

- Kato-Yamada, Y., Nagai, T., & Noji, H. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 15651–15656.
- 2) 今村博臣, 横山 謙 (2007) 生化学, **79**, 425–437.
  - 3) Kato-Yamada, Y. & Yoshida, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 36013–36016.
  - 4) Kato-Yamada, Y. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 6875–6878.
  - 5) Iino, R., Murakami, T., Iizuka, S., Kato-Yamada, Y., Suzuki, T., & Yoshida, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 40130–40134.
  - 6) Yagi, H., Kajiwara, N., Tanaka, H., Tsukihara, T., Kato-Yamada, Y., Yoshida, M., & Akutsu, H. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11233–11238.
  - 7) Kotera, I., Iwasaki, T., Imamura, H., Noji, H., & Nagai, T. (2010) *ACS Chem. Biol.*, **5**, 215–222.
  - 8) 今村博臣 (2010) 実験医学, **28**, 1303–1308.
  - 9) Warburg, O. (1956) *Science*, **124**, 269–270.
  - 10) Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., & Thompson, C.B. (2009) *Science*, **324**, 1029–1033.
  - 11) Berg, J., Hung, Y.P., & Yellen, G. (2009) *Nat. Methods*, **6**, 161–166.
  - 12) Khakh, B.S. & North, R.A. (2006) *Nature*, **442**, 527–532.
  - 13) Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J.J., Harden, T.K., Leitinger, N., & Ravichandran, K.S. (2009) *Nature*, **461**, 282–286.
  - 14) Chen, Y., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkernagel, A., Nizet, V., Insel, P.A., & Junger, W.G. (2006) *Science*, **314**, 1792–1795.

今村 博臣

(大阪大学 産業科学研究所・  
科学技術振興機構 さきがけ)

Fluorescence imaging of intra- and extra-cellular ATP  
Hiromi Imamura (Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, and PRESTO, Japan Science and Technology Agency, 8-1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan)

## 腸内細菌による Th17 細胞分化

### 1. はじめに

消化管は日常的に様々な微生物が侵入する危険にさらされている。そのため消化管粘膜免疫系は、侵入してくる病原微生物を迅速に排除するために、常に活性化状態に保って備えている。粘膜免疫細胞は、病原体排除のために炎症を起こすだけでなく、消化管上皮細胞に常時働きかけて抗菌ペプチドの産生を促進したり、あるいは上皮組織の修復

を促進したり、粘膜のバリアの維持・補強にも重要な働きをしている。消化管腔内には約 1,000 菌種に及ぶ腸内細菌が存在している。腸内細菌が存在しないと、粘膜バリアは脆弱となり病原体の侵入を受けやすくなることが知られている。つまり腸内細菌によって、宿主は免疫系を活性化状態に保つことができているのである。腸内細菌は我々にとって無くてはならないものであり、“共生体 (symbiont)” であると言える。

消化管には多数の T 細胞が存在する。T 細胞は骨髄で産生され、その大半が胸腺で分化・成熟する。成熟した T 細胞は血液中に放出され、リンパ節や腸管などにおいて抗原刺激を受けて活性化する。T 細胞は、細胞表面に CD4 を発現するものと CD8 を発現するものがある。CD8 陽性 T 細胞はその役割から細胞障害性 T 細胞と呼ばれ、一方 CD4 陽性 T 細胞はヘルパー T 細胞 (Th 細胞) と呼ばれている。従来、活性化した Th 細胞は、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を主に産生するタイプ (“Th1 細胞” と呼ばれる) と、インターロイキン (IL)-4 を産生するタイプ (“Th2 細胞” と呼ばれる) の二つに分けて考えられてきた。Th1 細胞は細胞性免疫を亢進し、Th2 細胞は液性免疫 (抗体応答) を亢進する。しかしながら、この Th1・Th2 パラダイムだけでは説明できない現象が数多く存在していた。これに対して最近になって、Th 細胞には、少なくともさらにもう 1 種類の細胞群が存在することが明らかになった。それが Th17 細胞である<sup>1)</sup>。Th17 細胞は IL-17 と IL-22 を高産生することを特徴とする。IL-17 は細胞遊走や炎症を引き起こすことで知られるサイトカインである。Th17 細胞は、抗菌ペプチド誘導因子として知られる IL-22 なども産生し、緑膿菌、肺炎菌、病原性大腸菌、カンジダ菌などの細菌・真菌感染防御に重要な働きをすることが知られている。その一方で、Th17 細胞の過剰活性化が多発性硬化症や関節リウマチ、慢性炎症性腸疾患の発症や増悪に密接に関わっているという報告が数多くなされており、自己免疫疾患という文脈でも非常に注目されている。即ち、Th17 細胞の数を人為的に増加させることができれば、感染症の治療に役立つと考えられるし、逆にその数を人為的に減少させることができれば、自己免疫疾患の治療になると考えられる。Th17 細胞は消化管粘膜固有層において、常時、多数存在する。本稿では、腸内細菌による消化管粘膜固有層の Th17 細胞の分化誘導メカニズムについて最近の知見を紹介する。

## 2. Th17細胞分化

ナイーブCD4陽性T細胞からTh17細胞への分化は、複数の転写因子によって制御されている。中でもRAR-related orphan receptor gamma (ROR $\gamma$ t) という核内受容体型転写因子が発現することが必須である<sup>2)</sup>。ROR $\gamma$ tと同じファミリーに属するROR $\alpha$ も、Th17細胞分化を促進するし、他にもinterferon regulatory factor 4 (IRF4)も重要であることが知られている。更にAP-1ファミリー転写因子の一つであるBATF (basic leucine zipper transcription factor, ATF-like)もTh17細胞分化を強力に促進する。従ってTh17細胞の分化過程は、ROR $\gamma$ t・ROR $\alpha$ ・BATF・IRF4という複数の転写因子が働くことによって、そのプログラムが進行すると考えられる<sup>3)</sup>。

このようなTh17分化プログラムは、T細胞受容体の抗原刺激と共に、細胞周囲にIL-6とトランスフォーミング増殖因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ )という二つのサイトカインが存在することによって開始される<sup>1)</sup>。TGF- $\beta$ による刺激だけでもROR $\gamma$ tの発現は誘導される。しかしながらこの場合は同時に制御性T細胞 (Treg細胞)の分化誘導因子であるforkhead box P3 (Foxp3)も誘導され、Foxp3がROR $\gamma$ tと結合しその活性を抑制するため、Th17細胞への分化は抑制されてしまう。そこにIL-6が加わることによって、STAT3活性化を介してFoxp3の発現が抑制され、ROR $\gamma$ tの発現量とその活性が上昇し、Th17細胞へと分化すると報告されている<sup>4)</sup>。

## 3. 腸内細菌によるTh17細胞誘導

Th17細胞において特筆すべきは、消化管の上皮直下の粘膜固有層 (lamina propria)において恒常的に、しかも多数存在することである。逆に全身臓器において、Th17細胞が存在するのは消化管粘膜固有層だけである。系統にもよるがマウスにおいては、Th17細胞は特に小腸粘膜固有層に多く見られ、CD4陽性T細胞のうち約30%近くがTh17細胞である<sup>2,5)</sup>。一方、大腸においてはCD4陽性T細胞の約10%がTh17細胞である<sup>6)</sup>。他の臓器、例えば肺や肝臓などにおいては、IL-17産生細胞はほとんど観察されず、存在していてもそれはCD4陽性T細胞以外の細胞、例えば $\gamma\delta$ T細胞であることが知られている。また消化管関連リンパ組織である腸間膜リンパ節やパイエル板にも、Th17細胞はほとんど存在していないので、おそらくTh17細胞は、消化管関連リンパ組織ではなく、粘膜固有層で分化しているものと考えられる。Th17細胞は生後すぐには

ほとんど存在していないが、成長とともに増加してくる。このことはあたかも腸内細菌叢の形成過程と相関するかのように見える。実際、無菌マウス (germ-free マウス) あるいは抗生物質を投与したマウスにおいて、粘膜固有層のTh17細胞の減少が見られる<sup>6)</sup>。逆に無菌マウスに、specific-pathogen-free (SPF) マウスの糞便を飲ませると、Th17細胞が顕著に増加してくる。こうしたことからTh17細胞は、腸内細菌の存在によって誘導されていると結論づけることができる。

非常に興味深いことに、同じ系統のマウス (例えばC57BL/6マウス)でも、Th17細胞の数は施設によって異なることが知られている。例えば、タコニックファーム社から購入したSPFマウスにおいては、多数のTh17細胞が小腸粘膜固有層に確認できるが、ジャクソンラボラトリー社から購入したSPFマウスにおいては少数しか存在しない<sup>5)</sup>。このことは、どんな種類でもよいかから腸内細菌が存在すればよいというのではなく、ある特定の細菌種が特異的にTh17細胞の分化を促進しているという考えを支持している。タコニックファーム社とジャクソンラボラトリー社それぞれから購入したマウスの腸内細菌の16SリボソームRNAを、PhyloChipを用いて比較検討し、セグメント細菌 (segmented filamentous bacteria)が、ジャクソンマウスに存在しないがタコニックマウスに多く存在することが分かった<sup>7)</sup>。そしてセグメント細菌だけを無菌マウスに投与したノトバイオートマウス (ある特定の菌だけが存在する動物を“ノトバイオート: gnotobiot”と呼ぶ)の小腸において、多数のTh17細胞が確認された。更にジャクソンマウスにセグメント細菌を投与すると、タコニックマウス並にTh17細胞が誘導された。以上のことから、セグメント細菌には極めて強力なTh17細胞誘導能があり、タコニック社のマウスの小腸粘膜固有層にTh17細胞が多いのはセグメント細菌が多く存在するためと考えられた。セグメント細菌は、分節した形態を有する繊維状の腸内細菌であり、その名称は特徴的な形態に由来している。グラム陽性芽胞形成細菌であり、哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類、昆虫など多くの生物の腸に存在する非病原性の常在性細菌である。しかしながら、ヒトでの存在は今のところ明らかになっていない。セグメント細菌はIgA産生形質細胞の分化誘導にも促進的な役割を果たすことが知られている<sup>8)</sup>。逆にIgAが存在しないと、腸内のセグメント細菌が異常増殖することも報告されている<sup>9)</sup>。また、セグメント細菌は上皮間リンパ球の数も増加させることが知られている<sup>8)</sup>。従ってセグメント細菌はTh17細胞だけではなく、IgA産

生形質細胞や上皮間リンパ球も誘導し、宿主の免疫系に大きく影響を与えると考えられる。

セグメント細菌によって誘導された Th17 細胞には、どのような働きがあるのか？ セグメント細菌がいないマウス（無菌マウスにジャクソンマウス由来の糞便を飲ませたマウス）と、セグメント細菌がいるマウス（無菌マウスにジャクソンマウス由来の糞便+セグメント細菌を飲ませたマウス）に、それぞれ病原性細菌 *Citrobacter rodentium* を感染させる実験を行った。その結果、セグメント細菌がいないマウスにおいては、上皮の肥厚・短腸・腸間膜リンパ節への菌の侵入が見られたが、セグメント細菌を加えたマウスにおいては、それら炎症所見や細菌の侵入が有意に抑制されていた<sup>7)</sup>。即ちセグメント細菌による Th17 細胞誘導は、宿主にとって有益であり、病原性細菌に対する抵抗性を宿主に付与していると考えられた。Th17 細胞のどのような働きが病原性細菌に対する抵抗性を生み出すのか十分には明らかになっていないが、Th17 細胞から産生される IL-22 が上皮細胞に働きかけ抗菌ペプチドの産生を亢進することが知られているし、IL-17 は白血球の遊走を促進

することが知られている。これらの働きによって誘導された Th17 細胞は消化管粘膜のバリア機能を高めていると考えられる。しかし一方で、例えば遺伝的に自己免疫の素因があると、このセグメント細菌による Th17 細胞の誘導は自己免疫疾患の発症に繋がる可能性もある（図 1）。今後そうした可能性についても検討が必要である。

#### 4. 腸内細菌による Th17 誘導の分子メカニズム

腸管細菌による Th17 細胞誘導の分子メカニズムは、まだ十分には明らかになっていない。これまでに例えば細菌由来のフラゲリンあるいは非メチル化 DNA が、それぞれ Toll-like receptor (TLR)5 と TLR9 を活性化し Th17 細胞分化を促進するという報告がある<sup>10)</sup>。また一方で、TLR のアダプター分子である MyD88 と Trif の二重欠損マウスにおいて、消化管粘膜固有層には正常に Th17 細胞が認められるという逆の報告もある<sup>6)</sup>。MyD88 遺伝子欠損マウスにおいては、野生型マウスと比較して、腸内細菌叢が大きく変化しているということも知られており<sup>11)</sup>、SPF 環境下で飼育した野生型マウスと MyD88 遺伝子欠損マウスとを単

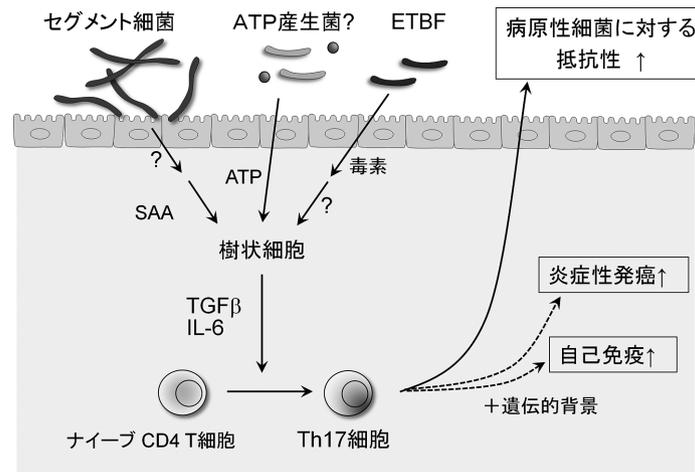


図 1 腸内細菌による Th17 細胞誘導 (モデル)

常在細菌であるセグメント細菌は、宿主消化管（おそらく上皮細胞）からの serum amyloid A (SAA) の産生を誘導する。SAA が樹状細胞に働きかけ Th17 細胞が誘導されることが考えられる。毒素産生型のバクテロイデスフラジリス (*enterotoxigenic Bacteroides fragilis*, ETBF) や、ATP を産生するような腸内細菌によっても樹状細胞活性化を介して腸管に Th17 細胞が誘導されることが考えられる。こうして誘導された Th17 細胞は消化管粘膜バリアを補強し、病原性細菌感染に対する抵抗性を増強する。このことは消化管に恒常的に Th17 細胞が存在することの利点の一つと考えられる。しかし一方で、例えば遺伝的に自己免疫あるいはがんの素因を持つ宿主においては、腸内細菌による Th17 細胞誘導は、自己免疫疾患発症や発がんに繋がるかもしれない。

純に比較することは困難と考えられる。TLR シグナルの Th17 細胞への関与については、さらなる検討が必要である。

一方近年、アデノシン三リン酸 (ATP) による免疫系活性化が注目されている<sup>12)</sup>。ATP は細胞“内”では非常に高い濃度で存在することはよく知られているが、細胞“外” ATP は通常 ATP 分解酵素の存在によってすぐに分解される。ところが、何らかの理由により細胞外 ATP 濃度が高まると、ATP 受容体である P2X 受容体あるいは P2Y 受容体に結合し、活性化シグナルを送ることが知られている<sup>12)</sup>。細胞外 ATP は、神経伝達物質としての役割が古くから知られているが、最近、サイトカイン産生やケモタキシス、さらには貪食作用の促進など様々な免疫反応に関わることが分かってきている。非常に興味深いことに、消化管管腔内には高濃度の ATP を検出することができる<sup>6)</sup>。ATP は無菌マウスの腸内容では検出できず、SPF マウスからは溶菌を行わずに測定しても検出できる。さらに腸内細菌の培養中、対数増殖に伴ってその上清中に増加してくることから、ATP は死菌から流れ出るのではなく、腸内細菌が積極的に放出しているものと考えられる。この腸内細菌の培養上清を、樹状細胞とナイーブ CD4 T 細胞との共培養系に加えると、非常に強い Th17 細胞分化が観察される。そしてこの Th17 細胞分化は、ATP 分解酵素である apyrase を加えることで強く抑制される。さらに、ATP を無菌マウスの腹腔内や経肛門的に投与すると、Th17 細胞の数の著明な増加が観察される。以上の実験結果はいずれも、腸内細菌由来の ATP が、Th17 細胞分化の誘導因子となっている可能性を強く示唆するものである。

先に述べたセグメント細菌のノトバイオートマウスにおいては、その腸管管腔内の ATP 濃度は無菌マウスのそれとほぼ同等であったことから、セグメント細菌による Th17 細胞誘導は ATP に依存しない経路によると考えられる<sup>7)</sup>。セグメント細菌定着によって、炎症性タンパク質である serum amyloid A (SAA) が、回腸末端部で極めて強く誘導される。またリコンビナント SAA を、腸管由来樹状細胞と CD4 T 細胞との共培養系に加えると、樹状細胞からの IL-6 産生と強い Th17 細胞誘導が見られる。このことからセグメント細菌は宿主の腸管 (おそらく上皮細胞) に働きかけて SAA を産生させ、SAA が樹状細胞に働きかけて Th17 細胞分化を促進していると考えられる (図 1)。

## 5. おわりに

本稿では、Th17 細胞誘導について最近の知見を紹介し

た。マウスにおいてはセグメント細菌が極めて強力な Th17 誘導細菌であることが分かってきたわけだが、ヒトにおいてセグメント細菌そのもの、あるいはそれと同等の機能を有する細菌が存在しているのか、今のところ明らかになっていない。今後、ヒト腸管においてセグメント細菌が存在するのか、存在する場合は疾患といかなる関係があるのか検討する必要がある。またセグメント細菌による Th17 細胞誘導の分子メカニズムも、今後更に研究が必要である。セグメント細菌は、腸管上皮細胞に強く接着する特徴を持つ。この接着が重要ではないかと予想されている。セグメント細菌は現在のところ培養不可能な細菌であり、培養法の確立が望まれる。同時に、そのゲノム・遺伝子情報を明らかにすることが、セグメント細菌による Th17 細胞誘導メカニズムの解明へと繋がると考えられる。セグメント細菌以外にも Th17 細胞分化を誘導するような細菌が存在していると考えられる。実際、enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) が、Th17 細胞を誘導し、炎症性発がんを促進するという報告もなされている<sup>13)</sup>。また、ATP を高産生することで Th17 細胞を誘導するような細菌も別に存在していると予想される (図 1)。さらに Th17 細胞がどのような抗原を認識し、どのように機能するのかについても検討が必要である。

- 1) Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V.K. (2009) *Annu. Rev. Immunol.*, 27, 485-517.
- 2) Ivanov, II, McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., & Littman, D.R. (2006) *Cell*, 126, 1121-1133.
- 3) Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W.E. (2010) *Annu. Rev. Immunol.*, 28, 445-489.
- 4) Zhou, L., Ivanov, II, Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., & Littman, D.R. (2007) *Nat. Immunol.*, 8, 967-974.
- 5) Ivanov, II, Frutos Rde, L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D.B., Sartor, R.B., Finlay, B.B., & Littman, D.R. (2008) *Cell Host Microbe*, 4, 337-349.
- 6) Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K., & Takeda, K. (2008) *Nature*, 455, 808-812.
- 7) Ivanov, II, Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., & Littman, D.R. (2009) *Cell*, 139, 485-498.
- 8) Umesaki, Y., Setoyama, H., Matsumoto, S., Imaoka, A., & Itoh, K. (1999) *Infect. Immun.*, 67, 3504-3511.
- 9) Suzuki, K., Meek, B., Doi, Y., Muramatsu, M., Chiba, T., Honjo, T., & Fagarasan, S. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 1981-1986.
- 10) Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M.H., Yang, B.G., Jung, Y.J.,

