

博士学位論文 2023 年度

パイエル板における共生細菌を介した
濾胞性ヘルパーT 細胞誘導機構の解明

【要約版】

慶應義塾大学大学院薬学研究科

服部 きさら

緒言

ヒトの腸内には約 40 兆個もの腸内細菌が生息している。そのため腸管には小腸のパイエル板を中心に体内で最大の免疫系が構築され、宿主との共生関係を保っている。分泌型 immunoglobulin (Ig) A は粘膜免疫応答の中心を担い、毒素の中和や病原体の上皮細胞への接着や侵入の防御により、病原体から宿主を守る重要な免疫グロブリンである。濾胞性ヘルパーT (T follicular helper: Tfh) 細胞は、小腸のパイエル板に多く存在し、胚中心 (germinal center: GC) 反応を促進することで高親和性 IgA の産生を誘導することで腸管の恒常性維持に貢献する。Tfh 細胞の分化誘導には腸内細菌が寄与し、特に小腸遠位部の回腸に定着する セグメント細菌 (Segmented filamentous bacteria: SFB) は、マウスの小腸遠位部パイエル板において Tfh 細胞分化を誘導する。一方で SFB はヒト腸管には存在せず、SFB 以外の誘導菌の存在が想定されている。また小腸近位部における Tfh 細胞誘導因子についても明らかになっていない。そこで本研究は、小腸近位部及び遠位部のそれぞれについて、Tfh 細胞誘導因子の探索を行った。第一部では、糖尿病治療薬の一種である α -グルコシダーゼ阻害薬 (α -glucosidase inhibitor: α -GI) が小腸近位パイエル板における Tfh 細胞の分化誘導に及ぼす影響について検討し、第二部では小腸遠位パイエル板において Tfh 細胞の分化誘導を担う食事因子及び腸内細菌の同定を試みた。

第一部 α -グルコシダーゼ阻害薬による小腸近位パイエル板濾胞性ヘルパーT 細胞誘導機構の解明

1-1. 背景

α -グルコシダーゼは、オリゴ糖や多糖の非還元末端にある α -(1 $\rightarrow$ 4)-グリコシド結合の切断を触媒し、小腸上皮が吸収できる単糖を放出する酵素ファミリーである。 α -GI は糖尿病治療薬の一種であり、 α -グルコシダーゼの酵素活性を阻害することにより、単糖の吸収を遅延させ、2 型糖尿病患者の食後グルコースレベルの上昇を低下させる。 α -GI は小腸からの糖質の吸収を阻害するため、腸内細菌による資化が可能な糖質を増加させ、腸内細菌叢の組成を変化させる。このような腸内細菌叢の変化が、パイエル板の Tfh 細胞の分化および、T 細胞依存的な IgA 産生に影響を及ぼす可能性があるのではないかと考えた。そこで第一部では、パイエル板の IgA 応答における α -GI の影響を調べることを目的とした。

1-2. 方法

離乳直後の 3 週齢のマウスに α -GI (アカルボースまたはボグリボース) を飲水投与し、対照群には RO 水を飲水させた。4 週間後に解剖し、パイエル板を近位部と遠位部に分けて採取してフローサイトメトリーによる解析を行った。なお小腸を三分割し、胃側を近位部、盲腸側を遠位部とした。糞便中 IgA 濃度は ELISA により測定し、小腸内容物から 16S リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子解析を用いて腸内細菌叢解析を

行った。SFB の定量には小腸遠位内容物を用い、定量 PCR により測定した。さらに、3 週齢のマウスに 2 週間ボグリボースを投与したのち、破傷風トキシノイドの C フラグメント (Tetanus toxoid fragment C: ToxC) を発現する組換えサルモネラワクチン株 (r*Salmonella*-ToxC) を経口感染させ、糞便中の感染 2 週間後の破傷風トキシノイド (Tetanus toxoid : TT) 特異的 IgA の測定を行った。

1-3. 結果及び考察

① α -GI は小腸近位部パイエル板における Tfh 細胞と GCB 細胞を増加させ、IgA 応答を増強した

離乳期のマウスに α -GI であるアカルボースまたはボグリボースを 4 週間飲水投与し、小腸近位及び遠位パイエル板の Tfh 細胞を解析したところ、 α -GI 投与群では小腸遠位パイエル板と比較して特に小腸近位パイエル板において、Tfh 細胞と GCB 細胞の割合と数がともに増加し、その効果はボグリボース投与群で特に顕著であった。同様に、糞便中の分泌型 IgA 量もボグリボース投与群で、対照群及びアカルボース投与群と比較して有意に増加した。これらの結果から、ボグリボースは、特に小腸近位部において、Tfh-GCB 細胞応答を誘導することにより、IgA 産生を増強することが示唆された。

② ボグリボースは小腸の腸内細菌叢組成を変化させた

ボグリボース投与マウスの小腸内容物を用いて 16S rRNA 遺伝子解析を行ったところ、ボグリボースの投与は小腸近位部及び遠位部の腸内細菌叢を変化させ、特に近位部では *Bifidobacteriaceae* 科、*Erysipelotrichaceae* 科、*Akkermansiaceae* 科細菌が対照群と比較して増加した。

③ ボグリボースは共生細菌依存的に Tfh 細胞応答を増強した

ボグリボースの飲水投与が腸内細菌叢を変化させたことから、ボグリボースによる Tfh 細胞応答が腸内細菌叢に依存しているかどうかを検討した。まずマウスにおけるパイエル板 Tfh 細胞誘導菌として知られる SFB を定量したところ、対照群及びボグリボース投与群の両群で検出限界以下であった。従って、ボグリボースによる Tfh-GCB 細胞応答の増強は SFB の定着とは無関係であると考えられた。次に、SFB 以外の腸内細菌の寄与を調べるために、マウスに抗菌剤のカクテルを飲水投与することで腸内細菌を除去した。抗菌剤による腸内細菌の除去は、ボグリボースによる Tfh 細胞の誘導効果を無効化した。ボグリボース投与群における糞便中の分泌型 IgA 濃度は抗菌剤投与によって有意に低下した。よって、ボグリボースは腸内細菌依存的にパイエル板における Tfh 細胞応答を増強していると考えられた。

④ ボグリボースによる Tfh 細胞応答の増強は単糖の補給ではキャンセルされなかった

次に、 α -GI 活性による小腸上皮からの単糖の吸収阻害が、ボグリボースによる Tfh-GCB 細胞応答の増強に寄与するか検証するため、AIN-93G に炭水化物源として含まれるスクロースをグルコースに置換した。その結果、ボグリボース投与は、通常の AIN-93G 摂食群だけでなく、D(+)-グルコース置換 AIN-93G 摂食群の小腸近位パイエル板においても Tfh 細胞を増加させ、糞便中の 分泌型 IgA 濃度も、糖源にかかわらず、ボグリボース投与群で対照群より有意に高かった。この結果から、ボグリボースはその α -GI 活性とは無関係に Tfh 細胞、GCB 細胞の増加および IgA 応答の増大を引き起こすことが示唆された。

⑤ ボグリボースはサルモネラ菌特異的 IgA 産生を促進した

次に、ボグリボースの投与が抗原特異的 IgA 応答を促進するかどうかを調べるために、r*Salmonella*-ToxC を用いた経口感染実験を行った。その結果、ボグリボースを投与したマウスでは、TT 異的糞便中 IgA のレベルが対照マウスに比べて 約 7.3 倍増加した。この結果から、ボグリボースの投与は腸内の共生細菌特異的 IgA を増加させるだけでなく、サルモネラ菌特異的 IgA の産生も促進することがわかった。

これらの知見は、 α -GI がパイエル板の Tfh-GCB 細胞応答を刺激することによって抗原特異的 IgA 応答を増強することを初めて明らかにし、粘膜ワクチンを増強するアジュバントとしての治療応用の可能性を示唆するものである。

第二部 小腸遠位パイエル板濾胞性ヘルパーT 細胞の誘導を担う食事因子及び新規共生細菌の探索

2-1. 背景

Tfh 細胞の分化誘導には腸内細菌が必要であり、特にマウスの腸内細菌である SFB は小腸下部パイエル板において強力に Tfh 細胞数を増加させる。一方で本菌はヒトには存在しない。しかしヒトのパイエル板にも多数の Tfh 細胞が恒常的に存在する事実を踏まえると、SFB 以外の Tfh 分化誘導因子が存在すると予想される。そこで手段として着目したのが食事である。食事は腸内細菌の重要な修飾因子であり、実際に離乳期に固形食の摂食とともに腸内細菌叢が成熟を始める。従って第二部では、異なるタイプの食餌を与え、異なる細菌叢をもつマウスを作成することで、Tfh 細胞の分化誘導を行う腸内細菌叢の探索を行った。

2-2. 方法

3 週齢のマウスに非精製飼料 CE-2、精製飼料 AIN-93G または各種 CE-2 原材料または特定の成分を添加した AIN-93G を給餌した。4 週間後に解剖し、小腸パイエル板を近位部と遠位部に分けて採取してフローサイトメトリー解析を行った。糞便中 IgA 濃度は ELISA により測定し、菌叢解析は 16S rRNA 遺伝子解析法により行った。SFB の存在量は定量 PCR により測定した。ノトバイオートマウスを作製するため、候補細

菌を無菌マウスに 1×10^9 - 1×10^{10} CFU 経口投与し、定着 2 週間後にパイエル板免疫細胞と糞便中 IgA を上記と同様に解析した。メカニズム解明のため Tfh ハイブリドーマを作成し、細菌抗原及び骨髓由来樹状細胞(bone marrow-derived dendritic cell: BMDC)と共培養することで T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) の抗原細菌の同定を行った。さらに、BMDC を候補細菌で刺激し、上清中のサイトカイン濃度を測定した。IgA の機能解析のため、ノトバイオートマウスから B 細胞ハイブリドーマを作成し、上清中の IgA と各細菌の結合性を ELISA により評価した。野生型強毒株である *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) χ 3181 は 8 週齢のマウス 1 匹あたり 1×10^6 CFU を経口感染させ、AIN-93G または大豆粉添加 AIN-93G を給餌して致死率を観察した。

2-3. 結果及び考察

① AIN-93G 摂食群ではパイエル板 Tfh 細胞数が減少した

離乳期のマウスに非精製飼料 CE-2 及び精製飼料 AIN-93G を摂食させ、パイエル板の Tfh 細胞を解析した。その結果 AIN-93G 摂食群では CE-2 摂食群と比較して顕著に Tfh 細胞や GCB 細胞が割合、数ともに減少し、糞便中 IgA 量も AIN-93G 摂食群では CE-2 摂食群の 1/3 程度にまで減少した。また AIN-93G 摂食群における Tfh 細胞や GCB 細胞の減少は小腸近位部と比較して、小腸遠位パイエル板で顕著であった。

② 大豆粉添加 AIN-93G 摂食によりパイエル板 Tfh 細胞数が回復した

次に CE-2 に含有される原材料のうち、小腸遠位パイエル板 Tfh 細胞数の維持に寄与する原材料を探索したところ、AIN-93G に大豆粉を添加した群で CE-2 摂食群と同程度にまで Tfh 細胞や GCB 細胞の割合と数、糞便中 IgA 量が回復した。Tfh 細胞誘導細菌として唯一知られる SFB は、CE-2 摂食群でのみ検出され、AIN-93G 摂食群や大豆粉添加 AIN-93G 摂食群では検出されなかった。以上の結果から大豆粉が SFB 非依存的に Tfh 細胞の分化誘導を行うことが示唆された。

③ 大豆粉添加 AIN-93G によるパイエル板 Tfh 細胞誘導には特定の腸内細菌が寄与した

大豆粉の摂食による Tfh 細胞の増加への腸内細菌叢の寄与を検証するために、スペクトラムの異なる 3 種類の抗菌剤（バンコマイシン、ストレプトマイシン、エリスロマイシン）をそれぞれ飲水投与した。その結果、どの抗菌剤投与群でも大豆粉添加 AIN-93G によるパイエル板 Tfh 細胞誘導がキャンセルされた。そこで、抗菌剤への感受性や大豆粉添加 AIN-93G 摂食群で特徴的に増加している腸内細菌を統合的に解析した結果、*Muribaculum intestinale* と *Lactobacillus reuteri* を Tfh 細胞誘導細菌の候補とした。

④ *M. intestinale* と *L. reuteri* は協働して Tfh-GCB 細胞応答を増強した

M. intestinale 及び *L. reuteri* それぞれの単菌、両菌を定着させたノトバイオートマウスを作出した。細菌を定着させた2週間後にパリエル板 Tfh 細胞及び糞便中 IgA 量を測定したところ、これら2菌を無菌マウスに定着させたノトバイオートマウスのパリエル板では、無菌マウスと比較して Tfh 細胞が数、割合ともに増加し、糞便中 IgA 量も増加した (図 4A, B)。特に糞便中 IgA 量は、*M. intestinale* と *L. reuteri* それぞれ単菌のノトバイオートマウスと比較しても2菌のノトバイオートマウスで有意に高い値を示したことから、この2菌が協働して Tfh-GCB 細胞応答を増強していることが示唆された。

⑤ *L. reuteri* は TCR 抗原、*M. intestinale* はアジュバントとして Tfh 細胞誘導に寄与した

次にそのメカニズム解明のため、大豆粉添加 AIN-93G 摂食群のパリエル板 Tfh 細胞由来の TCR 受け継いだハイブリドーマを作成し、TCR の抗原となる細菌を探索した。その結果、ハイブリドーマは *M. intestinale* ではなく *L. reuteri* に反応し、大豆粉添加 AIN-93G 摂食群では *L. reuteri* が抗原として認識され Tfh 細胞への分化が誘導されていることがわかった。また BMDC を細菌で刺激し、そのサイトカイン産生量を比較したところ、*M. intestinale* で刺激した BMDC では *L. reuteri* で刺激した群と比較して顕著に IL-6 や IL-1 β の産生量が増加した。これらはマウスにおいて Tfh 細胞の分化を促進することが知られるサイトカインであり、*M. intestinale* は樹状細胞からの IL-6 や IL-1 β 産生を促進することで Tfh 細胞分化を促す可能性が考えられた。

⑥ 大豆粉添加 AIN-93G 摂食により多応答性 IgA クローンが誘導されるとともに、*S. Typhimurium* 感染に対して抵抗性を獲得した

最後に大豆粉添加 AIN-93G 摂食群で増加した IgA の機能を検証するため、抗原となると考えられる *L. reuteri* に特異的な IgA クローンを取得した。これらの IgA クローンといくつかの細菌との結合実験を行ったところ、いくつかのクローンが *L. reuteri* に高親和性でありながら、*S. Typhimurium* を含むいくつかの細菌にも低親和性ながら結合能を持つことがわかった。さらに、大豆粉添加 AIN-93G 摂食群は AIN-93G 摂食群と比較して *S. Typhimurium* 強毒株の感染に抵抗性を示したことから、*L. reuteri* に特異的な IgA クローンが *S. Typhimurium* にも弱い結合性を示すことで感染抵抗性の獲得に繋がったと考えた。

これら全ての結果から、CE-2 に含まれる大豆粉の摂食は *L. reuteri* や *M. intestinale* の定着を促進し、*L. reuteri* が抗原、*M. intestinale* がアジュバントとして働くことで Tfh-GCB 細胞応答を増強することが示唆された。さらに、このようにして T 細胞依存的に産生された細菌特異的 IgA は抗原となる細菌以外にも応答する多応答性を有し、宿主の粘膜免疫を高めていると考えられる。