



シリーズ 腸内細菌叢 7

腸内細菌による免疫制御

Gut microbiota shapes host immunity

は せ こう じ
長 谷 耕 二
Koji HASE

はじめに

われわれヒトの大腸には体細胞数と同程度の腸内細菌が生息している。腸内細菌叢は、難消化性多糖から短鎖脂肪酸などの代謝物を産生することで、宿主細胞の生理機能に広範囲な影響を及ぼす。短鎖脂肪酸の一つである酪酸は、腸上皮細胞の主要なエネルギー源として利用されるだけでなく、Gタンパク質共役受容体 (GPCR) への結合やエピゲノム修飾変化を促すことで免疫系や代謝系の調節を行っている¹⁾。腸内細菌の影響を最も受けやすい腸管免疫系は多様な細胞が複雑な免疫ネットワークを形成しながら、恒常性を維持している。免疫応答の誘導組織であるパイエル板・孤立リンパ小節などの消化管関連リンパ組織には、樹状細胞や抗原に暴露されていないナイーブT細胞およびB細胞が多く存在し、M細胞依存的に取り込まれた抗原により胚中心反応が惹起され、IgAへのクラススイッチが誘導される。一方、実効組織である腸管粘膜固有層には、マクロファージや樹状細胞などのミエロイド系細胞に加え、最終分化したT細胞サブセット、IgA陽性形質細胞、自然リンパ球 (innate lymphoid cell : ILC) などが存在している。このうち、ヘルパーT細胞(Th細胞)は獲得免疫の司令塔であり、その産生サイトカインおよび転写因子の発現によりTh1, Th2, Th17, および、制御性T(regulatory T : Treg)細胞などのサブセットに分けられる。腸内細菌叢の種類や構成は免疫系の発達に重要であり、ヒトやラット由来の腸内細菌叢を無菌マウスに定着させても、腸管免疫システムは完全には成熟しない²⁾。つまり、免疫システムが成熟し完全な機能を持つためには、宿主生

物と共進化を遂げてきた動物種特異的な腸内細菌叢が必要であることが示唆される。本稿では、腸内細菌による免疫制御に関する最新の知見を紹介し、腸内細菌による免疫調節機構と炎症・アレルギーとのかかわりについて考察する。

I. 腸内細菌の定着による免疫系の成熟

1. 無菌マウスにおける免疫系の異常

これまで、無菌状態で飼育したマウスや、抗生物質投与により腸内細菌叢を除去したマウスの観察結果から、腸内細菌が宿主免疫系の成熟やバリア機能の維持に大きく影響している。例えば、無菌マウスでは、孤立リンパ小節などの腸管関連リンパ組織の発達が悪い。また、無菌マウスでは、通常飼育マウスと比較して抗菌ペプチド産生が少なく、腸上皮の増殖回転が遅いなど、粘膜上皮バリア機能が低下している³⁾。腸管粘膜固有層には、全身免疫系とは異なる特殊な免疫細胞が多数存在するが、これらの分化や機能も腸内細菌により制御されている。粘膜面の主要抗体であるIgAを産生する形質細胞や、 $\gamma\delta$ T細胞をはじめとする上皮内リンパ球は、無菌環境では著しく数が減少する。また、炎症誘導性のIL-17A産生性のCD4陽性T細胞(Th17)やTreg細胞の数も無菌環境では数が少ない。これら免疫異常の多くは、無菌マウスに通常マウス由来の腸内細菌叢を移植することで正常化する。

2. 腸内細菌による自然リンパ球の活性化

ILCは近年同定された抗原受容体を持たないリンパ球サブセットであり、特定のサイトカインを活発

に産生しヘルパー機能を発揮する。この機能により、自然免疫系と獲得免疫系を繋ぐ重要な役割を担っている。腸管には GATA3 を発現する ILC2 や、ROR γ t を発現する ILC3 が比較的多く集積している。ILC2 は IL-13 などの分泌を介して寄生虫の防御に働く。一方、ILC3 (特に NKp46 陽性サブセット) は IL-22 を活発に産生して上皮細胞からの抗菌タンパクの発現を高めることで、*Citrobacter rodentium* などの粘膜感染菌の排除に重要な役割を果たしている。グラム陽性の偏性嫌気性細菌であるセグメント細菌 (segmented filamentous bacteria : SFB) は、回腸上皮にフコシルトランスフェラーゼ 2 を誘導することで、頂端面タンパク質のフコシル化を促進する。この作用には ILC3 が発現する IL-22 と LT α 1 β 2 を介したシグナルが必要である。このうち、IL-22 の発現は SFB 依存的であるが、LT α 1 β 2 は腸内細菌非依存的に恒常的に発現している。ILC3 を介した上皮頂端面のフコシル化は *Salmonella enterica* serovar Typhimurium の感染を阻害する⁴⁾。また、*C. rodentium* の感染初期においては ILC3 によって産生された IL-22 が腸上皮細胞に作用し、抗菌性レクチンである Reg III ファミリーの産生を誘導することで、コロニー形成を阻害する⁵⁾。さらに、移植片対宿主病 (GVHD) モデルにおいて、ILC3 由来の IL-22 が腸上皮幹細胞の再生を促す事も報告されている⁶⁾。このように ILC3 は感染防御のみならず、上皮細胞の修復にも重要な役割を果たしている。

これまで ILC は各種マスター転写因子 (T-bet, GATA3, ROR γ t) の発現によって 3 つのグループ (ILC1 ~ 3) に分類されてきたが、最近、シングルセル解析によって遺伝子発現やエピゲノム状態に基づき、ILC1a ~ d, ILC2a ~ d, および、ILC3a ~ e のサブセットに区別されている。さらに、ILC1 ~ 3 とは明らかに遺伝子発現プロファイルの異なる ILCXa, b というサブセットも同定されている⁷⁾。これら 15 種類のうち、7 つの ILC サブセットは腸内細菌の存在によって遺伝子発現が変化する。例えば、腸内細菌の存在は ILC3a など複数のサブセットにおいて *Il17a* 遺伝子の発現に必要である。

3. ヘルパー T 細胞の分化調節

1) Th17 細胞の誘導

腸管においては Th17 と Treg が主要な Th 細胞で

ある。Th17 は炎症性サイトカインである IL-17 を分泌するリンパ球であり感染防御や自己免疫性疾患の発症に関与している。上述の SFB を無菌マウスに投与すると Th17 細胞が小腸に誘導されることから、SFB はマウス小腸における Th17 の強力な誘導因子と考えられる。SFB の定着は、多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎において、Th17 細胞を活性化し症状を悪化させる⁸⁾。

最近 2 つの研究グループにより SFB による Th17 細胞誘導メカニズムが明らかにされている。本田らは腸管上皮への SFB が接着は、C/EBP δ 依存的に血清アミロイド A (SAA) 1 および 2 の発現を高めることを示した⁹⁾。SAA1 は腸管の樹状細胞からの IL-1 β の発現を誘導し、Th17 細胞の分化を促進する。一方、Littman らは SAA1/2 二重欠損マウスでは SFB 定着後の回腸における ROR γ + T 細胞の割合に変化は見られないものの、本細胞集団における IL-17A 発現細胞の数が減少することを示した¹⁰⁾。このように SAA1/2 は Th17 細胞のサイトカイン発現を促すのかもしれない。SFB の上皮接着は SAA1/2 以外にも活性酸素の合成酵素である Dual oxygenase 2 (Duox2) の発現を高める。活性酸素の除去剤である N-acetyl-L-cystein (NAC) を SFB 定着マウスに投与すると Th17 細胞の誘導は部分的に抑制されるため、Duox2 によって産生される活性酸素もまた Th17 細胞の誘導にかかわっているようである⁹⁾。SFB 以外にも、上皮への接着活性を有する *C. rodentium* や腸管出血性大腸菌 O157 には Th17 誘導活性が認められる。またヒト腸管由来の常在菌の中にも上皮接着性であり Th17 細胞誘導活性を持つものが存在する。今後、これらの Th17 誘導性の腸内細菌種と、炎症性腸疾患や多発性硬化症などの疾病とのかかわりについて研究が進むことが予想される。

2) 制御性 T 細胞の誘導

腸内細菌の定着は感染防御に重要な Th17 細胞の分化を誘導するが、一方で、過剰な免疫応答は炎症性腸疾患などの慢性炎症の引き金となる。したがって、腸管免疫系には強力な免疫寛容機構が備わっている。SPF マウスの大腸粘膜固有層に存在する CD4 陽性 T 細胞のうち約 30% は Treg で占められており、腸内細菌に対する炎症反応の抑制に寄与している。Treg は、胸腺で分化する Thymus-derived Treg (tTreg) と、末梢組織でナイーブ T 細胞から分化す

る peripherally-generated Treg (pTreg) の2種類に分類され(図1)、マウス大腸においてはこれらがおよそ1:2の割合で存在している。腸管に存在するpTregの中には、従来Th17特異的に発現するとされてきたROR γ tを発現する、特殊な細胞集団(ROR γ t⁺Foxp3⁺CD4⁺T細胞)が存在する¹¹⁾。

大腸粘膜固有層におけるTregの誘導は腸内細菌に依存的である。無菌環境では、Tregの割合は全CD4陽性T細胞の10%以下に留まっているが、腸内細菌を定着させるとSPFマウスと同程度にまで増加する¹²⁾。最近、主としてクロストリジウム目クラスターIV, XIVa, XVIIIに属し、大腸Tregの細胞数を増加させるヒト糞便由来の17菌株のカクテルが同定され¹³⁾、炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease: IBD)の治療に向けた臨床開発がアメリカで進められている。さらに、無菌マウスに altered Schaedler flora (ASF) と呼ばれる8種類の常在菌カクテルを定着させると大腸におけるTregが誘導される¹⁴⁾。一方、*Bacteroides fragilis*はpolysaccharide A (PSA)を産生することで、IL-10産生性のTreg細胞を増加させる^{15,16)}。IL-10は制御性B細胞やミエロイド系細胞によっても産生されるが、*Clostridium butyricum*は腸管においてIL-10産生性のマクロファージを誘導し、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発性大腸炎の発症を緩和する¹⁷⁾。

大腸と異なり、小腸のTreg細胞は無菌マウスにおいて見かけ上変化しないことから¹²⁾、当初、小腸

のTregは腸内細菌非依存的に食事抗原によって誘導されると考えられていた。しかしながら、小腸のROR γ t陽性pTreg細胞の割合は無菌マウスや抗生物質投与マウスで減少する。一方、食事抗原タンパク抗原を含まない成分栄養剤を離乳直後のSPFマウスに与えると、ROR γ t陰性pTregの割合が減少する¹⁸⁾。つまり、小腸では、腸内細菌によってROR γ t陽性pTreg細胞が誘導され、食事抗原によってROR γ t陰性pTreg細胞が誘導されるようである。

II. 腸内細菌の定着によるアレルギーの制御

1. 腸内細菌によるIgEの抑制

無菌状態で飼育したマウスは、SPF環境下で飼育したマウスに比べてTh2応答優位であり、血清中IgE値も有意に高い¹⁹⁾。興味深いことに、生後5週齢までの若い無菌マウスにSPF由来の腸内細菌叢を移植するとIgE応答は抑制されるが、完全に成熟した12週齢の無菌マウスにSPF細菌を定着させてもIgE応答は抑制されない。さらに、若齢の無菌マウスに限られた種類の腸内常在菌を定着させた場合にもIgE応答は抑制されない。これらの知見より、乳児期に十分なバリエーションを有する腸内細菌が定着することが、Th2応答を抑制しIgEの産生を低下させるために重要と考えられる(図1)。同様に、無菌マウス、または、抗生物質カクテルを持

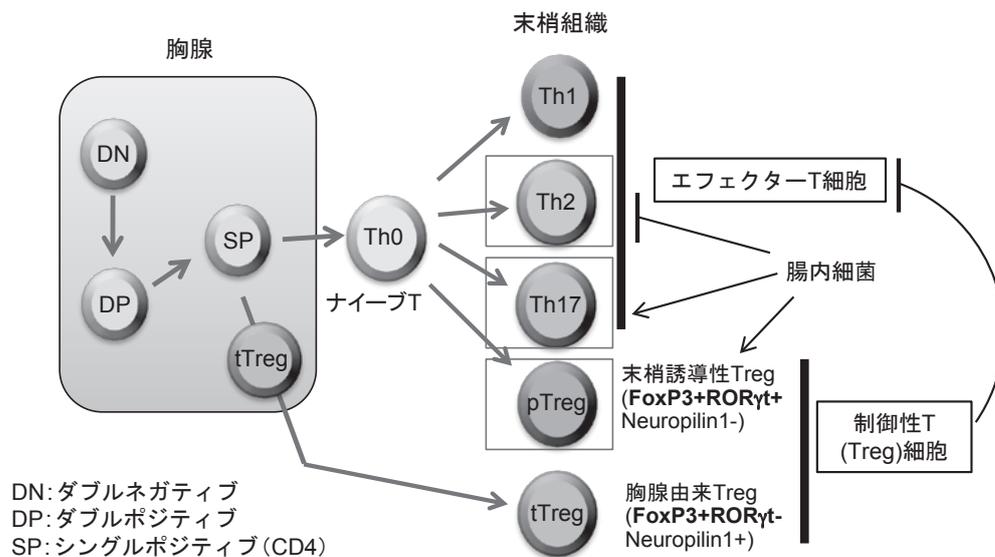


図1 Th細胞の発生分化の様式と腸内細菌の影響を示す。腸内細菌の定着はTh17細胞とpTreg細胞を誘導する。その一方でTh2細胞を抑制する。

続投与し腸内細菌を攪乱したマウスにピーナッツ抗原を投与すると、無処置の SPF マウスに比較して抗原特異的 IgE および IgG の上昇とアナフィラキシーの悪化が観察される²⁰⁾。しかし、離乳直後の無菌マウスに 3% クロロフォルム耐性菌（主に芽胞を形成するクロストリジウム目の細菌群で構成される）を投与すると、アレルギー反応は抑制される。この際には、大腸の Treg 細胞が増加し、分泌型 IgA の産生が高まる。加えて、3 型自然リンパ球（ILC3）が活性化し、大腸において IL-22 を産生する。IL-22 は、ムチンなどの腸管バリアを強化することで、ピーナッツアレルギーの血中移行を抑制する²⁰⁾。

2. pTreg による Th2 応答の抑制

末梢組織において pTreg 細胞が誘導される際には、Treg のマスター転写因子である *Foxp3* 遺伝子のイントロン領域に存在する *CNS1* (conserved non-coding sequence 1) エンハンサー領域に各種転写因子が結合する必要がある²¹⁾。この *CNS1* 領域を欠失させたマウスでは、pTreg 細胞の分化誘導が起らないために、粘膜組織における Th2 応答が増加し、形質細胞の浸潤を特徴とする腸炎 (plasmacytic enteritis) とアレルギー性気道炎を自然発症する²²⁾。このように *CNS1* エンハンサー活性によって誘導される pTreg は主にアレルギー反応の抑制に寄与しているようである。腸内細菌によって誘導される ROR γ t 陽性 Treg 細胞は活性化マーカー (CD103) や免疫抑制分子 (IL-10, CTLA4) を高発現している。Treg 特異的に ROR γ t をノックアウトしたマウスでは Th2 応答が亢進することから¹¹⁾、大腸 pTreg による Th2 応答の抑制には ROR γ t の発現が必要と考えられる。

Ⅲ. 短鎖脂肪酸による免疫修飾機構

1. 酪酸による Treg 細胞の誘導

クロストリジウム目クラスター IV, XIVa による Treg 誘導作用には腸内細菌によって産生される短鎖脂肪酸が重要な役割を果たしている。筆者らはこれまでに、短鎖脂肪酸の一つである酪酸が Treg 細胞の分化を誘導することを見出している (図 2)²³⁾。酪酸はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害活性を有しており、ナイーブ Th 細胞のエピゲノム状

態を変化させる。ナイーブ T 細胞を酪酸で処理すると、*Foxp3* 遺伝子座における、プロモーター領域、*CNS1* および *CNS3* エンハンサー領域のヒストンアセチル化の亢進が認められた。以上の結果より、酪酸は *Foxp3* 遺伝子座のヒストンアセチル化を介して *Foxp3* 発現を誘導し、Treg 分化を促進すると考えられる。

酪酸には T 細胞への直接作用以外にも、Gpr109a 依存的にマクロファージや樹状細胞からの IL-6 の発現を低下させ、IL-10 やレチノイン酸の産生を高める作用がある。レチノイン酸は Treg 細胞の分化を促進し、IL-10 は Treg 細胞からのさらなる IL-10 産生を促し免疫抑制機能を付与する。また短鎖脂肪酸のカクテルをヒト腸管上皮細胞株の培養液に添加すると TGF- β 産生が高まる¹³⁾。以上のように短鎖脂肪酸は複数の作用点を介して、大腸における Treg 細胞の数を増加させるようである¹⁾。炎症性腸疾患 (IBD) の患者では、酪酸産生菌の低下や短鎖脂肪酸トランスポーターの発現低下が報告されている。そこで、筆者らは健常人、および、代表的な IBD であるクローン病 (CD) および潰瘍性大腸炎患者 (UC) において、便中に含まれる各種短鎖脂肪酸の濃度を測定したところ、CD および UC いずれにおいても、酪酸のみが健常人と比較して有意に低下していることが判明している (未発表データ)。酪酸産生の低下は、寛解期よりも活動期において顕著であった。この現象は炎症の結果か原因かは明らかではない。しかしながら、マウスの大腸内で酪酸濃度を高めると Treg が誘導されて、実験的大腸炎の症状を緩和することから²³⁾、大腸において産生された酪酸は腸内細菌に対する過剰な免疫応答を抑制することで、腸管炎症の抑制に寄与していると考えられる。

2. 短鎖脂肪酸による全身免疫系の調節

腸内細菌由来の短鎖脂肪酸は、これまで述べてきたような粘膜での免疫応答だけでは、全身の免疫応答にも影響を与える。マウスに食物せんいを豊富に含む食餌 (高せんい食) を与えると、腸管内だけではなく血中の短鎖脂肪酸濃度も上昇する。高せんい食を与えたマウスでは、Th2 細胞と呼ばれるエフェクター T 細胞により引き起こされるアレルギー性気管支炎の発症が抑制される一方で、低せんい食を与えると逆に症状が悪化する。短鎖脂肪酸の中でも、

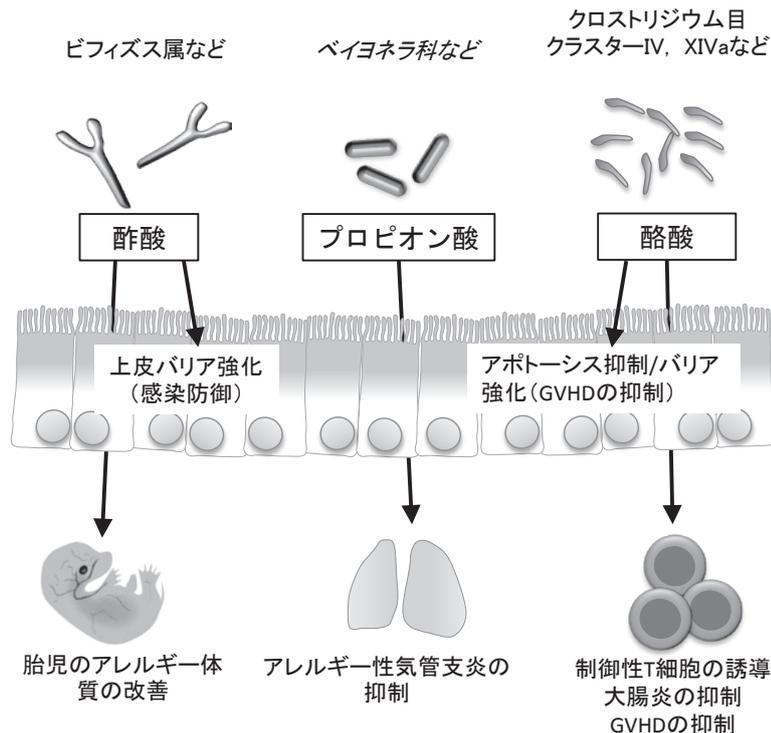


図2 短鎖脂肪酸による上皮バリア・免疫修飾作用

プロピオン酸を投与すると骨髄での樹状細胞とマクロファージの前駆細胞の分化に影響を与え、アレルギーを引き起こすTh2免疫応答を阻害することがその現象の機序であると考えられている(図2)。このプロピオン酸によるアレルギー抑制作用はGPR41に依存する²⁴⁾。また、妊娠マウスに高せんい食を与えるとその仔マウスは、ハウスダストによって惹起されるアレルギー性の気管支疾患の症状が抑制されることが報告されている。これは酢酸による作用であり、事実酢酸を妊娠マウスに投与しても、同様に仔マウスではアレルギー性の気管支疾患の症状が抑制される。妊娠中の高せんい食または酢酸の投与は、胎児の肺における遺伝子発現を変動させることが原因であるようだが、詳細なメカニズムは今後の解明が待たれる²⁵⁾。さらに著者は、自己免疫疾患の一つである関節リウマチのマウスモデルにおいて、腸管の酪酸濃度を高めると関節炎の発症が抑制されることを見出している(未発表データ)。関節リウマチは、高せんい食を与えると症状が改善することや、逆に食物せんい欠乏食を与えると症状が悪化することが知られていることから、食物せんい由来の酪酸が発症抑制に重要な要因であることは十分に考えられる。現在、酪酸による全身性自己免疫応

答の抑制メカニズムを解析中である。また、酪酸をマウスに経口投与すると、腸上皮細胞のヒストンH4アセチル化が亢進することで上皮バリア関連遺伝子群の発現を高まり、アロジェニックな骨髄移植によって引き起こされる移植片対宿主病(GVHD)を緩和することも報告されている²⁶⁾。

おわりに

近年、腸内細菌が腸管免疫系に与える影響の解明が進む一方で、腸内細菌が全身免疫系にも影響するという報告が相次いでいる。腸内細菌が産生する多様な代謝物が全身に移行することで免疫調節を発揮していると想定されているものの、十分な解明には至っていない。臨床的にも、炎症性腸疾患、自己免疫疾患、糖尿病、肝硬変、肥満、神経疾患など複数の疾患において、腸内細菌叢の異常(ディスバイオーシス)が観察され、病態形成とのかかわりについて注目が集まっている。さらには、抗CTLA-4抗体および抗PD-L1抗体といった免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果が、バクテロイデス属細菌やビフィズス菌によって高まることが判明している。今後、腸内細菌による免疫・代謝調節機構を解明する

ことで、疾患の発症機構や薬効発現における腸内細菌の役割に関して解明が進むことが期待される。

文 献

- 1) Lee, W.-J. & Hase, K. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat. Chem. Biol.* 2014 ; **10** : 416-424.
- 2) Chung, H. *et al.* Gut Immune Maturation Depends on Colonization with a Host-Specific Microbiota. *Cell.* 2012 ; **149** : 1578-1593.
- 3) Obata, Y., Furusawa, Y. & Hase, K. Epigenetic modifications of the immune system in health and disease. *Immunol. Cell Biol.* 2015 ; **93** : 226-232.
- 4) Goto, Y. *et al.* Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science.* 2014 ; **345** : 1254009.
- 5) Zheng, Y. *et al.* Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* 2008 ; **14** : 282-289.
- 6) Lindemans, C. A. *et al.* Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature* (2015). doi:10.1038/nature16460
- 7) Gury-BenAri, M. *et al.* The Spectrum and Regulatory Landscape of Intestinal Innate Lymphoid Cells Are Shaped by the Microbiome. *Cell.* 2016 ; **166** : 1231-1246. e13.
- 8) Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y. & Mazmanian, S. K. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2011 ; **108 Suppl 1** : 4615-4622.
- 9) Atarashi, K. *et al.* Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell.* 2015 ; **163** : 367-380.
- 10) Sano, T. *et al.* An IL-23R/IL-22 Circuit Regulates Epithelial Serum Amyloid A to Promote Local Effector Th17 Responses. *Cell.* 2015 ; **163** : 381-393.
- 11) Ohnmacht, C. *et al.* The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ t⁺ T cells. *Science.* 2015 ; **349** : 989-993.
- 12) Atarashi, K. *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science.* 2011 ; **331** : 337-341.
- 13) Atarashi, K. *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature.* 2013 ; **500** : 232-236.
- 14) Geuking, M. B. *et al.* Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity.* 2011 ; **34** : 794-806.
- 15) Round, J. L. & Mazmanian, S. K. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010 ; **107** : 12204-12209.
- 16) Mazmanian, S. K., Round, J. L. & Kasper, D. L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature.* 2008 ; **453** : 620-625.
- 17) Hayashi, A. *et al.* A single strain of Clostridium butyricum induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. *Cell Host Microbe.* 2013 ; **13** : 711-722.
- 18) Kim, K. S. *et al.* Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. *Science* (2016). doi:10.1126/science.aac5560
- 19) Cahenzli, J., Köller, Y., Wyss, M., Geuking, M. B. & McCoy, K. D. Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. *Cell Host Microbe.* 2013 ; **14** : 559-570.
- 20) Stefka, A. T. *et al.* Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014 ; **111** : 13145-13150.
- 21) Zheng, Y. *et al.* Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature.* 2010 ; **463** : 808-812.
- 22) Josefowicz, S. Z. *et al.* Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature.* 2012 ; **482** : 395-399.
- 23) Furusawa, Y. *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature.* 2013 ; **504** : 446-450.
- 24) Trompette, A. *et al.* Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat. Med.* 2014 ; **20** : 159-166.
- 25) Thorburn, A. N. *et al.* Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nature Communications.* 2015 ; **6** : 7320.
- 26) Mathewson, N. D. *et al.* Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nat Immunol.* 2016 ; **17** : 505-513.