

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04732

研究課題名(和文) 腸管IgA抗体による腸内細菌選別機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of intestinal microbiota regulation by intestinal IgA

研究代表者

新藏 礼子(Shinkura, Reiko)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：50362471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物の消化器内では、宿主と腸内細菌の共生関係を維持するために宿主による細菌の取捨選択が行われており、その過程に腸管より分泌されるIgA抗体が重要である。私たちはその選択の鍵となる細菌の分子Serine hydroxymethyltransferase (SHMT)を同定し、そのエピトープ配列の違いを識別してIgA抗体は細菌を選別していることを示した。IgA抗体はSHMTのエピトープを認識し結合することで大腸菌の増殖を抑制した。IgA抗体は宿主に好ましくない細菌群を識別してその増殖を抑制し、宿主を利する細菌群の増殖を妨げないことで、細菌叢全体の多様性とバランスを維持していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Immunoglobulin A (IgA) is the main antibody isotype secreted into the intestinal lumen. IgA plays a critical role in the defense against pathogens and in the maintenance of intestinal homeostasis through gut microbial control. Our main question is what kind of bacterial molecule intestinal high-affinity IgA recognizes and targets. To address this question, we generated hybridomas from IgA producing cells in the small intestine of wild type mice. We selected W27 IgA that binds to multiple bacteria but not beneficial ones such as *Lactobacillus casei*. Via specific recognition of an epitope in serine hydroxymethyltransferase (SHMT), a bacterial metabolic enzyme, W27 IgA selectively inhibited the in vitro growth of *Escherichia coli* (*E. coli*), while having no effect on unbound beneficial bacteria such as *L. casei*. It indicates that W27 IgA has an ability to improve the intestinal environment.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：粘膜免疫 抗体 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の消化器内では、多種多様な細菌の中から宿主に不利益な悪玉菌は排除され、利益となる善玉菌が残され宿主との共生関係が保持される。こうした宿主による細菌の取捨選択過程に腸管より分泌される IgA 抗体が重要で、その選択の鍵となる細菌の分子として Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) を私たちは同定した。IgA 抗体による腸内細菌の選択機構を明らかにするには、2、に記載の3つの点を明らかにする必要があった。これらの目的のために野生型マウス由来 IgA 産生モノクローナル抗体 W27 は多種類の細菌に高い結合力を持ち、細菌由来の標的分子の解析にもっとも適していた。本研究では、W27 抗体と他の IgA 抗体との比較を行い、腸管 IgA 抗体による SHMT 認識を介した細菌制御機構の解析を行った。

2. 研究の目的

- (1)SHMT を介した IgA による腸内細菌制御分子機序の解明
- (2)SHMT は腸内細菌制御の鍵となる細菌の共通抗原であるか?
- (3)W27 抗体投与により腸内細菌叢あるいは腸内環境がどう変化するか?

3. 研究の方法

- (1)SHMT 酵素の機能解析から IgA 抗体による細菌制御機構を分子レベルで明らかにする。また W27 モノクローナル抗体を含む多くの IgA 抗体が認識する SHMT 分子内エピトープを同定し、各種細菌のエピトープの差異を IgA 抗体が選別する機序を明らかにする。
- (2)無菌マウスや T 細胞欠損マウスの腸管、およびヒト腸管から IgA 産生ハイブリドーマを樹立して、SHMT が異なる環境や種においても IgA 抗体の認識機構の鍵分子に成り得るかを検討する。
- (3)W27 モノクローナル抗体投与前後の腸内細菌叢の差異を、16S rRNA 解析とメタゲノム解析およびメタボローム解析を行うことで IgA 抗体による細菌の選択基準とそれによる腸内環境の変化を解析する。

4. 研究成果

(1)野生型マウスの腸管 IgA 産生細胞からハイブリドーマを多数作製した。その中から多種類の腸内細菌に最も高い結合力を示した W27 モノクローナル抗体を選択した。W27 抗体は大腸菌(*E. coli*)や *Pseudomonas fulva* など Proteobacteria には強く結合したが、*Lactobacillus casei* (*L. casei*) や *Bifidobacterium bifidum* のようないわゆる善玉菌には結合しないように細菌を識別する抗体であることがわかった。質量分析によ

り私たちは W27 が認識する大腸菌の抗原分子が serine hydroxymethyltransferase (SHMT) という代謝酵素であることを同定した。*Bifidobacterium bifidum* など数少ない細菌には SHMT をコードする *glyA* 遺伝子が存在しないが、ほとんどの細菌は *glyA* 遺伝子を持ち、W27 抗体が結合しない *L. casei* も *glyA* 遺伝子を持つ。どのように W27 抗体が細菌を識別するのかを明らかにするためにエピトープ解析を行い、SHMT の N 末配列をエピトープとして特定した。表 1 に示すように、*E. coli* の SHMT の N 末 27-30 番を囲むアミノ酸(RQ-XXXX-ELIASEN)は異なる種間で非常によく保存されており、W27 抗体は SHMT の N 末配列 XXXX が EEHI である時だけ SHMT タンパクを認識した(表 1)。*L. casei* のエピトープ部位のアミノ酸配列は EHNI であり 2つのアミノ酸のみが *E. coli* の SHMT エピトープ部位と異なっているが、この差異を IgA 抗体は明確に区別した(発表論文 4)。

表 1 SHMT N末エピトープアミノ酸配列とW27抗体の反応
(下半分はデータベースより抽出したEEHI配列をエピトープ部位に共有する細菌)

	SHMT N末アミノ酸配列			W27による認識
<i>Escherichia coli</i>	25-RQ	EEHI	ELIASEN	+
<i>Pseudomonas fulva</i>	25-RQ	EEHI	ELIASEN	+
<i>Staphylococcus lentus</i>	21-RQ	NNNI	ELIASEN	-
<i>Lactobacillus casei</i>	20-RQ	EHNI	ELIASEN	-
<i>Blautia coccoides</i>	24-RQ	NSHI	ELIASEN	-
Human	42-RQ	RVGL	ELIASEN	-
Mouse	37-RQ	RVGL	ELIASEN	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	25-RQ	EEHI	ELIASEN	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25-RQ	EEHI	ELIASEN	
<i>Legionella pneumophila</i>	25-RQ	EEHI	ELIASEN	
<i>Salmonella paratyphi A</i>	25-RQ	EEHI	ELIASEN	
<i>Salmonella typhimurium</i>	25-RQ	EEHI	ELIASEN	
<i>Shigella flexneri</i>	25-RQ	EEHI	ELIASEN	
<i>Yersinia pestis</i> bv. <i>Antique</i>	25-RQ	EEHI	ELIASEN	
<i>Burkholderia mallei</i>	25-RQ	EEHI	ELIASEN	

W27 以外のマウス腸管由来モノクローナル IgA 抗体 (飼育環境やストレインが異なる 6匹のマウス由来)の認識を解析したところ、調べたクローンの実に 96%が W27 と同じく、結合の強弱に差はあるものの SHMT の EEHI 配列を含むペプチドを認識した(図 1)。

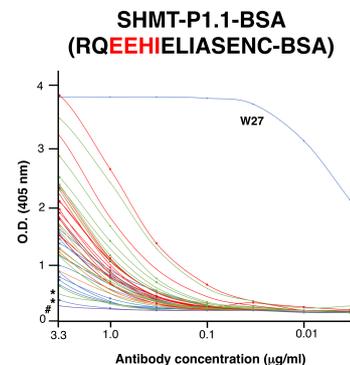


図 1 EEHI を含むペプチド(P1.1)の BSA コンジュゲートを ELISA プレートにコーティングして、系統や飼育場所が異なる計 6 匹のマウス由来の腸管 IgA 抗体を反応させた。44 クローン中 42 クローンが SHMT-P1.1 を認識したが、その中で W27 抗体の結合力は群を抜いて強かった。* SHMT-P1.1 に

このことから SHMT の N 末モチーフ内の EEHI 配列を認識する IgA 抗体が、マウス生体内で優先的に選択されていると考えられた。データベース解析により、EEHI 配列を SHMT の N 末モチーフ内に持つ細菌を列挙したところ (表 1)、ほとんどの細菌が γ -Proteobacteria に属し多くの病原菌を含むことから、EEHI 配列を認識する IgA が生体内で選択されることは生体防御の観点から合理的であると考えられた。

Bunker ら (Science. 2017;358(6361)) は、マウスから natural IgA クロウンを分離し、各抗体遺伝子の抗原結合部位塩基配列を同定しヒトキメラ IgG 抗体として樹立した。これらのクロウンは腸内細菌に対して poly-reactive に反応するが、ある特定の菌群、とくに Proteobacteria に選択的に結合することを示した。それらの poly-reactive モノクローナル抗体の一部は DNA、insulin、LPS、flagellin やインフルエンザウイルスにも交差反応性を示した。さらにこれらの natural poly-reactive IgA は無菌マウスや無抗原マウスにも存在することから、腸管の恒常性を維持するため特定の外来刺激にのみ反応するように natural poly-reactive IgA が生体内で選択される自然免疫機構があるようだと推察している。図 1 に示した各モノクローナル IgA 抗体が主に認識する分子は SHMT 以外の分子であり SHMT のエピトープには交差反応的に反応する可能性はあるが、著者らの結果は Bunker の推察と合致しており、Proteobacteria をターゲットとすることは腸管の恒常性維持に重要であることが免疫系に折り込み済みであることを示唆する。今後、W27 以外のモノクローナル IgA 抗体についてそれらの特異性を解析することが必要である。

SHMT は細胞増殖に重要な代謝酵素である。そこで、W27 抗体が大腸菌の増殖を抑制するかどうかを調べた。W27 抗体と細菌を 37 度で 3 時間反応させたのち、培地を加え細菌の増殖速度を測定した。大腸菌の増殖は W27 抗体の濃度依存的に抑制された (発表論文 4)。一方、W27 抗体がほとんど結合しない *L. casei* の増殖は抑制されず逆に抗体存在下で細菌数は若干増加した。W27 抗体は SHMT を認識することがわかっているので、SHMT 欠損 *E. coli* 株に対する W27 抗体の効果を調べた。W27 抗体は SHMT の有無とは関係なく *E. coli* に結合した。おそらく *E. coli* 表面のグリカンなどへの非特異的結合の結果と考えられたが、結合したにもかかわらず W27 抗体は SHMT 欠損 *E. coli* 株の増殖を抑制しなかった (発表論文 4)。つまり、IgA 抗体の細菌への結合だけではなく抗原分子への特異的結合が増殖抑制に必要であることがわかった。W27 抗体が結合することで大腸菌 SHMT の酵素活性を阻害するかどうか、代謝酵素である SHMT は膜タンパクではないため IgA 抗

体がどのように酵素に結合するかも今後確認する必要がある。文献的には網羅的なプロテオミクスによる報告で、SHMT は大腸菌の periplasm や outer membrane のタンパク質として列挙されており、今後の解析が必要である (Lasserre JP et al. Electrophoresis 2006; 27(16):3306)(Weiner JH and Li L. Biochem. Biophys. Acta 2008; 1778(9):1698)。

(2)無菌マウス腸管由来 IgA ハイブリドーマは 6 クロウン中 2 クロウンが大腸菌の SHMT を認識した。SHMT を認識する IgA 抗体の産生には生きた腸内細菌の存在は必要ではないことが示唆された。無菌マウスは滅菌飼料内に死菌が含まれておりこれが抗原刺激となった可能性がある。T 細胞欠損マウス腸管からは IgM ハイブリドーマのみが得られ、IgA 産生ハイブリドーマは得られなかった。得られた IgM 抗体は SHMT を認識しないだけでなく、大腸菌にも結合しなかった。SHMT を認識する IgA 抗体を産生する B 細胞は T 細胞との相互作用により生体内で選択されることが示唆された。ヒト腸管由来 IgA ハイブリドーマ (結腸がん摘出組織の一部由来) は 4 クロウン中 1 クロウンが SHMT を認識したことから、SHMT はマウスだけでなくヒトにおいても IgA 抗体が常在細菌を認識制御する際に鍵となる可能性があることが示唆された。以上の結果は、上記の Bunker らの考えを支持しており、宿主免疫系が排除すべき相手をどのように知り、いかに識別するか、を今後の研究で明らかにすべきと考える。

(3)抗体遺伝子の体細胞突然変異に障害があり高親和性抗体を産生することができない AID^{G23S} マウス (Wei M et al. Nat Immunol 2011; 12(3): 264) に多種類の腸内細菌に強い結合力を示す W27 抗体を経口投与したところ、腸管免疫系の過剰反応が抑制され、腸炎様病変も改善した (発表論文 4)。これらの変化は抗炎症作用や免疫抑制作用ではなく、W27 抗体により dysbiosis が改善されたことが原因であると考えた。そこで、W27 抗体投与前後の腸内細菌叢の変化を検討するためにメタ 16S rRNA 解析を行った。W27 抗体経口投与により、減少した細菌種は腸炎惹起菌と考えられている菌群で、一方増加したのは炎症を抑制する働きを持つ制御性 T 細胞を誘導する特定の Clostridium 属などであった。全菌叢中の割合が増加しただけではなく、特定の Clostridium 属の絶対菌数も有意に増加し、実際に大腸の制御性 T 細胞の増加も観察された (発表論文 3, 4)。これらの dysbiosis 改善作用がどのような代謝物あるいは代謝経路の変化に因るのかを検討するために、メタゲノム解析とメタボローム解析を行った。両者の解析結果から、複数の代謝経路の変化が観察されたが、dysbiosis 改善の原因を特定するには、今後さらに詳細なインフォマティクス解析を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

1. Gabrielle McDonald, Carlos O. Medina, Monika Pilichowska, John F Kearney, Reiko Shinkura, Erik Selsing, Henry H. Wortis, Tasuku Honjo, Thereza Imanishi-Kari*. Accelerated Systemic Autoimmunity in the Absence of Somatic Hypermutation in 564Igi a Mouse Model of Systemic Lupus with Knocked-in Heavy and Light Chain Genes. *Front. Immunol.* 2017, 8:Article 1757. 査読有
doi: 10.3389/fimmu.2017.01094
2. Hirotsugu Sugahara, Shinsaku Okai, Odamaki Toshitaka, Chyn Boon Wong, Kumiko Kato, Eri Mitsuyama, Jinzhong Xiao, Reiko Shinkura. Decreased taxon-specific IgA response in relation to the changes of gut microbiota composition in the elderly. *Front. Microbiol.* 2017, 8:Article 1094. 査読有
doi: 10.3389/fmicb.2017.01757.
3. Okai S, Usui F, Ohta M, Mori H, Kurokawa K, Matsumoto S, Kato T, Miyachi E, Ohno H, Shinkura R. Intestinal IgA as a modulator of the gut microbiota. *Gut Microbes.* 2017 Apr 6:1-7. 査読有
doi: 10.1080/19490976.2017.1310357.
4. Okai S, Usui F, Yokota S, Hori-I Y, Hasegawa M, Nakamura T, Kurosawa M, Okada S, Yamamoto K, Nishiyama E, Mori H, Yamada T, Kurokawa K, Matsumoto S, Nanno M, Naito T, Watanabe Y, Kato T, Miyachi E, Ohno H, Shinkura R. High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice. *Nat Microbiol.* 2016 Jul 4:1(9):16103. 査読有 doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.103

〔学会発表〕 (計 1 5 件)

1. 新藏礼子 腸内細菌叢改善のための IgA 抗体医薬 日本薬学会第138年会 微生物との飽くなき戦いと共存・有効活用による新たな創薬機構 2018
2. Reiko Shinkura High-affinity intestinal IgA as a modulator of the gut microbiota. Cytokine 2017
3. Reiko Shinkura 'Present and perspective of microbiome science in the maintenance and control of human health' Intestinal IgA as a modulator of the gut microbiota. BioJapan 2017
4. Reiko Shinkura Intestinal IgA as a modulator of the gut microbiota. Advanced

Genome Science International Symposium 'The Start of New Genomics'. 2017

他

〔図書〕 (計 1 0 件)

1. 腸管 IgA 抗体による腸内細菌制御機構 新藏礼子 *医学のあゆみ* 264(1), 46-50, 2018. 医歯薬出版株式会社
2. 腸管 IgA 抗体による腸内細菌制御のメカニズム 新藏礼子, 岡井晋作, 臼井文人 *腸内細菌学雑誌* 31, 151-157, 2017. 公益財団法人日本ビフィズス菌センター

他

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 免疫調節剤
発明者: 新藏礼子, 山本晃大
権利者: 国立大学法人
奈良先端科学技術大学院大学
種類: 特許
番号: 特願 2016-160573
(PCT/JP2017/029518)
出願年月日: 2016.8.18 (2017.8.17)
国内外の別: 国内外

○取得状況 (計 1 件)

名称: モノクローナル IgA 抗体の製造方法
発明者: 新藏礼子
権利者: 株式会社 CURED
種類: 特許
番号: 特許第 5916946 号(日本)
取得年月日: 2016.4.15
国内外の別: 国内外 (米国で成立)

〔その他〕

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/shinkuralab/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

新藏 礼子 (SHINKURA Reiko)
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
研究者番号: 5 0 3 6 2 4 7 1

(3)連携研究者

黒川 颯 (KUROKAWA Ken)
国立遺伝学研究所・生命情報研究センター・教授
研究者番号: 2 0 3 4 3 2 4 6

森 宙史 (MORI Hiroshi)
国立遺伝学研究所・生命情報研究センター・助教
研究者番号: 4 0 6 1 0 8 3 7