

博士学位論文 2019 年度

腸内細菌由来代謝物による
大腸 IgA 誘導機構の解明

【要約版】

慶應義塾大学大学院薬学研究科

磯部順哉

目次

略語	2
第1章 序論	3
第2章 実験材料と方法	6
第3章 結果	16
第4章 考察	20
第5章 表	23
第6章 参考文献	25
謝辞	31

略語

本論文では以下の略語を使用する。

Ig: immunoglobulin	EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
SIgA: secretory IgA	DTT: dithiothreitol
pIgA: polymeric IgA	HBSS: Hank's balanced salt solution
pIgR: polymeric Ig receptor	FBS: fetal bovine serum
DSS: dextran sulfate sodium	RPMI: park memorial institute
CSR: class switching recombination	PBS: phosphate-buffered saline
TD: T-cell-dependent	FBS: Fetal Bovine Serum
TI: T-cell-independent	GF: germ-free
Tfh: Follicular helper T	GPR: G protein-coupled receptor
GALT: gut-associated lymphoid tissues	SPF: specific pathogen-free
GC: germinal center	CFU: colony-forming units
Treg: regulatory T	BM: bone marrow
LPS: lipopolysaccharide	BMDC: BM 由来樹状細胞
BAFF: B-cell activating factor	IL: interleukin
APRIL: a proliferation-inducing ligand	AA: anacardic acid
TGF- β 1: transforming growth factor β 1	cLP: colony lamina propria
ATRA: all-trans retinoic acids	qPCR: quantitative PCR
TACI: transmembrane activator and CAML interactor	HPLC: high-performance liquid chromatography
AID: activation-induced cytidine deaminase	ChIP: chromatin immunoprecipitation
LAP: latency-associated peptide	PBMC: peripheral blood mononuclear cells
MMP: matrix metalloproteinase	PBMDC: PBMC 由来樹状細胞
RALDH: retinal dehydrogenase	GC-MS: ガスクロマトグラフィー質量分析
ALDH: aldehyde dehydrogenase	HFi: 高繊維食
IEC: intestinal epithelial cells	LFi: 低繊維食
SCFA: short chain fatty acids	HDAC: histone deacetylase
HAMS: high-amylose maize starch	GLT α : germ-line transcription α
	HIF-1: hypoxia-inducible factor 1

第1章 序論

Immunoglobulin (Ig) A は腸管を始め粘膜表面の主要な抗体である。分泌型 IgA (secretory IgA: SIgA) は腸管粘膜表面を防御し、細菌、ウイルス及び毒素が肝臓や脾臓に移行するのを抑制する(1)。また、SIgA は腸内細菌の分布や構成を調節し、腸内細菌叢の維持にも役割を果たしている。腸管にいる形質細胞は IgA を重合体 IgA (polymeric IgA: pIgA) で産生する。この時の pIgA は主に二量体として産生され、単量体 IgA の重合化には J 鎖が関与している(2)。pIgA は、上皮細胞に発現している Polymeric Ig receptor (pIgR) と結合し、細胞内に輸送され管腔に分泌される(3, 4)。そのため、pIgR 欠損マウスでは腸管管腔の SIgA が減少している(5)。大腸の粘液層は、外粘液層と内粘液層の二層に分けられる。外粘液層には細菌が密に存在し、SIgA もまた外粘液層に集中することで病原微生物に対する第一線の生体防御バリアとして働いている(6, 7)。それゆえ、粘膜層の SIgA が減少するとデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sulfate sodium: DSS) などによって上皮細胞に障害を与えた際に見られる腸内細菌の組織移行や炎症が悪化する(8)。

IgA クラススイッチ組み換え (class switching recombination: CSR) は二つの異なる機構によって誘導され、それぞれ T 細胞依存的 (T-cell-dependent: TD) 機構と T 細胞非依存的 (T-cell-independent: TI) 機構が知られている(9, 10)。濾胞性ヘルパー T 細胞 (follicular helper T: Tfh) はパイエル板や盲腸パッチといった腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissues: GALT) の胚中心 (germinal center: GC) において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 TD IgA の産生を調整し、CSR を促進している(11-13)。さらに Foxp3⁺制御性 T 細胞 (regulatory T: Treg) も GALT の GC において IgA の分化を誘導し、腸内細菌との共生のバランス維持に重要である(14, 15)。しかしながら、TD 機構での高親和性 IgA の産生には、約 1 週間かかる。TD 機構での IgA の産生に要する期間を埋めるために、腸管免疫はより早く抗体を産生可能な TI IgA を持ち、TI IgA は lipopolysaccharide (LPS) のような微生物抗原を認識し産生される。TI IgA は、抗原には低親和性だが高結合 (avidity) な抗体のため、腸内細菌に対する粘膜バリアを形成し、病原微生物に対して防御的に働く(16)。TI IgA の産生は孤立リンパ小節やパイエル板、粘膜固有層で起こり(17-20)、IgM⁺ B 細胞が B-cell activating factor (BAFF)、a

proliferation-inducing ligand (APRIL) や transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) といったサイトカインや all-trans retinoic acids (ATRA) によって IgA CSR が誘導される(21–24)。これらのエフェクター分子である、BAFF と APRIL は B 細胞の transmembrane activator and CAML interactor (TACI) に結合する。TI IgA には TACI が必須であり、TACI 欠損マウスでは TI IgA 産生が失われる(25, 26)。TACI シグナルは CSR に必須の酵素である *Aicda* (activation-induced cytidine deaminase (AID) をコードする) の発現を誘導する。一方で IgA をコードする *C α* 遺伝子の転写は TGF- β 1 と ATRA のようなシグナルが必要とされている(27, 28)。TGF- β 1 は latency-associated peptide (LAP) と成熟 TGF- β 1 の複合体からなる不活性型として産生され、分泌後 LAP と TGF- β 1 の結合が切れ活性型の TGF- β 1 になる(29)。LAP から TGF1 の活性化は matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) や MMP-9、細胞外マトリックス分子のトロンボスポンジン 1 やインテグリン- α β 3、 α β 5、 α β 6、 α β 8 を含む複数分子の相互作用によって調節されている(30, 31)。それらの中でインテグリン- α β 8 は主に粘膜固有層中の樹状細胞に発現している(32)。レチナルデヒドロゲナーゼ (retinal dehydrogenase: RALDH) はアルデヒドデヒドロゲナーゼ (aldehyde dehydrogenase: ALDH) ファミリーに属し、レチノールから ATRA に代謝する過程で律速酵素として働いている(33)。RALDH は樹状細胞、ストローマ細胞、腸上皮細胞 (intestinal epithelial cells: IEC) で酵素活性がある。それらの中で、樹状細胞では RALDH2 が RALDH の中で最も酵素活性が高い(34)。

過去の研究で腸内細菌の腸への定着が腸管免疫の成熟や IgA 反応の誘導に重要な役割を持つことが報告されている(35)。それゆえ、無菌マウスでは腸管の IgA 産生が顕著に減少している(36)。腸内細菌は大腸 (盲腸や結腸) で水溶性食物繊維や難消化性スターチを発酵分解することで、酢酸、プロピオン酸、酪酸といった短鎖脂肪酸 (short chain fatty acids: SCFA) を産生する。最近の研究では三つの全ての SCFA で TD の IgA CSR を促進することが報告され、また、酢酸は TI の IgA CSR を誘導することも報告されている(37, 38)。それらの研究の中で、マウスは外因性の SCFA を飲水投与にて与えられている。飲水投与では、多くの SCFA が小腸で吸収され、血中の濃度を上げる一方で、大腸管腔での SCFA 濃度はほとんど変わらない(39)。それゆえ、生理的条件下で大腸において SCFA が IgA CSR を誘導するかは不明なままである。この問題を解決するために私

は、high-amylose maize starch (HAMS) と難消化性スターチに SCFA がエステル結合で結合したスターチを使用した。本研究で使用した難消化性スターチに SCFA がエステル結合で結合したスターチは大腸で SCFA 濃度を生理的条件下で上げること可能である。これらの特殊スターチを使用することで私は、酢酸とプロピオン酸でなく酪酸が結腸の IgA⁺の細胞を増加させることを見出した。また、そのメカニズムとして、酪酸は CD103⁺CD11b⁺の樹状細胞中のインテグリン- α v β 8 の発現とアルデヒドデヒドロゲナーゼの活性を上げることで TGF- β と ATRA の産生を促進することが *in vivo* と *in vitro* で確認した。さらに私は、酪酸がヒト B 細胞の IgA1 と IgA2 産生細胞への CSR を誘導することも確認した。

第2章 実験材料と方法

2-1. 抗体

本研究に用いた抗体を以下に示す。

抗体	クローン名	メーカー
Anti-Fc γ RIII/II	2.4G2	TONBO biosciences
Anti-Mouse IgA	C10-3	BD Biosciences
Anti-Mouse CD138	281-2	BD Biosciences
Anti-Mouse CD3 ϵ	145-2C11	eBioscience
Anti-Mouse CD4	GK1.5	Thermo Fisher Scientific
Anti-Mouse B220	RA3-6B2	eBioscience
Anti-Mouse IgM	R6-60.2	BD Biosciences
Anti-Mouse CD45	30-F11	eBioscience
Anti-Mouse CD43	1B11	BioLegend
Anti-Mouse CD11c	N418	eBioscience
Anti-Mouse MHC class II	M5/114.15.2	TONBO biosciences
Anti-Mouse Ter-119	TER119	TONBO Bioscience
Anti-Mouse integrin- α v	RMV-7	BioLegend
Anti-Mouse CD11b	M1/70	TONBO biosciences
Anti-Mouse CD103	2E7	BioLegend
Anti-Mouse IgD	11-26c2a	BioLegend
Anti-Mouse IgM	R6-60.2	BD Biosciences
Anti-Mouse CD19	eBio1D3	BioLegend
Anti-Mouse CD31	390	BD Biosciences
Anti-Mouse Ep-CAM	G8.8	BioLegend
Anti-Mouse podoplanin	8.1.1.	BioLegend
Anti-human IgA1	B3506B4	Southern Biotech
Anti-human IgA2	A9604D2	Southern Biotech
Anti-human IgM	SA-DA6	BioLegend

Anti-human integrin- α v	NK1-M9	BioLegend
Anti-human CD11c	3.9	BioLegend
Anti-human CD19	HIB19	BioLegend

2-2. 腸管組織分散用溶液及び細胞培養用溶液

- ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液: 20 mM EDTA (ナカライテスク)/1 mM Dithiothreitol (DTT) (Sigma)/1.25 mM HEPES (ナカライテスク)/Hanks' buffer salt solution (HBSS) (ナカライテスク)
- 2% NBCS/RPMI 溶液: 2% Newborn Calf Serum (NBCS)/1.25 mM HEPES (ナカライテスク)/100 mg/ml Penicillin (和光純薬)/100 mg/ml Streptomycin (和光純薬)/1640 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium (ナカライテスク)
- 2% NBCS/PBS 溶液: 2% NBCS/Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) (ナカライテスク)
- コラゲナーゼ溶液: 2% NBCS/0.5 mg/ml DNaseI (Sigma)/0.5 mg/ml Collagenase (和光純薬)/1.25 mM HEPES/100 mg/ml Penicillin/100 mg/ml Streptomycin/RPMI medium
- complete RPMI-1640: 10% (Fetal Bovine Serum: FBS)/12.5 mM HEPES/100 mg/ml Penicillin/100 mg/ml Streptomycin/10 mM 2-mercaptoethanol/RPMI medium
- advanced complete RPMI-1640: 10% FBS/12.5 mM HEPES/100 mg/ml Penicillin/100 mg/ml Streptomycin/10 mM 2-mercaptoethanol/Advanced RPMI 1640 medium (Thermo Fisher Scientific)

2-3. 実験動物

無菌 (germ-free; GF) マウスは慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター内のアイソレーターで飼育した。野生型 C57BL/6 マウスは慶應義塾大学薬学部生まれか日本クレア社から購入したマウスを使用した。*Tcrb*^{-/-}*Tcrd*^{-/-}マウスは東京大学医科学研究所の清野宏教授より分与して頂いた。*Ffar2* (G protein-coupled receptor: GPR43)^{-/-}マウスと *Far3* (*Gpr41*)^{-/-}マウスは東京農工大学の木村郁夫教授より頂いた。*Hcar2* (GPR109a)^{-/-}マウスは Max Planck Institute の Stefan Offermanns 教授より頂いた。IgA 欠損マウスは東京医科歯科大学の安達貴弘准教授より頂いた。全ての KO マウスのバックグラウンドは C57BL/6J とした。これらのマウスは、specific pathogen-free (SPF)、明暗周期、12/12 時間 (照明点

灯時間は 8:00~20:00)、温度は 25±2℃、湿度 50±5%の環境下で飼育した。餌および飲料水は自由に摂取した。

In vivo の実験では 3 週齢のマウスに AIN-93G を 3 日間与え、HAMS, HAMSA, HAMSP, HAMSB のいずれかを 4 週間与えた。*in vitro* では 3 週間 AIN-93G を与えた 7-9 週齢のマウスを使用した。

DSS 誘導腸炎の実験では 3 週齢のマウスに AIN-93G を 3 日間与え、HAMS 又は HAMSB のいずれかを 4 週間与えた。4 週間後、再度餌を AIN-93G に戻し、2.5% DSS を 1 週間投与し、2 日間水を飲水させた。その後、脾臓と肝臓を回収し、組織を粉砕し PBS で懸濁した。粉砕した組織は BHI 培地 (BD Bioscience, San Diego, USA) に撒き好気条件下で 1 日、嫌気条件下で 2 日間 37℃にて培養した。細菌の組織移行はコロニー数を計測し、colony-forming units (CFU) を算出した。

2-4. ヒト糞便の採取と保管

23 人の健常人 (20-59 歳) は全て日本人ボランティアである。ボランティアの方々の新鮮な糞便をプラスチックケースに入れ、すぐに-80℃で保存した。全ての実験は慶應義塾大学の倫理委員会から承認されたプロトコール (承認番号: 180213-1) に従って実施した。全てのボランティアの方からインフォームドコンセントを得た。ボランティアの方々が署名した同意書には調査結果を公開するための同意も含まれている。

2-5. マウス骨髄 (bone marrow: BM) 由来樹状細胞 (BMDC) の単離

7-9 週齢の雄マウスの手足を採取し、皮膚と筋肉を剥がし、骨を 70% エタノールに浸した。骨の BM 細胞を 2% NBCS/RPMI 溶液に押し出した。収集した細胞を complete RPMI-1640 培地に 10 µg/ml recombinant mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; BioLegend)、5 ng/ml recombinant mouse FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3L; BioLegend)、10 ng/ml recombinant mouse interleukin 4 (IL-4; BioLegend)及び 100 µM 酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、酪酸ナトリウムまたは 2.5 µM アナカルジン酸 (anacardic acid; AA) (Sigma) を添加し 6 日間培養した。培養 3 日目には培地交換を行なった。6 日後に、細胞を回収し、CD11c⁺細胞は biotin 標識 CD11c 抗体を使用して iMag Cell Separation System (BD Biosciences) 及び BD iMag Streptavidin Particle Plus-DM (BD Biosciences) を用いて樹状細胞として単離した。

2-6. B 細胞と BMDC の共培養

ナイーブ B 細胞は CD3ε、CD4、CD11b、CD11c、Ter-119、IgA 及び CD43 に対するビオチン化モノクローナル抗体を使用して IMag Cell Separation System 及び BD IMag Streptavidin Particle Plus-DM でネガティブ選択法により、マウスの脾臓から濃縮した。濃縮されたナイーブ B 細胞は、CD45R/B220 Magnetic Particles-DM (BD Bioscience)で収集した。BMDC とナイーブ B 細胞を complete RPMI-1640 培地、2 µg/ml LPS (Sigma)、5 ng/ml recombinant mouse IL-5 (R&D Systems)、5 ng/ml recombinant mouse IL-6 (BioLegend)、100 nM レチナール (Sigma)、10 ng/ml recombinant human latency-associated-protein-binding TGF-β (Cell Signaling Technology)、1 ng/ml recombinant human TGF-β (BioLegend)、10 nM ATRA (Sigma)、2 nM LE135 (Sigma) 及び 4 µg/ml 抗 TGF モノクローナル抗体 (Bio X Cell) で 6 日間共培養した。

2-7. フローサイトメトリーと細胞ソーティング

細胞を抗 FcγRIII/II (CD16/CD32) 抗体を用いて 15 分間ブロッキング後、蛍光標識抗体及び ALDEFUOR Kit (stem Cell Technologies) を用いて細胞表面抗原を 4°C で 30 分間染色した。2% NBCS/PBS 溶液で 2 回洗浄した後、7-AAD Viability Staining Solution (BioLegend)、Fixable Viability Stain (FVS) 780 (BD Biosciences) を用いて死細胞染色を行い、フローサイトメトリーは BD LSR II flow cytometry (BD Biosciences)、細胞ソーティングは FACS Aria III (BD Biosciences) で行い、得られたデータは FlowJo 10 software を用いて解析した。

2-8. 大腸粘膜固有層 (Colonic lamina propria: cLP) からの免疫細胞の単離

cLP 細胞の分離は常法に従い実施した (40)。大腸を摘出後、1 センチ間隔に細分し、30 ml の EDTA 溶液中で、スターラーにて攪拌しながら、37°C にて 20 分間インキュベートし上皮を剥離した。インキュベート後、大組織を取り出し、ミンスした後、コラゲナーゼ溶液中にて再び 37°C にて 20 分間インキュベートし、大腸の免疫担当細胞を分散した。本溶液を 100 µm cell strainer (FALCON) にて濾過し、4°C、500x g にて 5 分間遠心分離を行った。2% NBCS/PBS 溶液に再懸濁した細胞を回収した。

2-9. 上皮細胞の単離

大腸を摘出後、1 cm 間隔に細分し、大腸中央部を 30 mM EDTA、1 mM DTT 含有 HBSS に氷上で 20 分静置する。29 G の注射針を用いて上皮細胞をシート状に剥離することで単離した。

2-10. マウス大腸組織の免疫蛍光染色

大腸を摘出後、1 cm 間隔に細分し、大腸中央部を Tissue-Tek O.C.T compound (Sakura Finetek) に浸し液体窒素に入れて凍結させた。凍結させたサンプルをマイクロトームで厚さ 2 μm にカットし、MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業) に貼り付けた。MAS コートスライドガラスに貼り付けた切片を、 -20°C に冷やしておいたエタノールに 10 分間漬け、その後 -20°C の冷却アセトンに 10 分間漬け完全に乾燥させた。PBS で洗浄後、0.5% goat serum/PBS で希釈した蛍光標識抗体 (1:100) と 4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄した後、DAPI で 5 分間核染色を行い、Mountant PermaFluor (Thermo Fisher scientific) を用いて封入した。

2-11. マウス大腸組織の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション

大腸を摘出後、大腸両端を結紮する。大腸組織を -20°C に冷やしたアセトンに浸し液体窒素に入れて凍結させた。凍結させたサンプルを栄養・病理研究所にてパラフィン包埋し、マイクロトームで厚さ 2 μm にカットし、MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業) に貼り付けた。染色方法は常法に従い実施した(41)。 50°C にした 0.1% SDS/100 mM Tris/4.5 M NaCl/water で希釈した Probe と 50°C で 20 時間反応させた。PBS で洗浄後、1% goat serum/PBS で希釈した蛍光標識抗体 (1:100) と 4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄した後、DAPI で 5 分間核染色を行い、Mountant PermaFluor (Thermo Fisher scientific) を用いて封入した。

2-12. マウス結腸粘液と結腸組織培養液の ELISA

結腸粘液はマウスから摘出した大腸の片側を結紮し、もう一方側から 1 mM DTT/protease inhibitor (complete Mini, EDTA-free)/HBSS を 1 ml 注入後、結紮した。 37°C で 30 分間温浴震盪を行った後、大腸を切開し内容物を回収し、 4°C 、14,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。結腸組織培養液はマウスから摘出した大腸の中央部を 2ヶ所、直径 5 mm 程の円状にくりぬいた。96 well プレートに完全培地 100 μl /well と大腸組織を入れて、 37°C 、5% CO_2 に保たれたインキュベーター内で 24 時間培養後、上清を回収した。ELISA は、抗 IgA 抗体 (Bethyl Laboratories) を 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように 50 mM sodium carbonate, pH9.3 で希釈し、100 μl ずつ 96 well ELISA プレートに加えた。室温で 1 時間インキュベートした後、0.1% Tween20/TBS (以下、Wash buffer) で 5 回洗浄した。ここに 2% BSA/PBS, pH7.0 (以下、Blocking buffer) を 200 μl 加え、室温で 30 分インキュベートした。Wash buffer で 5 回洗浄し、試料およびスタンダードとして mouse reference serum (Bethyl Laboratories) を 100 μl /well 加えて室温で 1 時間インキ

ュベートした。その後、同様の洗浄を行い、Blocking buffer で 50,000 倍希釈した anti-Mouse IgA HRP conjugated (Bethyl Laboratories) を 100 μ l ずつ加えて、室温で 1 時間インキュベートした。再び洗浄した後、TMB Substrate Solution (Thermo Fisher scientific) を 100 μ l 加え、発色を見ながら 5-15 分間遮光して静置した。十分な発色が確認されたら、1.2 M H₂SO₄ を 100 μ l ずつ加え、発色を停止させた。ChroMate 4300 Microplate Reader (Awareness Technologies) を用いて 450 nm における吸光度を測定し、スタンダードに照らして総 IgA 濃度を算出した。

2-13. 活性化 TGF- β 濃度の測定

96 well プレートに 4x10⁴ cells/well となるよう MFB-F11 細胞(42)を播種し、完全培地中にて、37°C 5% CO₂ の条件で、24 時間インキュベーターした。培養後、PBS で 2 回洗浄し、DMEM (serum free) (ナカライテスク) を加えて 2 時間培養した。その後、2-3 の方法で調整した結腸組織培養液を加えて 24 時間培養し、培養上清を Great EscAPe SEAP Chemiluminescence Kit 2.0 (Clontech) を用いて測定した。

2-14. 定量的 PCR (quantitative PCR: qPCR)

細胞の RNA は TRIzol (Thermo Fisher Scientific) を用いて単離した。cDNA は iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Bio-Rad) を用いて合成した。合成された cDNA は SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) を用い CFX-connect (Bio-Rad) にて解析した。PCR は 95°C 30 秒、95°C 5 秒、60°C 15 秒を 40 サイクルという条件により行った。内部標準には *Actb*、*Rpl32* または *Gapdh* 遺伝子を用いた。qPCR に用いたプライマーは表 1 に示す。

2-15. 糞便と盲腸内容物中の有機酸の high-performance liquid chromatography (HPLC) 分析

糞便及び盲腸内容物中の HPLC 分析は常法に従い実施した(43)。Shim-pack SCR-102H column (Shimadzu) と電気伝導度検出器 (CDD-6A, Shimadzu) を備えた HPLC を使用し、糞便及び盲腸内容物中の有機酸を内部標準法で測定した。

2-16. クロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation: ChIP)

ChIP には、2-5 で単離した BMDC を用いた。BMDC を単離し、1% formaldehyde/PBS で 37°C で 10 分間固定した。固定反応は glycine (final 125 mM) を加えることで停止した。固定した細胞は RIPA buffer (ナカライテスク) を用いて溶解した。クロマチンは

Micrococcal Nuclease (TAKARA Bio) を用いて 100-300 bp に断片化し、ソニケーションによって核膜を破碎した。断片化したクロマチンを含む細胞溶解液は Dilution buffer (16.7 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 167 mM NaCl) によって希釈した。免疫沈降は control rabbit IgG (clone DA1E, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) または anti-acetyl histone H3K27 (Cell Signaling Technology) および Dynabeads Protein A (VERITAS) を用いて 4°C で一晩行なった。沈降後、磁気ビーズは low-salt buffer (20 mM Tris-HCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl) で 5 回、high-salt buffer (20 mM Tris-HCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl) で 3 回、TE buffer (ナカライテスク) で 2 回洗浄した。免疫複合体は elution buffer (10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% SDS) 中で 65°C で 4 時間インキュベートすることで溶出し、さらに proteinase K (55°C, 1 時間) を加えて脱クロスリンクした。沈降した DNA 断片は ChIP DNA Clean Concentrator (Zymo Research) を用いて精製した。ChIP-qPCR 解析は KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いた。PCR プライマーは各遺伝子におけるプロモーター領域に対して設計した。各プライマー配列は表 2 に示す。

2-17. ヒト末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMC) 由来樹状細胞 (PBMDC) の単離

PBMC を complete advanced RPMI-1640 に、20 ng/ml recombinant human GM-CSF (BioLegend)、20 ng/ml recombinant human IL-4 (BioLegend) 及び 100 μ M 酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウムまたは酪酸ナトリウムを添加し 6 日間培養した。培養 3 日目にメディウムを半量追加した。培養 6 日後、細胞を回収し、CD11c⁺細胞は biotin CD11c 抗体を使用して iMag Cell Separation System 及び BD iMag Streptavidin Particle Plus-DM で樹状細胞として単離した。

2-18. ヒト B 細胞と PBMDC の共培養

ヒト B 細胞は (Precision Bioservices) より購入した。2-15 で単離した PBMDC とヒト B 細胞を complete advanced RPMI-1640 培地に 20 μ g/ml LPS (Sigma)、50 ng/ml recombinant human IL-10 (BioLegend)、100 nM レチナール (Sigma) 及び 10 ng/ml recombinant human latency-associated-protein-binding TGF- β (Cell Signaling Technology) を添加し 6 日間共培養した。

2-19. ヒト糞便中の IgA1 と IgA2 の ELISA

ヒト糞便 5 mg を protease inhibitor (complete Mini, EDTA-free)/PBS 500 μ l で懸濁し、4°C、14,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。ELISA は、anti-human IgA 抗体 (Southern Biotech) を 1 μ g/ml となるように 50 mM sodium carbonate, pH9.3 で希釈し、100 μ l ずつ 96 well ELISA プレートに加えた。冷蔵で 1 日間インキュベートした後、Wash buffer で 5 回洗浄した。ここに 5% スキムミルク/PBS, pH7.0 (以下、dilution buffer) を 200 μ l 加え、室温で 30 分インキュベートした。Wash buffer で 5 回洗浄し、試料およびスタンダードとして recombinant IgA1 と IgA2 (Athens Research & Technology) を 100 μ l/well 加えて室温で 1 時間半インキュベートした。その後、同様の洗浄を行い、dilution buffer で 5,000 倍希釈した anti-human IgA1 biotin conjugated (Southern Biotech) 又は dilution buffer で 2,000 倍希釈した anti-human IgA2 biotin conjugated (Southern Biotech) を 100 μ l ずつ加えて、室温で 1 時間インキュベートした。再び洗浄した後、dilution buffer で 10,000 倍希釈した Poly-HRP Streptavidin (Thermo Fisher Scientific) を 100 μ l ずつ加えて、室温で 1 時間インキュベートした。再び洗浄した後、TMB Substrate Solution を 100 μ l 加え、発色を見ながら 5-10 分間遮光して静置した。十分な発色が確認されたら、2% HCl を 100 μ l ずつ加え、発色を停止させた。ChroMate 4300 Microplate Reader を用いて 450 nm における吸光度を測定し、スタンダードに照らして総 IgA 濃度を算出した。

2-20. ヒト糞便サンプルのガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS)

ヒトの便サンプル 50 mg を 2 ml のプラスチックチューブに集め、PBS を加えながら粉碎した。サンプルを 10,000x g 4°C、5 分間遠心した。上清 230 μ l を回収し、20% 5-スルホサリチル酸 23 μ l を加える。サンプルを室温で 10 分間静置し、その後、15,000x g 20°C、15 分間遠心する。上清 200 μ l を回収し、37% HCl を 10 μ l、ジエチルエーテル 1 ml 加えて振盪する。サンプルを室温で 15 分間静置し、15,000x g で 20°C、5 分間遠心する。上清 500 μ l を回収し、1 g/ml N-メチル-N-トリフルオロアセトアミド 50 μ l を加え、室温で 1 日静置する。GC-MS system (JMS-Q1500GC, 日本電子光学研究所) で測定した、

2-21. メタ 16S rRNA シークエンシング

糞便約 50 mg を 0.1 mm ジルコニア/シリカビーズ (BioSpec Products)、3.0 mm ジルコニアビーズ (バイオメディカルサイエンス)、Inhibit EX buffer (QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit) とともに 2 ml ハードチューブに入れ、Shake Master Neo で 1,500 rpm で 10 分間振盪を行うことで破碎した。その後、自動核酸抽出装置 magLEAD 6gC/12gC (Precision System Science) の製品プロトコルに従い、DNA の抽出を行った。抽出された DNA が

ら、Illumina technical noteのプロトコルに従い、メタ16S rRNAライブラリーDNAを調製した。まず、細菌ゲノムDNAの16S rRNAコード領域の可変部位V3, V4に特異的な配列とアダプター配列を含むプライマー (Forward: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTG TATAAGAGACAGGTGCCAGCMGCCGCGGTAA, Reverse: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC) を用いてPCRを行った。このPCRにはKAPA HiFi HS ReadyMixを使用した。PCR産物をAgencourt AMPure XP Beadsによって精製した後、Nextera XT index kitを用いて各検体由来のDNAにそれぞれ異なるインデックス配列を付加した。再度、Agencourt AMPure XP Beads による精製を行った後、10 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.5) で4 nMに希釈したものをプールした。プールされたライブラリーDNAはMiseq system (Illumina) を使用し、フォワード方向とリバース方向にそれぞれ300塩基対をシーケンシングした。

2-22. メタ 16S rRNA シーケンシングデータの解析

QIIME(44)のJoin_paired_ends.pyスクリプトにより、フォワード方向にシーケンシングした配列とリバース方向にシーケンシングした配列を結合した後、シーケンシングを行うために人為的に付加されたアダプター配列をcutadaptによりトリミングした。続いて、FASTQファイルをFASTAファイルに変換し、QIIMEのidentify_chimeric_seqs.pyスクリプト (usearch61メソッド) とfilter_fasta.pyスクリプトを用いてキメラ配列を除去した。次にそれぞれの検体のFASTAファイルを1つのFASTAファイルに統合し、QIIMEのpick_open_reference_otus.pyスクリプトを用いてoperational taxonomic unit (OTU) の選択を行った。系統分類はQIIMEのassign_taxonomy.pyスクリプトによってRDP classifierとGreengenesデータベース (97% identity) を使って行った。続いてOTU表をQIIMEのmake_otu_table.pyスクリプトにより作成し、filter_otus_from_otu_table.pyスクリプトにより0.005%以下のOTUを除いた。QIIMEのcore_diversity_analyses.pyスクリプトで5,000リードの深さまで考慮し、細菌叢の多様性解析を行った。

2-23. 統計処理

2 群間の差の統計解析には、等分散性が見られた場合には t 検定を、不等分散の場合には Mann-Whitney 検定を使用した。3 群間の差の統計解析には one-way ANOVA を用い、有意差が見られた場合には Tukey の多重比較検定を行なった。不等分散の場合には Kruskal-Wallis 検定を使用した。相関解析にはスピアマンの順位相関分析を使用した。全ての統計解析は GraphPad Prism 8 または R を用いて行った。P 値が 0.05 未満の時、有意な差があると判定した。

第3章 結果

3-1 酪酸は大腸 IgA を誘導する

始めに、腸内細菌による食物繊維の発酵分解によって生成された SCFA が腸管の IgA を増加させるかどうか調べた。GF マウスに SPF マウスから糞便移殖し、exGF マウスを作成した。exGF には、食物繊維が豊富な固形飼料として高繊維食 (HFi) または発酵性食物繊維を欠く AIN-93G の低繊維食 (LFi) を与えた。大腸の IgA⁺B220⁺細胞の割合は LFi 食を与えた exGF マウスまたは HFi 食を与えられた GF マウスよりも HFi 食を与えた exGF マウスで高かった。

食物繊維の発酵分解により腸管腔内の SCFA 濃度が増加していたため、どの SCFA が生理的条件下で大腸の IgA に影響するか検討した。SPF マウスに大腸管腔内で各 SCFA を特異的に増加させる酢酸化、プロピオン酸化又は酪酸化高アミローススターチ (それぞれ HAMS A, HAMS B, HAMS C) またはコントロール食として HAMS を与えた(45, 46)。HAMS C 摂取マウスは HAMS A, HAMS B, HAMS 摂取マウスと比べて大腸粘膜固有層 (cLP) の IgA⁺細胞が有意に増加した。免疫蛍光染色においても、HAMS C 摂取マウスの大腸組織の IgA⁺細胞の増加が見られた。次に HAMS C は IgA⁺細胞だけでなく大腸の SIgA 濃度にも影響を与えているか検討した。大腸粘液層の SIgA 濃度は、HAMS 摂取マウスよりも HAMS C 摂取マウスの方が高かった。蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション染色においても、HAMS C 摂取マウスの大腸粘液層の SIgA の増加が見られた。また、*Ex vivo* の大腸組織培養実験でも、HAMS C 摂取群の結腸組織が HAMS 摂取群の結腸組織よりも多く IgA を分泌していた。以上の結果から、生理的条件下において酪酸が大腸 IgA 産生の増加に関与していることが明らかとなった。

3-2 酪酸による IgA の誘導は炎症時の結腸の粘膜バリア機能を向上する

SIgA は粘膜表面への微生物の接着を防ぐ上で重要な役割を果たしているため、酪酸によって誘導された SIgA は炎症時などで上皮によるバリア機能が低下している時に腸管のバリア機能を上げていると考えた。そこで野生型マウスに HAMS 又は HAMS C を 4 週間与えその後、潰瘍性大腸炎を誘発するために DSS を投与した(47)。糞便を用いたクリニカルスコアと大腸の長さは 2 つのグループで差は見られなかった。しかしながら、腸内細菌の肝臓への移行は HAMS C 摂取群で有意に抑制していた。SIgA が酪酸投与による細菌の組織移行の抑制に関わっているか検討するため、IgA 欠損マウスを用いた。その結果、IgA 欠損マウスでは、腸内細菌の組織移行に対する酪酸の抑制効果は認めら

れなかった。以上の結果から、酪酸による IgA の誘導は炎症時の腸内細菌の組織移行を抑制していることが明らかとなった。

3-3 酪酸は T 細胞非依存的 IgA 誘導を促進する

腸内の IgA 産生は TD 及び TI IgA CSR によって産生される(48)。TD IgA 産生に対する SCFA の影響は、GC B 細胞の数に影響を与えずに酪酸が IgA CSR の減少を示す事が過去の研究で明らかとなっている(49)。一方で SCFA が IgA CSR を促進することも報告されている(37)。TD IgA CSR に対する酪酸の影響を確認するために、HAMS 又は HAMS B 摂食マウスの TD IgA CSR を主に誘導する場である大腸の GALT (cecal patch と colonic patch) の胚中心反応を解析した。HAMS B の摂食は、大腸の GALT の GC B 細胞の割合や数には影響を与えなかった。同様に HAMS B 摂食は大腸の GALT の B220⁺IgA⁺細胞には影響を与えなかった。

次に、T 細胞受容体 $\beta\delta$ (TCR $\beta\delta$) ダブルノックアウト (TCR dKO) マウスに HAMS B を与えることにより、TI IgA 産生に対する酪酸の影響を検討した。その結果、TCR dKO マウスでも HAMS 摂食マウスに比べ HAMS B 摂食マウスで IgA⁺細胞の割合と数が増加した。以上の結果から、大腸管腔内で産生された酪酸は少なくとも TI 機構を介して IgA 産生を増加させることが明らかとなった。

3-4 酪酸は樹状細胞の存在化で IgA⁺細胞を増加させる

次に、酪酸が TI IgA 産生を促進するメカニズムについて調べた。B 細胞には、酪酸の受容体である GPR41 と GPR109a を発現している。そこで、酪酸が B 細胞に直接作用して IgA CSR を促進するかまず始めに検討した。脾臓由来の CD43⁺B220⁺ B 細胞を TI IgA 誘導条件下 (TGF- β 1 及び ATRA) において LPS 刺激し(46)、100 μ M の酪酸存在化又は非存在化で培養した。TGF- β 1 と ATRA の組み合わせは B 細胞の IgA CSR を誘導したが、TGF- β 1 と ATRA の有無に関わらず酪酸によって IgA⁺細胞の割合は変化しなかった。従って、酪酸は、B 細胞に直接影響せず他の細胞を介して TI IgA 産生を増加していると考えた。そこで私は、どの細胞が酪酸の IgA 産生誘導に関与するか検討した。cLP では、樹状細胞が TI IgA 誘導において TGF- β 1 と ATRA を産生することにより、B 細胞の IgA CSR を促進する(24, 50)。そこで、B 細胞を酪酸で刺激した BMDC または酪酸で刺激していない BMDC と共培養した。その結果、酪酸で刺激した BMDC は、酪酸で刺激していない BMDC よりも IgA⁺細胞を有意に増加させた。同様に、CSR において高発現する AID の遺伝子発現も酪酸刺激した BMDC と共培養した B 細胞で有意に増加し

た。以上の結果から、酪酸は樹状細胞を介して IgA 産生誘導することが明らかとなった。

3-5 酪酸は非造血細胞の機能に影響を与える

IEC やストローマ細胞などの非造血細胞に由来する BAFF、APRIL、TGF- β 1 などのサイトカインも TI IgA CSR に関与している(21, 51)。これらのサイトカインの発現に対する酪酸の影響を確認するために、HAMS 又は HAMS B 摂食マウスから大腸の IEC とストローマ細胞を単離し、それぞれの遺伝子発現について解析した。HAMS B 摂食マウス由来の IEC では HAMS 摂食マウスの IEC よりも高いレベルの *Tnfrsf13* (APRIL) の発現が見られたが *Rnfsf13b* (BAFF)、*Tgfb1* (TGF- β 1) 及び SIgA への管腔への輸送に関与する *Pigr* (PIgR) の発現レベルは、同程度だった。ストローマ細胞での遺伝子発現 (*Mmp2*, -9, -13 及び *Aldh1a1*, -2, -3) は二つの群で有意な差は見られなかった。また、酪酸で刺激した大腸ストローマ細胞又は酪酸で刺激していないストローマ細胞と共培養した B 細胞においても IgA⁺細胞の割合に変化は見出せなかった。

3-6 酪酸は CD103⁺CD11b⁺樹状細胞でのインテグリン- α v β 8 の発現とアルデヒドデヒドロゲナーゼの活性を促進する

酪酸刺激した樹状細胞との共培養では IgA CSR を促進していたため、そのメカニズムについて調べた。腸管の樹状細胞は LPS などの細菌由来分子によって刺激されて IgA CSR 及び IgA の分泌を誘導する ATRA 及び TGF- β 1 を生成することが知られている(52, 53)。酪酸が樹状細胞の ATRA の産生を促進しているか検討するために、ALDEFLUOR assay を用いて ALDH の活性を評価した。その結果、酪酸の刺激は、BMDC の ALDH の活性を有意に高めていることが見られた。この結果と同様に酪酸で刺激した BMDC の *Aldh1a2* の遺伝子発現も増加していた。また、*in vivo* においても HAMS B を摂食したマウスは cLP の CD103⁺CD11b⁺樹状細胞において ALDH 活性が増加した。以上の結果から、酪酸が cLP の樹状細胞での ATRA の産生を増加している事が示唆された。

次に私は、樹状細胞での TGF- β 1 の活性化に対する酪酸の影響を検討した。LAP からの活性化 TGF- β の放出に関与するインテグリン- α v β 8 は、主に腸管粘膜固有層の CD103⁺樹状細胞に発現している(32)。そこで酪酸の刺激による BMDC への影響を調べたところ、酪酸の刺激によって BMDC の *Itgav* 及び *Itgb8* の遺伝子発現が増加した。また、フローサイトメトリーにより、酪酸で刺激した BMDC 及び HAMS B 摂食マウスの cLP での CD103⁺CD11b⁺樹状細胞のインテグリン- α v の発現が増加した。この結果と同様に、大腸組織での TGF- β 1 の産生量は、HAMS 摂食マウスよりも HAMS B 摂食マウスにおい

て増加していた。これらの結果から、酪酸が樹状細胞の機能を調節することにより TI IgA の誘導を促進することが示唆された。そこで、B 細胞と酪酸刺激した BMDC の共培養中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と、酪酸で刺激した BMDC による IgA⁺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 CSR の誘導効果が完全にキャンセルされ酪酸で刺激していない BMDC と同じ IgA⁺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 CSR を誘導することが考えられた。

3-7 酪酸刺激樹状細胞は GPR シグナル伝達とヒストン脱アセチル化酵素阻害作用を介して IgA 誘導能を示す

次に私は、酪酸が樹状細胞の ALDH 活性とインテグリン- α v β 8 の発現を増加させるメカニズムについて検討した。酪酸は、GPR41、-43 及び-109a のリガンドであり、cLP の樹状細胞は GPR41 及び GPR109a を発現している。酪酸による TI IgA 産生誘導への GPR シグナル伝達の寄与を確認するため、樹状細胞分化条件下で様々な GPR リガンド (酪酸、プロピオン酸、酪酸及びナイアシン) で BM 細胞を刺激した。酪酸及び酪酸は、BMDC のインテグリン- α v β 8 の発現を増加し、酪酸は BMDC の ALDH 活性も有意に増加した。プロピオン酸及びナイアシンも ALDH 活性を有意に増加させたが、酪酸に比べて活性は低かった。さらに、他の GPR リガンドと異なり酪酸で刺激した BMDC との共培養だけが、B 細胞の IgA CSR を促進していた。これらの GPR リガンドの中で、酪酸は最も強力なヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) 阻害作用を示すことも知られている(54)。したがって HDAC 阻害作用も樹状細胞の機能調節に影響しているかもしれないと考えた。そこで、酪酸が HDAC 阻害作用を介して樹状細胞のインテグリン- α v β 8 の発現と ALDH 活性を増加しているか検討した。クロマチン免疫沈降-定量的 PCR (ChIP-qPCR) 分析により、酪酸の刺激が BMDC の *Itgav* 及び *Aldh1a2* のプロモーター領域でのヒストン H3K27 のアセチル化を引き起こしていた。この結果から、酪酸によるエピジェネティックな変化が樹状細胞での *Itgav* 及び *Aldh1a2* の発現を増加させることが示唆された。しかしながら、ヒストンのアセチル化に拮抗するヒストンアセチル化トランスフェラーゼ (HAT) 阻害剤である AA を BMDC に添加しても酪酸による BMDC のインテグリン- α v β 8 の発現及び ALDH の活性の増加は阻害できなかった。同様に、AA を BMDC に添加し BMDC と B 細胞の共培養時に添加したところ、酪酸刺激した樹状細胞による IgA⁺細胞の増加を少し低下させた。これらの結果から、HDAC

阻害作用によるエピジェネティックな変化は樹状細胞の機能に影響し IgA 産生を誘導するには不十分であることが考えられた。したがって、私は、HDAC 阻害作用と GPR シグナル伝達の両方が樹状細胞の機能変化に必要であると推測した。この推論を検討するために、AA と GPR41/109a dKO 及び GPR43/109a dKO マウスの BMDC を用いて検討した。IgA CSR に対する酪酸の効果は、AA で処理した GPR41/109a dKO BMDC で無効になった。同様に、酪酸によるインテグリン- $\alpha\beta8$ の発現と ALDH 活性の増加は AA で処理した GPR41/109a dKO BMDC で無効になった。以上の結果から、酪酸は GPR シグナル伝達と HDAC 阻害作用によって樹状細胞のインテグリン- $\alpha\beta8$ の発現と ALDH 活性を増加させることが考えられた。

3-8 短鎖脂肪酸は樹状細胞の機能を調節することでヒト B 細胞の IgA クラススイッチを誘導する

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。健康なボランティアの方の糞便サンプル中の腸内細菌由来の有機酸と糞便中総 IgA 濃度の相関分析を最初に行い、有機酸の総量と IgA 総濃度の間に正の相関を示すことが認められた。さらに有機酸の中で、酢酸、プロピオン酸及び酪酸が IgA 総濃度と正の相関を示すことが認められた。また、糞便中の SCFA 濃度と IgA サブクラス濃度の相関関係を分析した結果、各 SCFA の濃度と IgA1 及び IgA2 の両方で正の相関があることが認められた。酢酸、プロピオン酸、酪酸の濃度もそれぞれで正の相関を示していた。さらに、糞便中 IgA 濃度及び有機酸濃度と腸内細菌との相関関係を分析した結果、*Bacteroides uniformis* が酪酸及び酢酸と正の相関を示した。

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⁺細胞分化への影響を見たが、酪酸処理によって IgA⁺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 IgA1⁺細胞及び IgA2⁺細胞を増加させた。またその際に、酪酸処理した樹状細胞を解析した結果、ヒト樹状細胞においても酪酸によって、ALDH の活性とインテグリン- $\alpha\beta$ の発現が増加していた。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⁺細胞の増加に寄与する事が考えられた。以上の結果から、腸内細菌由来の酪酸が樹状細胞中の ALDH の活性とインテグリン- $\alpha\beta8$ の発現を増加させることで ATRA 及び TGF- $\beta1$ の産生を促進し大腸の IgA⁺細胞を増加することを明らかにした。

第4章 考察

本研究では、腸内細菌の発酵代謝物である酪酸が cLP の TI IgA 産生誘導を促進し、腸管粘膜面での IgA 量を増加させることを明らかにした。HAMSB 摂食マウスでは、炎症時に見られる腸内細菌の全身臓器への移行を抑制していた。この HAMSB 摂食による炎症時の腸内細菌の全身臓器への移行抑制は IgA 欠損マウスでは見られなくなるため、酪酸が TI IgA 産生を誘導することによって、粘膜バリアを強化すると考えられる。TD で産生される IgA は高親和性抗体のため、標的抗原に特異的に結合する。一方で、TI で産生される IgA は親和性が低く様々な抗原に結合することが可能である。炎症時には上皮細胞が破壊され、多くの腸内細菌が組織に移行する。そのため、様々な腸内細菌に結合することができる TI IgA が炎症時におけるバリア機能には重要であり、HAMSB 摂食により TI IgA 産生を増加し炎症時の腸内細菌の全身臓器への移行が抑制されたと考えられる。

酪酸による TI IgA 産生誘導は、マウスとヒトの両方の B 細胞で観察された。マウスは単一の IgA アイソタイプだが、ヒトには IgA1 と IgA2 の二つの IgA アイソタイプがある(55, 56)。IgA1 は多くの組織において主要な IgA サブクラスだが、腸においては IgA1 と IgA2 の存在比は、4:6 で存在しするため、腸管においては IgA1 と IgA2 の両方のサブクラスが重要である(57)。また、各 IgA サブクラスはその産生機構も異なり、IgA1 は TD と TI の両方の機構で産生されるが IgA2 は TI 機構でのみ産生される(51)。酪酸がヒトにおいても TI IgA 産生に関与しているか検討するため、腸管腔内の酪酸濃度と IgA 濃度を測定した結果、管腔内の酪酸濃度は IgA1 及び IgA2 濃度と正の相関を示した。また、*in vitro* の実験系において、酪酸で刺激した PBMC は B 細胞の IgA1 と IgA2 の両方で CSR を促進することから酪酸はヒトにおいても少なくとも TI の IgA 産生機構を誘導すると考えられた。酪酸は、ヒト及びマウスの腸内細菌叢の主要メンバーである *Clostridium cluster IV* 及び *XIVa* によって産生される。ヒトの腸内では、*Clostridium cluster IV* に分類される *Faecalibacterium prausnitzii* が酪酸から最も多く酪酸を産生する(58)。また、*Bacteroides uniformis*、*Bacteroides ovatus* 及び *Bacteroides dorei* は酪酸、プロピオン酸と酪酸の全てを産生する(59)。したがって、これらの SCFA は同様の細菌群によって産生されることが考えられるため、酪酸だけでなく酪酸とプロピオン酸も糞便の IgA 濃度と正の相関を示したと考えられる。

酪酸は、*in vivo* 及び *in vitro* の両方で樹状細胞の TGF- β を活性化に関与するインテグリン- $\alpha\beta 8$ の発現と ALDH 活性を増加させた。さらに、*in vitro* において TGF- $\beta 1$ と ATRA のシグナル伝達の両方を阻害すると、酪酸で刺激した BMDC による IgA CSR の誘導効

果が完全にキャンセルされ、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。これらの結果から、酪酸は樹状細胞を介して腸管の TGF- β 1 及び ATRA の産生を増加させて IgA 産生細胞を増加させると考えられる。TGF- β 1 と ATRA は、B 細胞の AID 遺伝子の発現を誘導することにより IgA CSR を誘導することが知られている(60, 61)。同様に、酪酸で刺激した樹状細胞は、B 細胞における AID 遺伝子の発現を増加した。TGF- β 1 及び ATRA は、germ-line transcription of α (GTL α)及びその後の IgA への CSR にも寄与している(53)。そのため、酪酸は GTL α を介して IgA CSR を促進している可能性がある。酪酸で刺激した樹状細胞のインテグリン- α v β 8 の発現と ALDH 活性の増加は、HDAC の阻害作用と GPR41 及び-109a シグナル伝達の両方が関係していたことから、ヒストンのアセチル化が HDAC の阻害に増加した時の GPR41 及び-109a シグナル伝達の活性化を含む、複数の分子メカニズムによって誘導されているかもしれない。SCFA の中で、酪酸は最も強く HDAC 阻害活性を示し、また、GPR43 よりも GPR41 及び-109a に強く結合する(62)。特に、cLP の樹状細胞は GPR41 と-109a を発現しているが、GPR43 を欠いている。したがって、他の GPR リガンドと比べて酪酸のみがインテグリン- α v β 8 の発現と ALDH 活性の増加を促進していると考えられる。しかし、これまでの報告で、酪酸に加えて、酢酸とプロピオン酸の飲水投与が小腸の IgA 産生を誘導することが明らかとなっている(37, 38)。この研究との矛盾は、2つの研究における SCFA 投与方法に起因する可能性がある。飲水による SCFA の投与では血清濃度を増加させるが、大腸内腔における SCFA の濃度はあまり増加しない(39)。対照的に、HAMSA と HAMSP は大腸の腸内細菌叢によって分解され、それぞれ酢酸とプロピオン酸の管腔内濃度を増加させる(46)。酢酸は TI IgA CSR を促進するが(38)、HAMSA は IgA CSR を促進しなかった。飲水投与による SCFA の投与では SCFA が小腸で吸収される。小腸の樹状細胞は、酢酸の受容体である GPR43 を発現している(63)。しかしながら、cLP の樹状細胞はほとんど GPR43 を発現していない。したがって、cLP の樹状細胞は酢酸に反応しないため、HAMSA は IgA CSR を促進していないと考えられる。プロピオン酸を飲水投与することで腸管の B 細胞内のクエン酸回路を促進し、栄養応答シグナルである mTOR を活性化することで B 細胞から形質細胞への分化を促進することが報告されている(37)。しかしながら、HAMSP では IgA⁺細胞が僅かに増加する程度だった。この理由として、小腸と大腸の B 細胞では mTOR シグナル活性が異なるのかもしれないが、そのような報告はなく、理由を明らかにすることは今後の課題である。

HAMSB 投与マウスの IEC において、B 細胞の TACI シグナルを介して IgA CSR を誘導する APRIL をコードする *Tnfsf13* の発現が高くなっていた。IEC の APRIL は TI IgA 産生を促進することが知られている(23)。したがって、HAMSB 摂食によって IEC の

APRIL の発現が増加し、腸管の IgA 産生細胞を増加している可能性が考えられる。これを検討するには今後、HAMSB 摂食マウスの IEC の APRIL の発現量を測定したり、上皮細胞特異的に *Tnfsf13* を欠損したマウスを用いたりする必要がある。

本研究では、酪酸がヒストンのアセチル化 HDAC の阻害作用と GPR41 及び-109a シグナル伝達を介して樹状細胞の ALDH の活性とインテグリン- $\alpha v\beta 8$ の発現が増加をさせることで ATRA 及び TGF- $\beta 1$ の産生を促進し、IgA CSR に繋がる大腸微小環境を築くことを示した。この効果は、炎症条件下での細菌の侵入に対する防御において重要な役割を果たす可能性がある。酪酸は結腸で Treg 細胞と IgA⁺B 細胞の両方を誘導するため(46, 48)、過剰な免疫応答を抑制し、粘膜バリアを強化することにより、腸管の免疫恒常性を維持する重要な要素であると考えられる。

第5章 表

表 1. 本研究で使したプライマー

	Sense	Anti-sense
<i>Rpl32</i>	GGCTTT TCGGTTCTTAGAGGA	TTCCTGGTCCACAATGTCAA
<i>Tgfb1</i>	GCCTGAGTGGCTGTCTTTTG	GTGAGCGCTGAATCGAAAGC
<i>Tnfsf13</i>	CGACACGCCGACTATACGAA	GCCTGTTTGCCTCACCCTA
<i>Tnfsf13</i>	TGGAAGGATGGGGCGAAATC	ACGTCAGAGTCTGCCTTGGA
<i>Mmp2</i>	AACGGTCGGGAATACAGCAG	GTAAACAAGGCTTCATGGGGG
<i>Mmp9</i>	AGCCGACTTTTGTGGTCTTC	TGCTTCTCTCCCATCATCTGG
<i>Mmp13</i>	AGAAGTGTGACCCAGCCCTA	CAGGCGCCAGAAGAATCTGT
<i>Pigr</i>	AGAACTCCAGGTTGCCGAAG	ACGGATAGTGGCAGGAAACG
<i>Aldh1a</i>	CTGGCTACAATGGAGGCACTCA	AGTGAAAATGTCTCCATCACTTGG
<i>Aldh1a</i>	TGGTATCCTCCGCAATGCAA	TCCCGTAAGCCAAACTCACC
<i>Aldh1a</i>	GACGAAAAAGGCATGAAGGA	TCAGCTGGCTGACCTTGTAG
<i>Aid</i>	GGCTGAGGTTAGGGTTCCATCTC	GAGGGAGTCAAGAAAGTCACGCT
<i>Ffar3</i>	GCAGCATGTGGCATGAGATG	CCACGCTCAGAAAACGTTCG
<i>Ffar2</i>	TGCTCTGAAGAAGCCAATCAG	AGGCCGTGAGGATCAAGGAA
<i>Hcar2</i>	TCTCCACGTGTATCAACCGC	CCATTAGCGCCCCTGGAATA

表 2. 本研究で使⽤したプライマー

	Sense	Anti-sense
<i>Rpl13</i>	TAATCTCAGGCGTTGGGGTG	TACAGGAATCCGGTGCCCTA
<i>Aldh1a2</i>	GGTGTGGATGGGAAGAGGAAAGGAAA	CATCTGCCTTGGGTTGCCTGGATATT
<i>Intgav</i>	AGGGACTGAAGTCTTTCGGC	GGACTTTCGACGTCCAGGTT

第 6 章 参考文献

1. Suzuki, K., and A. Nakajima. 2014. New aspects of IgA synthesis in the gut. *Int. Immunol.* 26: 489–494.
2. Johansen, Braathen, and Brandtzaeg. 2000. Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. *Scand. J. Immunol.* 52: 240–248.
3. Johansen, F.-E., R. Braathen, and P. Brandtzaeg. 2001. The J Chain Is Essential for Polymeric Ig Receptor-Mediated Epithelial Transport of IgA. *J. Immunol.* 167: 5185–5192.
4. Johansen, F. E., and C. S. Kaetzel. 2011. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: New advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 4: 598–602.
5. Shimada, S., M. Kawaguchi-Miyashita, A. Kushiro, et al. 1999. Generation of polymeric immunoglobulin receptor-deficient mouse with marked reduction of secretory IgA. *J. Immunol.* 163: 5367–73.
6. Fadlallah, J., H. El Kafsi, D. Sterlin, et al. 2018. *Microbial ecology perturbation in human IgA deficiency.*
7. Nakajima, A., A. Vogelzang, M. Maruya, et al. 2018. IgA regulates the composition and metabolic function of gut microbiota by promoting symbiosis between bacteria. *J. Exp. Med.* 215: 2019–2034.
8. Moon, C., M. T. Baldrige, M. A. Wallace, et al. 2015. Vertically transmitted faecal IgA levels determine extra-chromosomal phenotypic variation. *Nature* 521: 90–93.
9. Macpherson, A. J., D. Gatto, E. Sainsbury, et al. 2000. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science (80-)*. 288: 2222–2226.
10. Allman, D., J. R. Wilmore, and B. T. Gaudette. 2019. The continuing story of T-cell independent antibodies. *Immunol. Rev.* 288: 128–135.
11. Masahata, K., E. Umemoto, H. Kayama, et al. 2014. Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch. *Nat. Commun.* 5: 3704.

12. Tsuji, M., N. Komatsu, S. Kawamoto, et al. 2009. Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3 + T cells in gut Peyer's patches. *Science* (80-.). 323: 1488–1492.
13. Shima, H., T. Watanabe, S. Fukuda, et al. 2014. A novel mucosal vaccine targeting Peyer's patch M cells induces protective antigen-specific IgA responses. *Int. Immunol.* 26: 619–625.
14. Kawamoto, S., M. Maruya, L. M. Kato, et al. 2014. Foxp3 + T Cells Regulate Immunoglobulin A Selection and Facilitate Diversification of Bacterial Species Responsible for Immune Homeostasis. *Immunity* 41: 152–165.
15. Cong, Y., T. Feng, K. Fujihashi, et al. 2009. A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 19256–19261.
16. MacPherson, A. J., K. D. McCoy, F. E. Johansen, et al. 2008. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* 1: 11–22.
17. Fagarasan, S., K. Kinoshita, M. Muramatsu, et al. 2001. In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature* 413: 639–643.
18. Tsuji, M., K. Suzuki, H. Kitamura, et al. 2008. Requirement for Lymphoid Tissue-Inducer Cells in Isolated Follicle Formation and T Cell-Independent Immunoglobulin A Generation in the Gut. *Immunity* 29: 261–271.
19. Bergqvist, P., A. Stensson, N. Y. Lycke, et al. 2010. T Cell-Independent IgA Class Switch Recombination Is Restricted to the GALT and Occurs Prior to Manifest Germinal Center Formation. *J. Immunol.* 184: 3545–3553.
20. Komban, R. J., A. Strömberg, A. Biram, et al. 2019. Activated Peyer's patch B cells sample antigen directly from M cells in the subepithelial dome. *Nat. Commun.* 10: 1–15.
21. Fagarasan, S. 2008. Evolution, development, mechanism and function of IgA in the gut. *Curr. Opin. Immunol.* 20: 170–177.
22. Tezuka, H., Y. Abe, M. Iwata, et al. 2007. Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* 448: 929–933.

23. Wang, Y., L. Liu, D. J. Moore, et al. 2017. An LGG-derived protein promotes IgA production through upregulation of APRIL expression in intestinal epithelial cells. *Mucosal Immunol.* 10: 373–384.
24. Islam, K. B., L. Nilsson, P. Sideras, et al. 1991. TGF- β 1 induces germ-line transcripts of both IgA subclasses in human B lymphocytes. *Int. Immunol.* 3: 1099–1106.
25. Castigli, E., S. A. Wilson, S. Scott, et al. 2005. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J. Exp. Med.* 201: 35–39.
26. Tz-Ulrich Von Bü Low, G., J. M. Van Deursen, and R. J. Bram. 2001. Regulation of the T-Independent Humoral Response by TACI receptor (TNFR) family, based on limited sequence homology in its extracellular domain. It is expressed mainly on mature B cells and possibly is induced in a subset. *Immunity* 14: 573–582.
27. Park, M. H., S. R. Park, M. R. Lee, et al. 2011. Retinoic acid induces expression of Ig germ line α transcript, an IgA isotype switching indicative, through retinoic acid receptor. *Genes and Genomics* 33: 83–88.
28. Lebman, D. A., D. Lee, and R. L. Coffman. 2019. Mechanism for transforming growth factor beta and IL-2 enhancement of IgA expression in lipopolysaccharide-stimulated B cell
Information about subscribing to The Journal of Immunology is online at : .
29. Todorovic, V., and D. B. Rifkin. 2012. LTBP_s, more than just an escort service. *J. Cell. Biochem.* 113: 410–418.
30. Annes, J. P., Y. Chen, J. S. Munger, et al. 2004. Integrin $\alpha\beta$ 6-mediated activation of latent TGF- β requires the latent TGF- β binding protein-1. *J. Cell Biol.* 165: 723–734.
31. Worthington, J. J., A. Kelly, C. Smedley, et al. 2015. Integrin $\alpha\beta$ 8-Mediated TGF- β Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* 42: 903–915.
32. Boucard-Jourdin, M., D. Kugler, M.-L. Endale Ahanda, et al. 2016. β 8 Integrin Expression and Activation of TGF- β by Intestinal Dendritic Cells Are Determined by Both Tissue Microenvironment and Cell Lineage. *J. Immunol.* 197: 1968–1978.

33. Napoli, J. L. 1999. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1440: 139–162.
34. McDonald, K. G., M. R. Leach, K. W. M. Brooke, et al. 2012. Epithelial expression of the cytosolic retinoid chaperone cellular retinol binding protein II is essential for in vivo imprinting of local gut dendritic cells by lumenal retinoids. *Am. J. Pathol.* 180: 984–997.
35. Lee, W. J., and K. Hase. 2014. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat. Chem. Biol.* 10: 416–424.
36. Hapfelmeier, S., M. A. E. Lawson, E. Slack, et al. 2010. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* 328: 1705–09.
37. Kim, M., Y. Qie, J. Park, et al. 2016. Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses. *Cell Host Microbe* 20: 202–214.
38. Wu, W., M. Sun, F. Chen, et al. 2017. Microbiota metabolite short-chain fatty acid acetate promotes intestinal IgA response to microbiota which is mediated by GPR43. *Mucosal Immunol.* 10: 946–956.
39. Lucas, S., Y. Omata, J. Hofmann, et al. 2018. Short-chain fatty acids regulate systemic bone mass and protect from pathological bone loss. *Nat. Commun.* 9: 1–10.
40. Weigmann, B., I. Tubbe, D. Seidel, et al. 2007. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nat. Protoc.* 2: 2307–2311.
41. Obata, Y., D. Takahashi, M. Ebisawa, et al. 2012. Epithelial Cell-Intrinsic Notch Signaling Plays an Essential Role in the Maintenance of Gut Immune Homeostasis. *J. Immunol.* 188: 2427–2436.
42. Tesseur, I., K. Zou, E. Berber, et al. 2006. Highly sensitive and specific bioassay for measuring bioactive TGF-beta. *BMC Cell Biol.* 7: 15.
43. Morita, T., S. Kasaoka, A. Oh-hashii, et al. 1998. Resistant Proteins Alter Cecal Short-Chain Fatty Acid Profiles in Rats Fed High Amylose Cornstarch. *J. Nutr.* 128: 1156–1164.
44. Caporaso, J. G., N. Fierer, A. G. Peña, et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7: 335–336.

45. Clarke, J. M., G. P. Young, D. L. Topping, et al. 2012. Butyrate delivered by butyrylated starch increases distal colonic epithelial apoptosis in carcinogen-treated rats. *Carcinogenesis* 33: 197–202.
46. Furusawa, Y., Y. Obata, S. Fukuda, et al. 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504: 446–450.
47. Chassaing, B., J. D. Aitken, M. Malleshappa, et al. 2014. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr. Protoc. Immunol.* .
48. Fagarasan, S., S. Kawamoto, O. Kanagawa, et al. 2010. Adaptive Immune Regulation in the Gut: T Cell–Dependent and T Cell–Independent IgA Synthesis. *Annu. Rev. Immunol.* 28: 243–273.
49. White, C. A., E. J. Pone, T. Lam, et al. 2014. Histone Deacetylase Inhibitors Upregulate B Cell microRNAs That Silence AID and Blimp-1 Expression for Epigenetic Modulation of Antibody and Autoantibody Responses. *J. Immunol.* 193: 5933–5950.
50. Den Hartog, G., C. Van Altena, H. F. J. Savelkoul, et al. 2013. The mucosal factors retinoic acid and TGF- β 1 induce phenotypically and functionally distinct dendritic cell types. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 162: 225–236.
51. He, B., W. Xu, P. A. Santini, et al. 2007. Intestinal Bacteria Trigger T Cell-Independent Immunoglobulin A2 Class Switching by Inducing Epithelial-Cell Secretion of the Cytokine APRIL. *Immunity* 26: 812–826.
52. Ehrhardt, R. O., W. Strober, and G. R. Harriman. 1992. Effect of transforming growth factor (TGF)-beta 1 on IgA isotype expression. TGF-beta 1 induces a small increase in sIgA+ B cells regardless of the method of B cell activation. *J. Immunol.* 148: 3830–6.
53. Seo, G.-Y., Y.-S. Jang, H.-A. Kim, et al. 2013. Retinoic acid, acting as a highly specific IgA isotype switch factor, cooperates with TGF- β 1 to enhance the overall IgA response. *J. Leukoc. Biol.* 94: 325–335.
54. Waldecker, M., T. Kautenburger, H. Daumann, et al. 2008. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J. Nutr. Biochem.* 19: 587–593.

55. Crago, S. S., W. H. Kutteh, I. Moro, et al. 1984. *Distribution of IgA1-, IgA2-, and J chain-containing cells in human tissues.*,.
56. Hansen, I. S., D. L. P. Baeten, and J. den Dunnen. 2019. The inflammatory function of human IgA. *Cell. Mol. Life Sci.* 76: 1041–1055.
57. Alerts, E. 2018. Different subclass distribution of IgA-producing cells in human lymphoid organs and various secretory tissues . Why The JI? Submit online . • No Triage ! Every submission reviewed by practicing scientists • Fast Publication ! 4 weeks from acceptance to p. .
58. Yamada, T., S. Hino, H. Iijima, et al. 2019. Mucin O-glycans facilitate symbiosynthesis to maintain gut immune homeostasis. *EBioMedicine* 48: 513–525.
59. Kim, J. K., S. Y. Shin, J. S. Moon, et al. 2015. Isolation of dextran-hydrolyzing intestinal bacteria and characterization of their dextranolytic activities. *Biopolymers* 103: 321–327.
60. Park, S. R., H. A. Kim, S. K. Chun, et al. 2005. Mechanisms underlying the effects of LPS and activation-induced cytidine deaminase on IgA isotype expression. *Mol. Cells* 19: 445–451.
61. Chen, Q., and A. C. Ross. 2005. Vitamin A and immune function: Retinoic acid modulates population dynamics in antigen receptor and CD38-stimulated splenic B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 14142–14149.
62. Ohira, H., W. Tsutsui, and Y. Fujioka. 2017. Are Short Chain Fatty Acids in Gut Microbiota Defensive Players for Inflammation and Atherosclerosis? *J. Atheroscler. Thromb.* 24: 660–672.
63. Tan, J., C. McKenzie, P. J. Vuillermin, et al. 2016. Dietary Fiber and Bacterial SCFA Enhance Oral Tolerance and Protect against Food Allergy through Diverse Cellular Pathways. *Cell Rep.* 15: 2809–2824.

謝辞

本研究を進めるにあたり、研究全般に渡って直接御指導を賜りました慶應義塾大学 薬学部 長谷耕二教授、高橋大輔助教に心から感謝いたします。

本研究を行うに際して有益なる御助言と御指導を賜りました慶應義塾大学薬学部 金倫基教授、木村俊介准教授に深く感謝いたします。

本研究をともに推進し、多大なご協力を賜りました Francis Crick Institute 尾畑佑樹博士、慶應義塾大学薬学部 中村有考特任助教、飯塚啓人様、前田晋太郎様に深く感謝いたします。

本研究を行うに際して解析に多大な御協力を賜りました君塚達希様、服部航也様に深く感謝いたします。

本研究に御協力下さいました静岡大学の森田達也教授、東京大学医科学研究所の清野宏教授、東京農工大学の木村郁夫教授、Max Planck Institute の Stefan Offermanns 教授、東京医科歯科大学の安達貴弘准教授、山梨大学の中尾篤人教授、慶應義塾大学薬学部 藤村由美子様、永井基慈様、小林信英様、村山竣様、滝澤慧様、宮本佑様に深く感謝いたします。

マウスの管理・飼育に御協力下さいました慶應義塾大学薬学部動物管理室の皆様に深く感謝いたします。

私を支えてくれた家族に深く感謝いたします。

本研究の一部は慶應義塾大学博士課程学生研究支援プログラムから補助して頂きました。慶應義塾大学博士課程学生研究支援プログラムに深く感謝いたします。