The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Alteration of Vβ Usage and Cytokine Production of CD4+ TCRββ Homodimer T Cells by Elimination of Bacteroides vulgatus Prevents Colitis in TCRα - Chain-Deficient Mice1
Author(s)	岸, 大輔
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43264
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【81】

氏　　名	岸（きし）　大輔（だいすけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16588　号
学位授与年月日	平成13年11月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学　位　論　文　名	Alteration of Vβ Usage and Cytokine Production of CD4⁺ TCRββ Homodimer T Cells by Elimination of *Bacteroides vulgatus* Prevents Colitis in TCR α-Chain-Deficient Mice[1] （腸内細菌 *Bacteroides vulgatus* の減少がもたらす TCRα鎖欠損マウスにおける腸炎抑制の機序　－CD4⁺ββT細胞のVβ発現とサイトカイン産生の関与－）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　松田　暉 （副査） 教　授　岡田　正　　教　授　清野　宏

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

炎症性腸疾患の病態には $CD4^+$T 細胞を中心とした粘膜免疫機構の破綻が関与していると考えられている。また、その発症に腸内環境因子も関与していることが明らかになりつつある。腸炎の自然発症モデルマウスである TCRα鎖欠損（$TCR\alpha^{-/-}$）マウスは、発症時には特殊な $CD4^+\beta\beta$T 細胞群の粘膜への浸潤、およびその結果粘膜に誘導される IgA 抗体の過剰産生といった免疫学的特徴を有することから、Th2 型の腸炎モデルと位置づけられ、また、無菌環境下では腸炎発症が抑制されることから、その発症には腸内細菌が関与していると考えられている。本研究では、腸内細菌の病態への影響をさらに検索することを目的に、$TCR\alpha^{-/-}$マウスに elemental diet（ED）を投与し、腸内細菌叢の変化と腸管病変および粘膜免疫学的所見との関連につき解析した。

【方法】

1．ED による腸内細菌叢および粘膜免疫学的特徴の変化

$TCR\alpha^{-/-}$マウスを生後 8 週齢より ED にて飼育し、発症週齢（16-20週齢）における腸管病変および粘膜免疫学的特徴を通常飼料（regular diet：RD）群と比較検討した。方法は組織学的検索として H.E.染色および PAS-alcian blue 染色、抗体産生細胞数の検索は ELISPOT、T 細胞のサイトカイン産生および Vβの発現の解析にはそれぞれ RT-PCR および FACS を用いた。一方、両群間の腸内細菌叢の変化を検索するため盲腸内容物を嫌気培養し定性的検索を行った。

2．*Bacteroides vulgatus*（*B.vulgatus*）刺激による $CD4^+\beta\beta$T 細胞の培養

ED 群の脾および腸管より分離した $CD4^+\beta\beta$T 細胞を、抗原提示細胞の存在下に、RD（発症）群の腸内容より分離培養した *B. vulgatus* にて刺激し、ED 群の腸内にみられた *B. distasonis* を対照として Vβの発現様式を RT-PCR にて、また培養上清中のサイトカインを ELISA にて解析した。

3．未発症マウスへの *B. vulgatus* 投与

B. vulgatus の *in vivo* での影響を検討するため、ED 投与中の未発症 $TCR\alpha^{-/-}$マウスに、*B. vulgatus* と、対照として *B. distasonis* を結腸内投与し、組織学的所見および腸管粘膜に浸潤する $CD4^+\beta\beta$T 細胞のサイトカイン産生を RT-PCR にて解析した。

【成績】

1．EDによる腸炎発症の抑制

ED群では粘膜固有層でのIgA産生が抑制されるとともに組織学的にも腸炎発症はほぼ完全に抑制された。これに対し、CD4⁺ββT細胞はED群においてもRD群とほぼ同頻度に出現していたが、同細胞群によるIL-4を中心とするTh2型サイトカインのmRNA産生は認めず、またVβの発現様式はRD群のVβ8優位に対しED群ではVβ6、Vβ11およびVβ14が優位であり、発現パターンに差がみられた。

一方、腸内細菌叢の検索ではRD（発症）群に高率に（80%以上）みられた*B. vulgatus*がED群では全く検出されなかった。

そこで、*B. vulgatus*と病態との関連を検索するために、同菌種に対するCD4⁺ββT細胞の反応を*in vitro*および*in vivo*の実験系にて検討した。

2．*B. vulgatus*によるVβ8⁺Th2型ββT細胞の誘導

*B. vulgatus*刺激下のCD4⁺ββT細胞の培養ではVβ8⁺ββT細胞の増殖を認めるとともに、上清中のTh2型サイトカイン（IL-4、IL-6）の増加がみられた。

3．*B. vulgatus*結腸内投与によるTh2型腸炎の誘導

*B. vulgatus*投与マウスでは、ED投与により消失していた粘膜CD4⁺ββT細胞によるTh2型サイトカインmRNAの発現を認め、組織学的には対照群に比しより高度の腸炎の所見を認めた。

【総括】

1．ED投与は、粘膜内CD4⁺ββT細胞のVβ発現様式の変化およびTh2型サイトカインの産生抑制を介してTCRα⁻/⁻マウスの腸炎発症を抑制することが示唆された。その背景には腸内細菌叢の変化、特に*Bacteroides*属の関連が示唆された。

2．ED投与により減少した*B. vulgatus*は、*in vitro*でTh2型Vβ8⁺ββT細胞を誘導し、また未発症TCRα⁻/⁻マウスに同菌を結腸内投与するとTh2型ββT細胞の粘膜内浸潤を伴う腸炎発症を誘導した。

3．以上より、*B. vulgatus*はこのマウスにみられるTh2型腸炎をもたらす腸内環境因子の一つと考えられる。EDによりもたらされる腸炎抑制効果の機序の一つとして細菌叢の変化を介した粘膜免疫機構の調節が重要であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

クローン病、潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患（IBD）は近年我が国でも急増している原因不明の難病であるが、最近の知見からその病態には、腸管粘膜におけるCD4⁺T細胞を中心とした粘膜免疫機構の破綻が関与していると考えられている。すなわち、腸管における消化吸収と粘膜免疫という重要な二つの機能のバランスが破綻し、腸管内のある抗原性物質により異常な粘膜免疫応答が惹起され発症すると考えられる。その抗原性物質としては食餌性抗原や常在細菌叢などが考えられるが、特定されるに到っていない。

本研究の目的はIBDのモデルとされるTCRα鎖欠損マウスを用いて、腸内環境の変化の病態への影響を解析し、原因となっている抗原を検索しようというものである。すなわち臨床的にIBDの治療にも多用されている成分栄養（ED）にてこのマウスを飼育し、腸内細菌叢の変化と病態との関連を検索した。

その結果、ED投与群では、病態の中心と考えられるCD4⁺ββT細胞のTh2型サイトカインの産生はみられず、組織学的にも腸炎は抑制された。また腸内細菌叢では通常飼料投与群に高率にみられた常在菌*Bacteroides vulgatus*（BV）がED群では全く検出されなかった。このBVは*in vitro*ではββT細胞のTh2型サイトカイン産生を誘導し、またEDにて発症の抑えられているマウスに注腸投与するとTh2型ββT細胞の浸潤を伴う腸炎を発症した。これらより、BVはこのモデルにおける腸炎発症の原因となる環境因子の一つと考えられ、EDによる環境の変化は細菌叢の変化を介してββT細胞を鎮静化し、発症が抑制されたことが示唆された。本研究は常在菌が、粘膜免疫の異常をもつ宿主にとってはIBDの原因となりうる可能性を示すとともに、EDの腸炎抑制の機序として細菌叢を介した粘膜免疫の調節の重要性を示唆し、博士（医学）の学位に値するものと考えられる。