

**【要約】**

Intestinal Th17 cells induced by commensal fungi

prevent inflammatory bowel disease

(常在真菌が誘導する腸管 Th17 細胞は炎症性  
腸疾患を抑制する)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：米山 光俊教授)

**BI BEIBEI**

## 概要：

本研究では、腸内常在真菌である *Candida albicans* (CA)が dextran sodium sulfate (DSS)誘導性大腸炎を改善することを明らかにした。また、腸炎時に CA がパイエル板や腸間膜リンパ節などの二次リンパ組織を介して、腸管の T helper (Th)17 細胞を特異的に誘導し、インターロイキン(IL)-17A と IL-17F の産生を増加させることを明らかにした。また、これらのサイトカインが腸管上皮バリアの修復を促進することにより、腸炎抑制に寄与していることを示した。また、別の腸内常在真菌である *Saccharomyces cerevisiae* (SC)は腸炎を抑制するが、腸管免疫の誘導を介したのではないことが分かった。

## 研究背景及び目的：

腸管免疫系の恒常性破綻に起因する疾患として、クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease, IBD)が挙げられる。多くの IBD 患者では、腸内微生物叢の破綻が観察される。近年、腸内細菌と宿主免疫系の関係について盛んに研究が展開されており、IBD の病因における腸内細菌の重要性が明らかになってきた。しかし、腸内微生物は細菌のみならず、真菌やウイルスなど、多岐にわたる。その中でも、腸内真菌が IBD にどのような影響を与えているかはほとんど解明されていない。

*Candida* 属真菌と *Saccharomyces* 属真菌は健常人の腸管に常在することが知られている。過去には、IBD 患者の腸管において健常人よりも CA が増加し、SC が減少することが報告されており、腸内真菌も腸内細菌と同様に宿主免疫系と相互作用し、IBD の発症誘導・制御に寄与する可能性が考えられる。そのため、私は腸内真菌が IBD の発症誘導・制御に与える影響について解析を試みた。

## 実験方法と結果：

まず、CA がマウスの腸管に定着するかどうかを調べた。野生型マウスに CA を経口投与すると、時間経過に伴い、腸管から CA が排除された。しかし、βラクタム系抗生物質であるアンピシリン(Amp)を投与して腸内細菌を減少させたマウスに CA を投与すると、腸管に CA が定着した。次に、腸炎が CA の定着に影響があるかどうかを調べた。Amp 投与により CA を定着させたマウスに DSS を投与し、腸炎を誘導した。このマウスの糞便中の CA を測定した結果、腸炎は CA の定着に影響しなかった。このことから、DSS 誘導性の炎症性因子は CA 排除に寄与しないことが示唆された。以上より、CA 定着腸炎マウスモデルが確立された。

次に、腸内細菌と CA が大腸炎に与える影響を調べた。Amp を投与して腸内細菌を減少させたマウスに DSS を投与すると、野生型マウスよりも腸炎発症後の生存率が低下した。しかし、Amp 投与マウスの腸管に CA を定着させたのちに DSS を投与すると、生存率が上昇した。また、Amp 投与腸炎マウスの上皮細胞は破壊され、絨毛が短縮し、goblet 細胞も減少した。一方、CA 定着腸炎マウスは、これらの組織学的所見が改善された。また、野生型マウスと比較して、Amp

投与マウスでは colitis score が高くなり、CA 定着マウスは、Amp 投与マウスより、colitis score が低くなった。このことから腸内細菌だけではなく、CA も大腸炎を抑制することが分かった。

次に、CA による腸炎抑制能が免疫調節を介したものであるかどうかを調べるために、上記マウスの腸管粘膜固有層(LP)の免疫細胞を採集してフローサイトメトリー解析を行った。その結果、CA 定着腸炎マウスでは、3 型自然リンパ球(group 3 innate lymphoid cell, ILC3)、好酸球、マクロファージ、 $\gamma\delta$  T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の量には変化がなかったが、好中球と CD4 陽性 T 細胞が顕著に誘導されていた。また、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を用いて CA 定着腸炎マウスの糞便中 IgA を定量した結果、Amp 投与腸炎マウスよりも増加していることが分かった。先行研究から、腸内細菌誘導性の好中球は、IL-22 を産生することにより腸炎を抑制することが報告されている。腸内細菌と同様に CA 誘導性好中球が腸炎を抑制するかを調べるために、CA 定着腸炎マウスに好中球除去抗体である抗 Ly6G 抗体を腹腔内注射した。その結果、好中球を除去しても、CA による腸炎抑制能は失われなかった。このことから、CA の腸炎抑制能は好中球を介したのではないことが示唆された。

次に、CA による腸炎抑制能が CD4 陽性 T 細胞の誘導を介したものであるかどうかを調べるために、胸腺由来 T 細胞を欠損したマウス *nude/nude* (*nu/nu*)と T, B 細胞を欠損したマウス *Rag2*<sup>-/-</sup>を用いた。*nu/nu* マウスや *Rag2*<sup>-/-</sup>マウスは野生型マウスと同様に DSS 投与後も生存率が 100%であり、抗生物質を投与すると生存率が低下した。興味深いことに、野生型マウスとは異なり、*nu/nu* マウスや *Rag2*<sup>-/-</sup>マウスは CA を定着させても生存率が増加しなかった。これらの結果は CA による腸炎抑制機構が T 細胞を介したものであることを示唆している。次に、*nu/nu* マウスや *Rag2*<sup>-/-</sup>マウスに野生型マウス由来の CD8 または CD4 陽性 T 細胞を移植したのちに CA を定着させ、DSS を投与すると、CD4 陽性 T 細胞を移植した群のみ生存率が上昇した。この結果は、CA による腸炎抑制能が CD4 陽性 T 細胞を介していることを示唆している。

CD4 陽性 T 細胞には T-bet 陽性の Th1 細胞、Gata3 陽性の Th2 細胞、Roryt 陽性の Th17 細胞、Foxp3 陽性の Treg 細胞などが存在する。どの CD4 陽性 T 細胞が腸炎抑制に寄与しているかを調べるために、CA 定着腸炎マウスの腸管 LP を採取しフローサイトメトリーを行い、CD4 陽性 T 細胞サブセットについて解析した。その結果、腸炎誘導時、CA は Th1 細胞、Th2 細胞、Treg 細胞を誘導しなかったが、Th17 細胞を誘導することが分かった。

Th17 細胞は homeostatic Th17 細胞と inflammatory Th17 細胞に分けられる。Homeostatic Th17 細胞は IL-23 非依存的に IL-17A、IL-17F、IL-22 を産生して、宿主恒常性維持に寄与する。一方、inflammatory Th17 細胞は IL-23 依存的に IL-17A と IFN- $\gamma$  を産生し、炎症の進行に関わっている。CA 誘導性 Th17 細胞がどのサイトカインを優先的に産生するかを調べるために、腸管 LP を採取し、上記のサイトカインについてフローサイトメトリー解析を試みた。その結果、CA 誘導性 CD4<sup>+</sup> T 細胞は、IFN- $\gamma$  ではなく、IL-17A と IL-17F を大量に産生することが分かった。また、腸

管 LP におけるサイトカインの mRNA を、定量的 PCR を用いて定量した。その結果、CA 定着マウスの腸管 LP においては、IL-22 と IFN- $\gamma$  の mRNA は少なく、IL-17A と IL-17F の mRNA が多く存在することが分かった。また、CA 定着マウスの腸管には、IL-23 ではなく、IL-1 $\beta$  が多いことも分かった。このことから、CA 誘導性 Th17 細胞は IL-1 $\beta$  を介して、IL-17A と IL-17F を誘導する homeostatic Th17 細胞であることが示唆された。

上記の実験結果より、CA 誘導性 IL-17A と IL-17F が腸炎抑制に寄与することが考えられた。CA 誘導性 Th17 細胞から産生された IL-17A と IL-17F が大腸炎抑制に寄与するかを明らかにするために、IL-17A と IL-17F に対する *in vivo* 中和抗体を、CD4 陽性 T 細胞を移植した CA 定着 nu/nu や Rag2<sup>-/-</sup>マウスに投与し、腸炎抑制能が阻害されるか検証した。その結果、IL-17A もしくは IL-17F がない場合、腸炎発症後のマウスの生存率が大幅に減少することがわかった。このことから、CA が Th17 細胞を誘導し、IL-17A と IL-17F を介して腸炎を抑制することが示唆された。

次に、CA による Th17 細胞誘導機序の解析を試みた。まず、腸管のどの部位で CA による Th17 細胞の誘導が行われているのかを調べるために、腸管各部位における CA の定着の有無を調べた。その結果、CA は胃から大腸末端までの腸管全域に定着していることが分かった。腸管粘膜は絨毛、固有層と二次リンパ組織によって構成されている。CA が絨毛ではなく、パイエル板や腸間膜リンパ節(mesenteric lymph node, MLN)などの二次リンパ組織から検出された。一般的に、パイエル板は腸内微生物を取り込み、免疫を誘導する場として知られている。そのため、CA による Th17 細胞の誘導に置いて二次リンパ節が重要である可能性が考えられた。

そこで、CA による Th17 細胞の誘導が二次リンパ組織で行われることを確認するために、二次リンパ組織を欠損したマウス aly/aly を用いて CA を定着させた。フローサイトメトリー解析を行った結果、aly/aly マウスは CA が定着しても、Th17 細胞が誘導されず、IL-17A と IL-17F の量も増加しなかった。これらの結果から、CA がパイエル板や腸間膜リンパ節などの二次リンパ組織を介して Th17 を誘導し、IL-17A と IL-17F を産生させることが分かった。

次に、CA 誘導性 IL-17A と IL-17F の作用機序を調べた。先行研究から、腸管上皮細胞層の修復が DSS 誘導性大腸炎の回復に重要であると報告されていた。そのため、CA 誘導性 IL-17A と IL-17F が腸管上皮細胞に作用するかを検証した。はじめに、CA 定着腸炎マウスの大腸の組織を採取し、BrdU 染色と TUNEL 染色を用いて腸管上皮細胞の増殖とアポトーシスを調べた。その結果、腸炎時、CA は腸管上皮細胞の増殖とアポトーシスを促進した。また、細胞増殖マーカーとして知られる Cyclin D1 と cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)の mRNA 量も増加した。このことから、CA が腸管上皮細胞の増殖を誘導し、上皮バリアの修復を促進することが分かった。次に、CA が IL-17A と IL-17F を介して腸管上皮バリアの修復に寄与するかどうかを調べるために、IL-17A と IL-17F に対する *in vivo* 中和抗体を CD4 陽性 T 細胞が移植した CA 定着 nu/nu や Rag2<sup>-/-</sup>マ

ウスに投与し、腸管上皮細胞を採取した。その結果、IL-17A もしくは IL-17F が中和されている場合、上皮細胞の増殖やアポトーシスが抑制され、Cyclin D1 と CDK4 の mRNA 量も減少した。このことから、CA が IL-17A と IL-17F を介して腸管上皮バリアの修復を促進することが分かった。

次に、CA 以外の腸内常在真菌が腸炎抑制能を持っているかを調べるために、SC を用いた。SC は CA と同様に、Amp により腸内細菌を減少させたマウスの腸管に定着した。また、腸炎は SC の腸管定着に影響しなかった。次に、CA 定着マウスと同じ濃度の DSS を SC 定着マウスに投与すると、マウスの生存率は回復しなかった。しかし、DSS の濃度を下げると、Amp 投与腸炎マウスと比較し、SC 定着腸炎マウスの生存率が上昇した。このことから、SC は腸炎を抑制するが、CA より効果が弱いことが示された。

次に、SC が CA と同様に、腸管免疫細胞を誘導するかどうかを調べるために、SC 定着腸炎マウスの LP 細胞を採集し、フローサイトメトリーを行った。その結果、SC は ILC3、好中球、好酸球、マクロファージにくわえて、T 細胞も誘導しなかった。また、SC マウスの糞便中 IgA の量も変わらなかった。このことから、SC は CA と異なり、腸管免疫細胞を誘導しないことが分かった。

#### **考察および将来の展望：**

腸炎時、腸内細菌が誘導した ILC3 と好中球は、IL-23 依存的に IL-22 を産生し、腸炎抑制に寄与するという報告がある。しかし本研究では、CA 定着腸炎マウスの腸管における IL-22 と IL-23 の量は少なく、CA 誘導性の ILC3 と好中球も腸炎抑制に寄与していなかった。これらの結果から、CA 誘導性 ILC3 と好中球は、IL-23 量が少ないために、IL-22 産生が促進されず、腸炎抑制に寄与しないものと考えられる。

SC は腸炎を抑制したが、腸管免疫を誘導できなかった。CA と SC による腸炎抑制効果と機構の違いは、菌体の構造の差異に起因すると考えられる。Mannan は真菌の細胞壁の一部として知られている。CA mannan は SC mannan より主鎖からの分岐が多く、分子量も大きい。実際に、過去には、SC mannan が IL-17 産生を誘導できず、CA mannan が IL-17 産生を誘導できるという報告があり、この mannan の構造の違いにより免疫細胞の誘導能が異なる可能性が考えられる。また、CA は TLR2, TLR4, Dectin-1, Dectin-2, Mannose receptor, DC-SIGN, Mincle などの受容体と結合し、免疫細胞を誘導することが知られている。今後、CA がどの受容体と結合し、腸管の Th17 細胞を誘導するかを解明する必要がある。

CA は IL-17A/F を介して上皮バリアの増殖を促進することが分かった。IL-17 は NF- $\kappa$ B と MAPK pathway を刺激することが知られている。将来、CA がどの pathway を介して腸炎抑制に寄与するかを調べる必要がある。