
トピックス

腸内細菌叢に由来する酪酸が宿主の骨形成を促進する The microbial metabolite butyrate stimulates bone formation

ヒトを含む動物には、表皮や粘膜層などの外部環境との境界上に非常に多くの種類・数の常在細菌叢が存在する。とくにヒトの大腸には、総数でおよそ 40 兆個もの細菌群が生息するともいわれ¹⁾、これは個体を形成する体細胞を超える細胞数となる²⁾。これまでの常在細菌叢に関わる研究は、培養を行った細菌の生化学的・遺伝学的性状を丹念に調べていくという方法が主流であったが、いわゆる次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析が活用されることで、培養を経ることなく細菌叢の解析が可能となり、難培養・少数細菌のゲノム解析も可能となった。さらに、メタボローム解析、無菌マウス、無菌マウスに特定の細菌叢のみを定着させたノトバイオームマウスなどを組み合わせることで、微生物叢・常在細菌叢の研究が急展開している。

近年の研究で、腸内細菌叢に由来する代謝物、とくに難消化性多糖の代謝により生成される短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFAs) は宿主の生理現象へ大きな影響を与えることが明らかにされつつある³⁾。腸内細菌叢が産生する SCFAs には、酢酸、プロピオン酸および酪酸がある。このうち、酪酸は腸管上皮細胞の主要なエネルギー源として消費される。さらにその一部は腸管組織や血流を介して全身に達することで、宿主の免疫応答に作用する可能性が示唆されている。実際、ヒトの腸内細菌叢のひとつである *Clostridium* 属細菌に由来する酪酸が、腸管において制御性 T 細胞 (Treg 細胞) の分化を誘導することが明らかになった⁴⁾。Treg 細胞は自己反応性 T 細胞の免疫応答を負に制御することを主要な役割とし、自己に対する過剰な免疫応答による障害を回避する上で重要な存在である。一方、大腸炎マウスモデルを用いた解析では、この酪酸によって誘導される Treg 細胞が病態発症を抑制することが明らかにされている⁴⁾。さらに、臨床研究において炎症性腸疾患患者での酪酸産生菌の低下が報告されており⁵⁾、ヒトにおいても腸内細菌叢に由来する酪酸が病態発症の抑制に作用している可能性が示唆されている。

酪酸が Treg 細胞を分化誘導する分子メカニズムの詳細が明らかになりつつある。ナイーブ T 細胞が Treg 細胞へ分化する過程では、その分化を運命付けるマスターレギュレーター *Foxp3* 遺伝子の発現が重要である。酪酸は、ナイーブ T 細胞のヒストン脱アセチル化酵素の阻害活性を有していることが明らかになっている。腸管に存在するナイーブ T 細胞の一部では、酪酸の作用により *Foxp3* 遺伝子座におけるヒストンのアセチル化が亢進され、細胞のエピジェネティックな状態を変化させることで Treg 細胞分化が促進されることが知られている。これに加えて酪酸は T 細胞に直接作用するだけではなく、マクロファージなどの細胞表面上に存在する G タンパク質受容体などに作用し、炎症性サイトカイン産生の抑制や Treg 細胞分化に重要な IL-10 や レチノイン酸の産生を誘導し、Treg 分化に必要な環境を形成することが知られている。また、酪酸が上皮細胞を刺激し、Treg 細胞誘導因子である TGF- β や IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) の発現を促進することも報告されている⁴⁾⁶⁾。以上のように、腸内細菌叢に由来する酪酸は、種々のメカニズムで宿主 Treg 細胞を分化誘導し、免疫系を負に制御することが明らかになりつつある。

一方、プロバイオティクスが骨粗鬆症の改善に寄与する可能性が示されている⁷⁾。しかし、その詳細な作用メカニズムはこれまで不明であった。しかし最近、プロバイオティクスとして実際に用いられている *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) 株がマウス腸管内で酪酸産生を誘導し、Treg 細胞の分化を介して骨形成に作用するメカニズムが報告された⁸⁾ので、このことをトピックスとして紹介したい。

まず、10 週齢雌マウスに LGG 株を 4 週間経口投与した後に酪酸産生を観察した。その結果、対照群に比べて、LGG 投与群において小腸および血清中の酪酸濃度の上昇が認められたが、酪酸と同様に SCFAs に分類されるプロピオン酸の増加は認められなかった。さらに、LGG 株や酪酸を投与したマウスにおいて骨髄や脾

臓の Treg 細胞数が有意に増加していたことから、LGG 株投与に起因して産生された酪酸が Treg 細胞の分化を誘導した可能性が示された。

次に、LGG 株の投与によって増加する酪酸が骨形成に対し影響を及ぼしているか否かについて検討を行ったところ、LGG 株や酪酸投与群では対照群に比べて骨密度が増加していた。そこで、この骨密度の上昇が、酪酸によって誘導された Treg 細胞によるものか否かについて検討を行った。Treg 細胞は、細胞表面に CD25 分子を発現している。ここでは、マウス生体へ抗 CD25 抗体を投与することで、Treg 細胞を特異的に除去して実験を行った。その結果、Treg 細胞を除去したマウスでは、LGG 株や酪酸投与による骨密度の増加が認められなかった。さらに詳細な検討を行ったところ、LGG 株や酪酸投与群において骨梁数、骨梁間隔、骨梁幅などに関する構造的な骨形成が認められ、これらは Treg 細胞除去マウスでは認められなかった。以上の結果より、LGG 株の投与によって生体内で合成された酪酸は Treg 細胞の分化誘導を介して骨形成を促進していることが示された。

それでは、酪酸によって誘導された Treg 細胞は骨形成の促進にどのように作用しているのだろうか。生体における骨のホメオスタシスは、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の繰り返しによる骨リモデリングによって成立している。まず、Treg 細胞による破骨細胞制御の可能性について検討するため、破骨細

胞の分化促進および抑制に作用する RANKL および OPG (RANKL のデコイ受容体として RANKL の作用を減少させる) の発現について検討を行った。その結果、骨髄と Treg 細胞の RANKL mRNA および骨髄の OPG mRNA はいずれも LGG 株および酪酸の投与では変動が認められなかったことから、酪酸依存的に誘導される Treg 細胞の破骨細胞に対する影響はないことがわかった。次に、Treg 細胞の骨芽細胞への影響について検討を行った。骨芽細胞は骨髄間質細胞に由来するため、LGG 株または酪酸投与による骨髄間質細胞の増殖を評価したところ、投与群において細胞増殖が認められ、これは抗 CD25 抗体による Treg 細胞除去マウスでは認められなかった。骨髄間質細胞からの骨芽細胞の分化には、Wnt シグナル経路の活性化が重要であることが知られている⁹⁾。LGG 株または酪酸投与マウスの骨髄間質細胞では、Treg 細胞依存的に Wnt 反応性遺伝子群の mRNA が上昇していることが認められた。以上より、LGG 株や酪酸の投与によって骨髄間質細胞の Wnt シグナル経路が Treg 細胞依存的に活性化していることが示された。一方、著者らは骨粗鬆症の治療に用いられる副甲状腺ホルモンが骨髄 CD8⁺T 細胞からの Wnt10b 産生を促進し、これが骨芽細胞の分化に関与していることを報告している¹⁰⁾。そこで、LGG 株投与による酪酸依存的な骨芽細胞の分化誘導に CD8⁺T 細胞に由来する Wnt10b が関与しているか否かを検討したところ、LGG 株や酪酸の投与によって Wnt10b mRNA

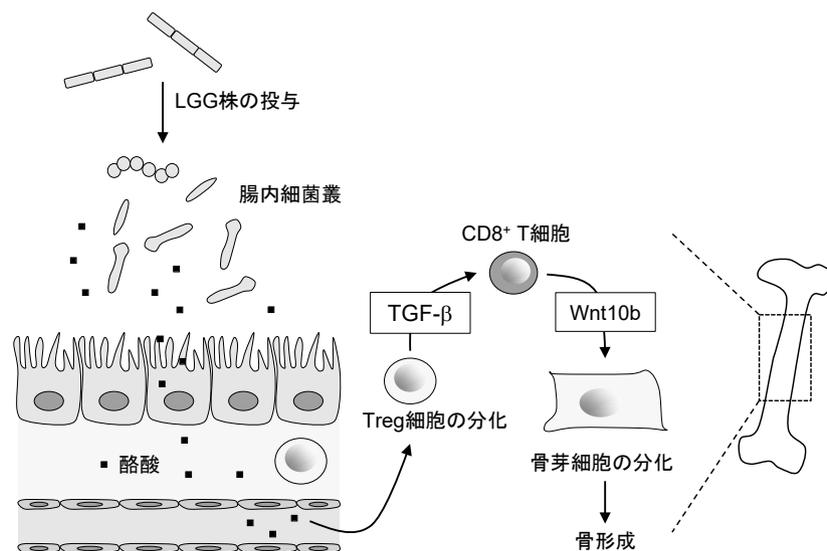


図1 LGG 株投与による酪酸産生と骨芽細胞分化誘導による骨形成

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) 株の投与で腸内細菌叢の変化が起こり、酪酸産生菌が増加する。この菌に由来する酪酸が宿主の Treg 細胞を誘導し、CD8⁺T 細胞からの Wnt10b 産生を促進する。この Wnt10b は骨髄間質細胞に作用して骨芽細胞へと分化させることで、宿主の骨形成を促進する(詳細は本文参照)。

が上昇したが、この上昇は抗 CD25 抗体による Treg 細胞除去マウスでは認められなかった。さらに、CD8⁺T 細胞特異的に Wnt10b を欠損するマウス (Wnt10b^{CD4ACD8}) を構築して検討を行なったところ、通常マウスでは LGG 株や酪酸の投与によって骨髄および CD8⁺T 細胞の Wnt10b 発現が上昇するとともに骨形成が認められたが、Wnt10b^{CD4ACD8} ではこれらの現象が認められなかった。以上より、LGG 株や酪酸の投与によって CD8⁺T 細胞特異的に Wnt10b 発現が誘導され、骨芽細胞の分化誘導を介して骨形成につながる事が明らかになった。それでは、酪酸依存的に誘導された Treg 細胞は、CD8⁺T 細胞の Wnt10b 発現にどのように関与しているのだろうか。Treg 細胞と CD8⁺T 細胞を共培養したところ、CD8⁺T 細胞の Wnt10b 発現誘導が認められた。さらに、リコンビナントサイトカインや T 細胞受容体 (TCR) の活性化を再現することのできる ionomycin を用いた実験から、Treg 細胞が産生する TGF-β や CD8⁺T 細胞の TCR 刺激が Wnt10b 発現に必要であることがわかった。現在のところ、抗原による TCR 刺激の必要性やその詳細な作用機序は不明であるが、Treg 細胞が産生する TGF-β が CD8⁺T 細胞の Wnt10b 発現を誘導する可能性が示唆された。

LGG 株は酪酸合成に関わる遺伝子を持たず、LGG 株自体は酪酸を合成しないことが知られている。そのため、LGG 株投与マウスで増加した酪酸は、LGG 株投与による腸内細菌叢の変化に起因することが予想された。そこで、マウスの腸内細菌叢が LGG 株投与による酪酸依存的な骨形成の促進に必要であるか否かについて検討を行うため、無菌マウスを用いて実験を行った。無菌マウスに対し酪酸を投与した場合、これまでと同様に骨密度の上昇、骨髄および脾臓における Treg 細胞の増加や骨形成の指標である血中オステオカルシン濃度の上昇が認められた。一方、無菌マウスに LGG 株を投与した場合は、これらの現象が認められなかった。さらに、酪酸を投与した無菌マウスの骨髄や骨髄 CD8⁺T 細胞では Wnt10b の発現増加が認められたが、LGG 株投与では認められなかった。実際に通常マウスを用いた腸内細菌叢の変化を調べたところ、対照群と比較して LGG 投与群では短鎖脂肪酸の産生細菌である *Clostridium* 属細菌の増加が認められた。以上より、LGG 株が腸内細菌叢の組成に影響を及ぼし、酪酸産生菌が増加することで酪酸濃度が上昇し、この上昇が Treg 細胞を誘導することで骨形成が促進される可能性が明らかになった。

以上のように、腸内細菌叢に由来する酪酸が宿主の免疫抑制に作用する Treg 細胞を誘導し、この誘導が骨

形成促進に作用するという新たな役割が明らかになった。一方、炎症を惹起する作用をもつ Th17 細胞が同様に腸内細菌叢やその代謝物に依存して誘導されるという研究報告が多くなされている。さらに、この Th17 細胞は破骨細胞の誘導を介して骨破壊に作用することが報告されている¹¹⁾⁻¹³⁾。実際のヒト腸管において腸内細菌叢が宿主免疫系や骨形成に作用する機序は、非常に多くの複合的な要因が関与していることが想定される。これらを詳細に解明するには、さらなる研究が求められるものと考えられる。

(2019.6.24 受付)

Key Words: Microbiota, Butyrate, Bone formation, Treg cells

2nd Department of Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University
Ryosuke Uchiyama, Kazuto Nosaka
武庫川女子大学薬学部生化学Ⅱ講座
内山 良介, 野坂 和人

文 献

- 1) Sender R, Fuchs S, Milo R (2016) Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol* **14**, e1002533
- 2) Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, Vitale L, Pelleri MC, Tassani S, Piva F, Perez-Amodio S, Strippoli P, Canaider S (2013) An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol* **40**, 463-471
- 3) Lee WJ, Hase K (2014) Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat Chem Biol* **10**, 416-424
- 4) Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**, 446-450
- 5) Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR (2011) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13780-13785
- 6) Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K. (2010) Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* **331**, 337-341

- 7) Jafarnejad S, Djafarian K, Fazeli MR, Yekaninejad MS, Rostamian A, Keshavarz SA (2017) Effects of a multispecies probiotic supplement on bone health in osteopenic postmenopausal women: A randomized, double-blind, controlled trial. *J Am Coll Nutr* **36**, 497-506
- 8) Tyagi AM, Yu M, Darby TM, Vaccaro C, Li JY, Owens JA, Hsu E, Adams J, Weitzmann MN, Jones RM, Pacifici R (2018) The microbial metabolite butyrate stimulates bone formation via T regulatory cell-mediated regulation of WNT10B expression. *Immunity* **49**, 1116-1131
- 9) Long F (2011) Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 27-38
- 10) Terauchi M, Li JY, Bedi B, Baek KH, Tawfeek H, Galley S, Gilbert L, Nanes MS, Zayzafoon M, Guldborg R, Lamar DL, Singer MA, Lane TF, Kronenberg HM, Weitzmann MN, Pacifici R (2009) T lymphocytes amplify the anabolic activity of parathyroid hormone through Wnt10b signaling. *Cell Metab* **10**, 229-240
- 11) Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485-498
- 12) Komatsu N, Takayanagi H (2012) Autoimmune arthritis: the interface between the immune system and joints. *Adv Immunol* **115**, 45-71
- 13) Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H (2006) Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* **203**, 2673-2682