

主 論 文 要 旨

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	磯部 順哉
<p>主 論 文 題 名 :</p> <p>腸内細菌由来代謝物による大腸 IgA 誘導機構の解明</p>			
<p>(内容の要旨)</p> <p>ヒトの腸管腔には、共生関係にある 40 兆個以上の膨大な数の腸内細菌が棲息しており、生命恒常性の維持に寄与している。腸内細菌には、食物繊維やレジスタントスターチなどの難消化性多糖を発酵分解することで酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸を始めとした代謝物を産生するものがある。産生される短鎖脂肪酸は、腸上皮細胞の栄養源として利用される他、免疫システムの構築にも関与している。腸管粘膜は病原微生物の主要な感染経路であり、腸管免疫システムの構築は病原体の排除に重要である。さらに、腸管免疫系によって産生される免疫グロブリン A (immunoglobulin A: IgA) は腸管の恒常性にも重要な役割を果たしている。</p> <p>IgA が産生されるためには IgM⁺B 細胞が IgA⁺B 細胞にクラススイッチ組み換え (class switching recombination: CSR) を起こす必要がある。腸管の IgA CSR は T 細胞依存的または T 細胞非依存的機構によって誘導される。T 細胞依存的 IgA CSR はパイエル板などの腸管関連リンパ組織において、濾胞性ヘルパー T 細胞が、高親和性抗体を産生する B 細胞を選択することによって T 細胞依存的 IgA CSR を誘導している。一方、T 細胞非依存的 IgA CSR は、腸管粘膜固有層や孤立リンパ小節において、樹状細胞やストローマ細胞の産生する transforming growth factor β1 (TGF-β1) といったサイトカインやレチノイン酸の刺激によって誘導される。</p> <p>これまでの報告から、無菌マウスでは IgA の産生が顕著に減少し、腸内細菌の定着によって IgA 産生細胞が増加する事から、腸内細菌由来の因子が IgA 産生細胞の分化や増殖を誘導することは明らかである。しかしながら、その詳細な責任因子や IgA 誘導様式 (T 細胞依存的または非依存的か) など不明な点が多く残されている。そこで、本研究では IgA 産生細胞の誘導に関わる腸内細菌由来の責任因子を同定し、その IgA 誘導様式と分子メカニズムを解明することを目的として研究を行った。</p> <p>まず始めに腸内微生物発酵によって産生される代謝物が大腸における IgA 誘導に重要であるとの仮説を立てて、その検証を行った。まず、無菌 (germ-free: GF) マウス、及び GF マウスに腸内細菌を定着させた exGF マウスを作製した。exGF はさらに 2 群に分け、一方には低繊維 (low-fiber: LFi) 含有飼料を (LFi-exGF 群)、もう一方には高繊維 (high-fiber: HFi) 含有飼料を与えて (HFi-exGF 群)、4 週間飼育を行った。これらのマウスの盲腸内容物を解析した結果、HFi-exGF 群では短鎖脂肪酸が顕著に増加していたが、LFi-exGF 群では発酵基質となる食物繊維が無いために</p>			

短鎖脂肪酸産生は低く抑えられていた。次に大腸組織における免疫細胞を解析した結果、HFi-exGF 群では、GF 群に比べて有意に大腸の IgA 産生細胞の割合が増加した。一方、LFi-exGF 群では大腸の IgA 産生細胞の割合の増加が認められなかった。以上の結果から、腸内発酵で産生される短鎖脂肪酸が、大腸の IgA 産生細胞を増加させることが示唆された。

続いて、IgA 誘導作用を有する短鎖脂肪酸を特定するために、SPF 条件下で飼育したマウスに酢酸、プロピオン酸または酪酸を化学修飾した高アミローススターチ (それぞれ HAMSA, HAMSP, HAMS B) を与えて、それぞれ特定の短鎖脂肪酸を大腸に送達した。対照群には短鎖脂肪酸が付加されていない高アミローススターチ (HAMS) を与えて 4 週間飼育した。その結果、HAMS B 摂食群においてのみ、大腸組織の IgA 産生細胞が有意に増加することが判明した。また、免疫蛍光染色法によっても、HAMS B 摂食マウスの大腸組織中においても IgA 産生細胞が増加していた。以上の結果から、腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸の中でも、酪酸が大腸における IgA 産生細胞の増加に寄与することが示唆された。

次に酪酸による大腸の IgA 産生細胞増加の細胞学的なメカニズムについて検討した。大腸の IgA 産生細胞の分化誘導には T 細胞を必要とする T 細胞依存的機構と T 細胞を必要としない T 細胞非依存的機構がある。酪酸による大腸の IgA 誘導機構への T 細胞の関与を検証する為に、T 細胞欠損マウスに HAMS または HAMS B を摂食させ、大腸の IgA 産生細胞の割合を比較した。その結果、T 細胞欠損マウスでも HAMS B 摂食による大腸の IgA 産生細胞の割合が増加した。このことから、酪酸は少なくとも T 細胞非依存的経路を介して大腸の IgA 産生細胞数を増加させることが示唆された。

酪酸が B 細胞に直接的に作用し IgA クラススイッチを促進するか検証するために脾臓 B 細胞を用いて、IgA 産生細胞分化誘導条件下で培養することで IgA 産生細胞への分化を誘導し、その際に酪酸処理の有無による分化への影響を解析した。その結果、酪酸処理群と未処理群で IgA 産生細胞に変化は認められなかった。そこで次に、T 細胞依存的機構において B 細胞の IgA クラススイッチを誘導することが知られている樹状細胞に着目した。骨髓細胞を培養し、樹状細胞への分化誘導時に酪酸処理群と未処理群を準備し、それぞれ B 細胞と共培養して IgA 産生細胞への分化を誘導した。その結果、酪酸処理した樹状細胞は酪酸未処理の樹状細胞と比較して IgA 産生細胞を増加させることを見出した。このことから、酪酸は樹状細胞に作用して IgA 産生細胞を増加していることが示唆された。

樹状細胞は B 細胞から IgA 産生細胞への分化を促進する ATRA と活性化 TGF- β を産生している。そこで、B 細胞と酪酸刺激した BMDC の共培養時にレチノイン酸受容体拮抗薬である LE135 及び抗 TGF- β 中和抗体を用いて ATRA 及び TGF- β 1 シグナル伝達を阻害した。その結果、ATRA 又は TGF- β 1 シグナル伝達のいずれかをブロックすることで、酪酸で刺激した BMDC

による IgA 産生細胞の増加が抑制された。さらに、ATRA と TGF- β 1 シグナルの両方を阻害することにより、酪酸で刺激した BMDC による IgA 産生細胞の増加が完全に消失し、酪酸で刺激していない BMDC と同じ IgA 産生細胞の割合を示した。以上の結果から、酪酸は樹状細胞での ATRA と TGF- β の産生を増加させることで IgA 産生細胞を増加させると考えた。

最後に、ヒトにおいても腸内細菌由来代謝物である短鎖脂肪酸が大腸での IgA 産生に影響を与えるか検討した。まずヒト糞便中の短鎖脂肪酸濃度と IgA 濃度を測定しその相関性を解析した。その結果、ヒト糞便中の酢酸、プロピオン酸、酪酸の各短鎖脂肪酸濃度と IgA 濃度の間にそれぞれ正の相関が認められた。次に、ヒトでもマウスと同様の機序で大腸 IgA 産生細胞が増加されるのか検討した。ヒト B 細胞を IgA 産生細胞分化誘導条件下で培養し、その際に酪酸を添加することで酪酸処理による IgA 産生細胞分化への影響を見たが、酪酸処理によって IgA 産生細胞の割合に変化は見られなかった。次に、ヒト末梢血単核球由来の樹状細胞をそれぞれの短鎖脂肪酸で処理した後に、B 細胞と共培養した結果、酪酸のみが IgA 産生細胞を増加させた。このことから、ヒトでもマウスと同様に、腸内細菌が産生する酪酸が樹状細胞に作用し IgA 産生細胞の増加に寄与する事が推測された。以上のことから、私は、腸内細菌由来の酪酸が樹状細胞の ATRA 及び TGF- β 1 の産生を促進し大腸の IgA 産生細胞を増加することを明らかにした。