

「パイエル板 M 細胞を介した常在細菌の取り込みが $\gamma\delta$ T17 細胞に脳炎惹起性を付与する機構の解明」

(慶應義塾大学薬学部生化学講座 専任講師)

高橋 大輔

要旨

多発性硬化症 (MS) の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) において、腸内細菌叢が疾患発症に関与することが示唆されているが、その分子機構は十分に解明されていない。本研究では、小腸パイエル板 (Peyer's patch: PP) の M 細胞による腸内細菌の取り込みが、脳炎惹起性 $\gamma\delta$ T17 細胞の誘導に必須であることを明らかにした。M 細胞欠損マウスでは EAE 症状が顕著に軽減し、脊髄への $\gamma\delta$ T17 細胞浸潤が減少した。一方、M 細胞が増加するマウスでは EAE 症状が著明に悪化した。scRNA/TCR-seq 解析により、PP $\gamma\delta$ T17 細胞の主要集団がケモカイン受容体である CXCR を高発現し、V γ 6⁺V δ 1⁺インバリアント TCR を持つことを同定した。無菌マウスの PP では、この V γ 6⁺V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T17 細胞がほぼ消失し、SPF マウスの糞便移植により回復した。V γ 6⁺V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T17 細胞を誘導する責任菌種として、*Lactobacillus* 属菌および *Faecalibaculum rodentium* を同定し、これらの菌が $\gamma\delta$ TCR シグナルを介して CXCR6^{hi} $\gamma\delta$ T17 細胞を活性化することを Nur77-EGFP レポーターマウスで証明した。さらに、メタボローム解析により indole-3-lactic acid (ILA) を TCR リガンド候補として同定し、EAE 発症時に脊髄へ移行することを示した。本研究は、M 細胞が腸内細菌と中枢神経系自己免疫疾患を結ぶゲートウェイとして機能することを明らかにした。

背景・目的

IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞 ($\gamma\delta$ T17 細胞) は、腸管粘膜のようなバリア組織における自然免疫応答の迅速なエフェクターとして機能する一方、関節リウマチや MS などの IL-17 関連自己免疫疾患の発症にも寄与する。EAE モデルでは、 $\gamma\delta$ T 細胞欠損マウスで疾患が軽減されるにもかかわらず、脊髄浸潤細胞中の $\gamma\delta$ T 細胞は約 3% に過ぎない。この少数の $\gamma\delta$ T17 細胞が疾患初期に IL-17A を大量に産生し、後続の Th17 応答を増幅するとされるが、脳炎惹起性 $\gamma\delta$ T17 細胞の起源や分化メカニズムは不明であった。MS および EAE の発症には、腸内細菌が関与することが報告されている。一例として、無菌マウスは EAE を発症しないが、MS 患者の糞便を移植すると疾患が増悪する。PP は、腸内細菌に対する腸管粘膜免疫の主要な誘導部位であり、PP の腸管腔に面する上皮細胞層の M 細胞は、腸管腔内の腸内細菌抗原を活発に取り込む。M 細胞の分化には Receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) シグナルや転写因子 Spi-B が必須であり、M 細胞欠損では腸内細菌応答性の IgA や T 細胞応答が減弱する。しかし M 細胞依存的な抗

原取り込みが $\gamma\delta T17$ 細胞の発達に与える影響は不明であった。本研究では、M 細胞を介した腸内細菌抗原の取り込みが、PP における $\gamma\delta T17$ 細胞の脳炎惹起性の獲得に必須であるとの仮説を検証し、その責任菌種および TCR リガンド候補の同定を目指した。

方法

M 細胞欠損モデルとして、Spi-B 欠損マウスおよび、腸管上皮細胞特異的 RANK 欠損マウス ($Vil1-Cre^{Tg}$ $Tnfrsf11a^{lox/lox}$; $RANK^{\Delta IE C}$) を用いた。また、M 細胞過形成モデルとして OPG 欠損マウスを使用した。EAE は MOG35-55 ペプチドと CFA による免疫で誘導し、臨床スコアを経時的に評価した。PP $\gamma\delta T17$ 細胞の解析にはフローサイトメトリーを用い、IL-17A、ROR γ t、CXCR6 等の発現を定量した。scRNA-seq および scTCR-seq は PP および脊髄の $\gamma\delta T$ 細胞を対象に実施し、UMAP 解析およびクラスタリングにより細胞集団を決定した。PP $\gamma\delta T$ 細胞の脊髄への遊走は KikGR 光変換マウスを用いて追跡した。腸内細菌の寄与を評価するため、無菌マウス、抗菌薬投与マウス、および特定菌 (*Lactobacillus* 属菌、*F. rodentium*) のノトバイオトマウスを作製した。16S rRNA 遺伝子シーケンシングによる菌叢解析および indicator species analysis により責任菌種を絞り込んだ。TCR シグナルの評価には Nur77-EGFP レポーターマウスを使用した。PP、回腸内容物および脊髄のメタボローム解析は LC-MS/MS および IC-HR-MS により行った。

結果

1. M 細胞は EAE 発症に必須であり、PP の $\gamma\delta T17$ 細胞が脊髄へ遊走する

Spi-B 欠損マウスおよび $RANK^{\Delta IE C}$ マウスに EAE を誘導したところ、いずれの M 細胞欠損モデルでも対照群と比較して臨床スコアが有意に低下した (図 1)。一方、OPG 欠損による M 細胞過形成マウスでは EAE が増悪した。脊髄浸潤リンパ球を解析すると、Spi-B 欠損マウスでは $\gamma\delta T17$ 細胞の頻度が有意に減少していたが、Th17 細胞の割合は変化しなかった (図 1)。PP には定常状態で多数

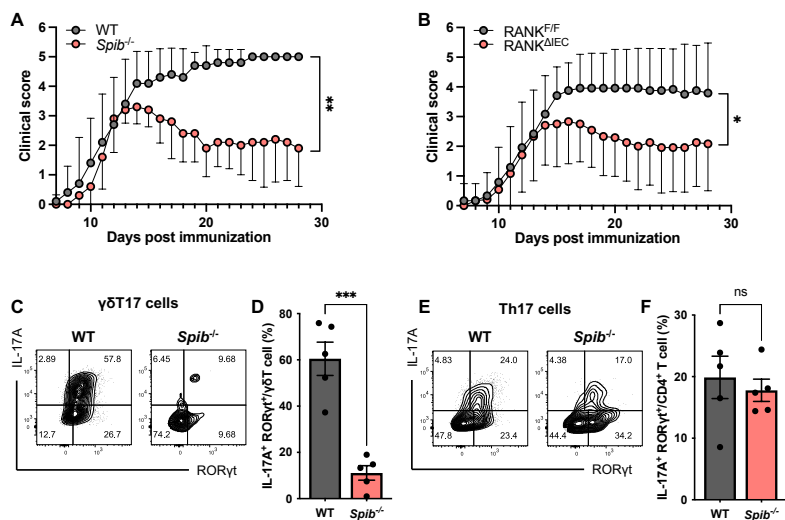


図1 M細胞欠損マウスではEAEの症状が軽減する

(A, B) Spi-B欠損、腸上皮得意的RANK欠損マウスにおけるEAEのスコア
(C, D) Spi-B欠損マウスにおける脊髄への $\gamma\delta T17$ /Th17細胞の割合

の $\gamma\delta T17$ 細胞が存在するが、EAE 発症時にはこれらの細胞が PP から消失した。 $\gamma\delta T$ 細胞欠損マウスへの PP リンパ球移入実験では、野生型 PP リンパ球を移入した場合にのみ EAE が誘導された。 KikGR 光

変換マウスを用いた追跡実験により、EAE 発症時に PP 由来の $\gamma\delta T$ 細胞が脊髄に遊走することを直接証明した。

2. M 細胞依存的な常在細菌の取り込みが PP $\gamma\delta T17$ 細胞を誘導する

定常状態において M 細胞欠損マウスでは PP $\gamma\delta T17$ 細胞が約 2 分の 1 に減少していた。PP $\gamma\delta T17$ 細胞の主要サブセットである $V\gamma 4^+$ 集団と $V\gamma 1^-V\gamma 4^-$ 集団のうち、後者が M 細胞欠損により選択的かつ顕著に減少した。この減少は PP のみならず回腸粘膜固有層でも同様に認められた。RANK Δ^{IEC} マウスでも同等の表現型を示し、M 細胞依存的な抗原取り込みが $V\gamma 1^-V\gamma 4^- \gamma\delta T17$ 細胞の維持に必須であることが確認された。さらに、無菌マウスでは PP $\gamma\delta T17$ 細胞がほぼ完全に消失しており、抗菌薬カクテル投与 SPF マウスでも同様の減少が認められた。無菌マウスへの SPF 糞便移植により、特に $V\gamma 1^-V\gamma 4^-$ 集団が速やかに回復したことから、腸内細菌の定着がこの細胞集団の誘導・拡大に不可欠であることが示された。

3. CXCR6 高発現 $V\gamma 6^+V\delta 1^+ \gamma\delta T17$ 細胞が PP の主要集団であり脊髄に集積する

PP の $\gamma\delta T$ 細胞を scRNA-seq/scTCR-seq で解析した結果、 $\gamma\delta T17$ クラスタは主に $V\gamma 6^+$ サブクラスターと $V\gamma 4^+$ サブクラスターに二分された。PP $\gamma\delta T17$ 細胞の 44% が $V\gamma 6^+V\delta 1^+$ TCR を発現し、その CDR3 配列はインバリエントであった。一方、 $V\gamma 4^+$ TCR の CDR3 配列は多様性を示した。 $V\gamma 6^+$ クラスタでは T 細胞活性化に関連した遺伝子 (*Cd44*, *Il2ra*, *Il23r*, *Nfatc3* 等) が高発現し、特にケモカイン受容体 *Cxcr6* が RNA・タンパク質レベルで高発現していた。EAE 脊髄の $\gamma\delta T$ 細胞を scRNA-seq で解析すると、ナイーブマウス PP の $V\gamma 6^+ \gamma\delta T17$ 細胞と脊髄の $V\gamma 6^+ \gamma\delta T17$ 細胞が UMAP 上でほぼ完全に重なり、PP 由来の同一集団が脊髄に移行していることが示唆された。また、CXCR6 欠損マウスでは EAE 症状が軽減し、CellChat 解析から、EAE 時の CXCL16 の主要産生細胞が浸潤マクロファージおよび樹状細胞であることが明らかになった。

4. *Lactobacillus* 属細菌および *F. rodentium* が脳炎惹起性 CXCR6^{hi} $\gamma\delta T17$ 細胞を誘導する

責任菌種の同定のため、異なる抗菌スペクトルの抗菌薬を投与したところ、アンピシリンのみが PP CXCR6^{hi}γδT17 細胞を有意に減少させた。16S rRNA 遺伝子解析により、アンピシリン投与群で特異的に Bacilli 綱 (特に *Lactobacillus johnsoni*、*Limosilactobacillus reuteri*) が消失していた。さらに、異なる生育所由来のマウスの比較および

indicator species analysis により、*Faecalibaculum* 属 (*F. rodentium*) が CXCR6^{hi}γδT17 細胞数と最も強い正の相関を示した。ノトバイオオートマウスを用いた検証から、*Lactobacillus* 属菌または *F. rodentium* の定着が PP CXCR6^{hi}γδT17 細胞を誘導することを見出した (図 2)。このノトバイオオートマウスに EAE を誘導すると、EAE 発症率が有意に上昇したが、臨床スコアの増悪は軽度であった (図 2)。CXCR6^{hi}γδT17 細胞が EAE 発症の早期段階に機能することを示唆する。

5. 腸内細菌由来代謝物 ILA が TCR

リガンド候補であり、EAE 時に脊髄へ移行する

γδT17 細胞の活性化機構について、IL-1β/IL-23 の中和抗体や MyD88/TRIF 二重欠損マウスを用いた解析から、サイトカイン刺激や TLR シグナルの関与は否定された。scRNA-seq 解析から、M 細胞欠損マウスの Vγ6⁺γδT17 細胞で TCR シグナル関連遺伝子群の発現が低下しており、TCR を介した抗原認識の関与が示唆された。Nur77-EGFP レポーターマウスを用いた解析では、アンピシリン投与により CXCR6^{hi}γδT 細胞の Nur77-EGFP⁺細胞が有意に減少し、*L. reuteri* の経口投与で回復した。CD1d 欠損マウスでは CXCR6^{hi}γδT17 細胞数に変化がなく、CD1d 依存的な脂質抗原提示は不要であった。インドール化合物が γδTCR リガンドとして機能するとの先行報告に基づき、ストレプトアビジン結合 Cy3 による PP CXCR6^{hi}γδT 細胞の Nur77-EGFP 活性化を確認した。LC-MS/MS および IC-HR-MS メタボローム解析により、SPF マウス、LF ノトバイオオートマウスおよび RANK コントロールマウスの PP で共通して濃縮され、RANK^{ΔIEC} マウスなどでは増加しない代謝物として indole-3-lactic acid (ILA) を同定した。ILA

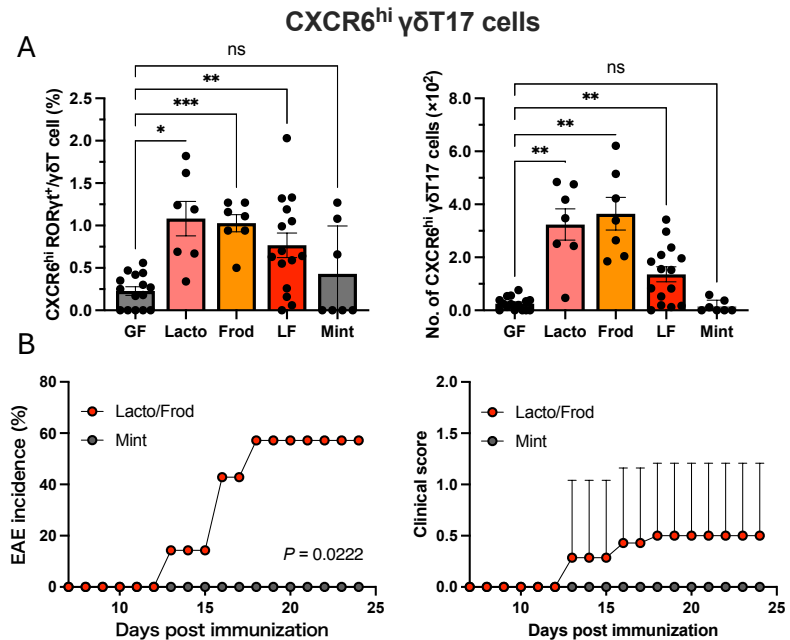


図2 *Lactobacillus*属細菌および*F. rodentium*ノトバイオオートマウスにおけるCXCR6^{hi}γδT17細胞の増加とEAEの増悪 (A) 無菌 (GF)、*Lactobacillus*属細菌 (Lacto)、*F. rodentium* (Frod)、両菌 (LF)、および*M. intestinale* (Mint) を定着させたノトバイオオートマウスのCXCR6^{hi}γδT17 (B) Lacto/FrodまたはMintを定着させたノトバイオオートマウスにおけるEAEの発症率とスコア

は LF ノトバイオートマウスの PP および回腸内容物で SPF マウスと同等のレベルで検出された。重要なことに、ILA は EAE 発症時に脊髄にも移行していたが、定常状態では検出されなかった。宿主には ILA 合成酵素 (indole-3-lactic acid dehydrogenase) が存在しないため、検出された ILA は腸内細菌由来と考えられ、血液脳関門を越えて全身循環した可能性が示唆される。

考察

本研究により、PP M 細胞が腸管内腔の細菌を取り込み、脳炎惹起性 CXCR6^{hi}V γ 6⁺V δ 1⁺ γ δ T17 細胞を誘導するゲートウェイとして機能することが明らかになった。2 種類の M 細胞欠損モデルで EAE が軽減し、M 細胞過形成モデルで増悪したことは、PP M 細胞の数が γ δ T17 細胞を介した自己免疫応答の強度を規定する重要な因子であることを示している。PP は管腔抗原に対する免疫応答の場として二面性を持ち、経口免疫寛容の誘導と自己免疫応答の惹起のいずれにも関与するが、本研究の結果は後者の経路において M 細胞が中心的な役割を果たすことを裏付けるものである。脳炎惹起性 γ δ T17 細胞の特徴として、CXCR6 の高発現が挙げられる。定常状態では M 細胞を含むパイエル板の上皮細胞が CXCL16 を恒常的に発現しており、CXCR6^{hi}V γ 6⁺V δ 1⁺ γ δ T17 細胞が M 細胞による抗原送達部位へ選択的に動員される「活性化ホットスポット」を形成すると考えられる。ILA などのインドール代謝物は複数の γ δ TCR に対して多反応性リガンドとなりうるが、V γ 6⁺V δ 1⁺サブセットのみが CXCL16-CXCR6 軸により M 細胞の抗原送達部位近傍に集積するため、選択的に活性化・増殖すると考えられる。一方、EAE 時には浸潤マクロファージ・樹状細胞が CNS で CXCL16 を産生し、同じ CXCL16-CXCR6 軸を介して γ δ T17 細胞が脊髄へ遊走・集積する。CXCR6 欠損マウスで EAE 症状が軽減されたことはこのモデルを支持する。ノトバイオートマウスの解析から、*Lactobacillus* 属菌および *F. rodentium* は γ δ T17 細胞による EAE 発症率を上昇させたが、臨床スコアの増悪は軽度であった。これは SFB や *Allobaculum* による MOG 特異的 Th17 細胞の誘導が完全な EAE 発症に必要なことと整合する。すなわち、EAE 病態は γ δ T17 細胞による初期の炎症惹起と、病原性 Th17 細胞が主導する後期の慢性炎症という二段階モデルで説明できる。メタボローム解析で同定した ILA は、PP での γ δ T17 細胞の初期活性化のみならず、EAE 発症時に脊髄へ移行することから、CNS における再刺激にも関与する可能性がある。宿主は ILA 合成酵素を持たないため、CNS で検出された ILA は腸内細菌に由来し、血液脳関門を越えて全身循環したと考えられる。さらに、 γ δ TCR の多反応性を考慮すると、ILA と構造的に類似する宿主由来分子 (セロトニン等) による再刺激の可能性もあり、腸管で開始された免疫応答が CNS 自己免疫の持続・増幅に直結するという病態モデルを提唱する。本モデルはヒト MS にも適用しうる。MS 患者では *Lactobacillus* が過剰に存在し、脳脊髄液中のインドール関連代謝物が増加していることが報告されており、インドール代謝物がヒトの脳炎惹起性 γ δ T 細胞 (V γ 9⁺T 細胞を含む) を刺激しうることも示されている。本研究は M 細胞を

起点とした腸管-脳軸の新たな免疫学的経路を提唱し、腸内細菌の代謝制御に基づく治療戦略の基盤を提供する成果である。

共同研究者

慶應義塾大学薬学部生化学講座 長谷 耕二 教授

引用論文

- [1] Sutton CE, et al. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from $\gamma\delta$ T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*. 2009;31:331-341.
- [2] Blink SE, et al. $\gamma\delta$ T cell subsets play opposing roles in regulating experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol*. 2014;290:39-51.
- [3] Berer K, et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114:10719-10724.
- [4] Lee YK, et al. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:4615-4622.
- [5] Miyauchi E, et al. Gut microorganisms act together to exacerbate inflammation in spinal cords. *Nature*. 2020;585:102-106.
- [6] Hase K, et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH+ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*. 2009;462:226-230.
- [7] Kanaya T, et al. The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat Immunol*. 2012;13:729-736.
- [8] Marchitto MC, et al. Clonal V γ 6+V δ 4+ T cells promote IL-17-mediated immunity against *Staphylococcus aureus* skin infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116:10917-10926.
- [9] Guo J, et al. $\gamma\delta$ T cell antigen receptor polyspecificity enables T cell responses to a broad range of immune challenges. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2024;121:e2315592121.
- [10] Miyauchi E, et al. The impact of the gut microbiome on extra-intestinal autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2023;23:9-23.

助成研究に関連した発表論文

1. Hattori-Muroi K[†], Maruta H[†], Takahashi D^{†*} ([†]equal contribution, ^{*}corresponding author), Kinashi Y, Hattori K, Kabumoto Y, Fujimura Y, Tsukamoto S, Suzuki K, Oguchi H, Ogihara Y, Kodaira Y, Hayashi E, Takano K, Komiyama S, Morita N, Naganawa-Asaoka H, Oya Y, Saito Y, Ohhashi W, Kimura S,

Shinkura R, Matsuda T, Hase K. Dietary soy shapes murine microbiota to consolidate the mucosal IgA response through T follicular helper cells. *Immunity*. in press

2. Komiyama S, Kodaira Y, Maeda R, Sugiura Y, Suzuki K, Saeki A, Kinashi Y, Oguchi H, Takano K, Onawa S, Matsui A, Sasaki E, Hattori-Muroi K, Kimura S, Fujimura Y, Ka Y, Ogura T, Hanaoka K, Ito M, Watarai H, Kaisho T, Udagawa N, Takahashi D* (*corresponding author), Hase K*. M-cell-dependent commensal uptake confers encephalitogenic phenotypes on $\gamma\delta$ T17 cells in Peyer's patches. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2026 Jan 9;123(2): e2506550123. doi: 10.1073/pnas.2506550123. Epub 2026 Jan 9. PMID: 41512014; PMCID: PMC12799176.