらゆる臓器に存在しており、CD4 陽性 T 細胞の約 10% をしめる。一方、小腸・大腸においては、Treg 細胞の割合は極めて多く、CD4 陽性 T 細胞の約 30% 以上を占めている。なぜ消化管において Treg 細胞は顕著に多いのか。我々は腸内細菌が腸管での Treg 細胞を増加させているのではないかと考えた。

## 結果

通常の specific-pathogen-free (SPF) 環境下で飼育したマウス (以下 SPF マウス) と、腸内細菌が全く存在しない無菌マウス (germ-free マウス、以下 GF マウス) の、小腸・大腸粘膜固有層に存在する Foxp3 発現細胞 (即ち Treg 細胞) をフローサイトメトリーにより解析し、比較した<sup>3)</sup>。小腸においては、GF マウスと SPF マウスは、ほぼ同数の Treg 細胞を有していた。一方大腸に於いては、GF マウスにおいて、SPF マウスの約 3 分の 1 程度の数にまで Treg 細胞が減少していることが明らかとなった。このことから、腸内細菌の存在は、大腸の Treg 細胞数を増加させるのに必須の役割を果たしていることが明らかとなった。一方小腸 Treg 細胞は腸内細菌とは無関係に誘導されており、そのメカニズムは不明

である。食事によって影響を受けているのではないかと考えられる。

次に我々は、腸内細菌に含まれるどの菌種が、大腸 Treg 細胞数の増加に寄与しているのかを調べた。その為、まず SPF マウスに抗菌スペクトルの異なる抗生物質を投与するという実験を行った<sup>3)</sup>。バンコマイシンはグラム陽性菌に有効な抗生物質であり、一方、ポリミキシン B はグラム陰性菌に有効な抗生物質である。バンコマイシンあるいはポリミキシン B を経口投与すると、バンコマイシン投与群のみ大腸 Treg 細胞の減少が確認された。このことから、グラム陽性の腸内細菌が Treg 細胞の誘導に関与していることが示唆された。腸内細菌には多くの芽胞形成菌が含まれる。そこで次に SPF マウスの糞便をクロロホルム処理し、クロロホルム処理に耐性の芽胞形成菌だけを GF マウスに投与する実験を行った。その結果、芽胞形成菌分画だけで十分に大腸 Treg 細胞を誘導できることが分かった。以上の実験から、腸内細菌の中でも、グラム陽性で且つ芽胞を形成する菌が、Treg 細胞を誘導していると考えられた。

マウス消化管に於いてグラム陽性で且つ芽胞を形成する菌で最も多く存在するのは、クロストリジウム属菌である。そこで次に、クロストリジウム属菌が、大腸 Treg 細胞を誘導できるかどうかを検討した<sup>3)</sup>。その為我々は、ノトバイオート技術を用いた。ノトバイオートとはある特定の微生物のみが存在する動物を指す。マウス消化管から単離された 46 株のクロストリジウム属菌を<sup>4)</sup>、無菌ビニールアイソレーター内に於いて、無菌マウスに経口投与した。3 週間ビニールアイソレーター内に於いて飼育した後、大腸を採取して Treg 細胞数を確認した。クロストリジウム属菌定着ノトバイオートマウスに於いて、大腸 Treg 細胞の十分な (即ち SPF マウスと同等数の) 誘導が観察された。一方、他の細菌種、例えばラクトバチルス属菌やバクテロイデス属菌などのノトバイオートマウスに於いてはそのような Treg 細胞の

増加は認められないか、増加するとしても弱く且つマウスの系統によってばらつきがあった。以上のことから、クロストリジウム属菌の存在によって大腸 Treg 細胞は恒常的に誘導されていると考えられた。

Treg 細胞には、胸腺において Foxp3 陽性細胞として分化した、いわゆる natural Treg 細胞 (nTreg 細胞) と、一旦ナイーブ CD4 陽性 T 細胞として分化した後、末梢組織に於いて Foxp3 陽性となった、いわゆる inducible Treg 細胞 (iTreg 細胞) の 2 種類が存在する。最近 nTreg 細胞の多くは Helios という転写因子を発現しており、一方 iTreg 細胞は Helios 陰性であるという報告がなされた<sup>5)</sup>。この報告を基に抗 Helios 抗体を用いて検討した結果、SPF マウスの大腸には Helios 陽性細胞と陰性細胞が、大体 1 : 1 で存在していることが分かった<sup>3)</sup>。そして GF マウスに於いては、主に Helios 陰性の細胞、即ち iTreg 細胞と考えられる Treg 細胞が主に減少していた。さらに GF マウスで減少した Helios 陰性 Treg 細胞は、クロストリジウム属菌を投与することによって十分に回復した。従って、クロストリジウム属菌は主として iTreg 細胞を誘導することによって、大腸 Treg 細胞数を増加させていると考えられた。

更に興味深いことに大腸 iTreg 細胞は、nTreg 細胞と比較して、免疫抑制能に重要な CTLA-4 および IL-10 の発現が特に高いことも確認された。そして GF マウスでは、主としてこの CTLA4<sup>high</sup> IL-10<sup>high</sup> の iTreg 細胞分画が減少していた。クロストリジウム属菌の投与によって、CTLA4<sup>high</sup> IL-10<sup>high</sup> の iTreg 細胞が十分に回復した。

iTreg 細胞の誘導には周囲に TGF- $\beta$  の存在が必要であることが知られている。そこで、クロストリジウム属菌を定着させたマウスの上皮細胞における TGF- $\beta$  の産生を検討したところ、無菌マウスと比べて高濃度の TGF- $\beta$  が検出された。従って、クロストリジウム属菌は、上皮を刺激し TGF- $\beta$  の産生を促すことによって iTreg 細胞を誘導しているものと考えられた。

以上結果から、腸内細菌の中でもクロストリジウム属の細菌の増減が、Treg 細胞の増減をコントロールし、さらには腸炎の発症の抑制に寄与しているのではないかと考えられた。このことを検討するため、まだ腸内細菌の生態系が確立されていない 2 週齢の SPF マウスに、クロストリジウムを投与することにより、成体時にも腸内細菌全体の中でクロストリジウムの占める割合が多いマウスを作成した<sup>3)</sup>。このクロストリジウム属菌の

豊富なマウスは、通常のマウスと比較して大腸 Treg 細胞が多く、かつデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) や Oxazolone 誘発腸炎に対して抵抗性を示した。さらにこのマウスは、全身性の IgE 応答、即ちアレルギー応答も抑制された状態にあることが確認できた。

## 考 察

クロストリジウムの Treg 細胞の誘導メカニズムの詳細は未解明のままである。クロストリジウム定着により、大腸上皮における TGF $\beta$  の発現上昇が認められたが、さらなる検討が必要である。近年、炎症性腸疾患の患者の腸内においてクロストリジウム属の割合が減少していることが報告されている<sup>6)</sup>。そのためヒトにおいても、今回マウスを用いた実験において観察されたような機構が働いている可能性が十分にある。今後、ヒトに定着しているクロストリジウムの機能解析を進めることで、クロストリジウム属菌そのもの、あるいは、クロストリジウムに由来する物質を用いて、炎症性腸疾患やアレルギーなどの予防や治療法の開発に応用できると考えている。

## 要 約

転写因子 Foxp3 を発現する CD4 陽性制御性 T 細胞 (Treg 細胞) は、免疫系の恒常性維持に極めて重要な役割を果たしている。Treg 細胞は、マウス体内において消化管粘膜に最も多く存在する。我々は消化管常在菌であるクロストリジウム属菌 (特にクラスター IV と XIVa に属するクロストリジウム属菌) が、大腸 Treg 細胞の集積に重要な役割を果たしていることを見出した。即ち、無菌マウスに於いては大腸 Treg 細胞数が顕著に減少しているが、46 株のクロストリジウム属菌の投与によって、その数は十分に回復することを見出した。更に、クロストリジウム属菌の消化管への定着は、消化管上皮細胞からの TGF- $\beta$  産生を誘導し、それが Treg 細胞の分化を促進した。また、新生仔期にクロストリジウム属菌をマウスに経口投与すると、クロストリジウムの割合が多い成体マウスとなり、腸炎と IgE 誘導刺激に対して抵抗性を示した。これらの結果を応用することで、腸内細菌を利用した自己免疫疾患やアレルギーの新たな治療法につながるかもしれない。

## 謝 辞

本研究は公益財団法人三島海雲記念財団の平成 22 年度学術研究奨励金によって行われたものです。助成し

ていただきました公益財団法人三島海雲記念財団に深謝致します。

## 成果発表

Atarashi K, Tanoue T, Shima T, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science*. 331: 337-341, 2011

## 引用文献

- 1) Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell*. 140: 859-870, 2010.
- 2) Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 133: 775-787, 2008.
- 3) Atarashi K, Tanoue T, Shima T, et al. Induction of colonic

regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science*. 331: 337-341, 2011

4) Itoh K, Mitsuoka T. Characterization of clostridia isolated from faeces of limited flora mice and their effect on caecal size when associated with germ-free mice. *Lab Anim*. 19: 111-118, 1985.

5) Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*. 184: 3433-3441, 2010

6) Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104: 13780-13785, 2007.