

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07438

研究課題名(和文) パイエル板免疫細胞による腸内細菌の調節：食品による人為的制御のための基盤的研究

研究課題名(英文) Peyer's patch immune cells regulates intestinal bacteria: basic research for the manipulation of intestinal bacteria by foods

研究代表者

橋口 昌章 (HASHIGUCHI, Masaaki)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20372443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：腸管細菌の制御は、少なくとも一部は、粘膜組織で優勢に産生されるIgAによりなされ、一方で、近年分類された自然リンパ球(ILC)により行われている。そこで、本研究では、自然リンパ球による腸内細菌の制御および腸管抗体産生応答の制御機構を検討した。その結果、パイエル板ILCはIL-22を多量に産生し、パイエル板内の細菌を制御していることを明らかにした。また、パイエル板B細胞は、これまで脾臓B細胞などへ正の制御を示していたAPRILおよびBAFFにより負に制御された。本研究により、腸管に存在するB細胞は、脾臓B細胞と異なる反応を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Anatomical containment of commensal bacteria in the intestinal mucosa is promoted by innate lymphoid cells (ILCs). We show that Peyer's patch (PP) ILCs robustly produce IL-22 in the absence of exogenous stimuli. In vivo depletion of ILCs rather than T cells altered the composition of and allowed the proliferation of bacteria in PPs. Collectively, our results show that ILCs restrain commensal bacteria in the PPs. Intestinal immunoglobulins (Igs) protect against microbes. We have investigated the roles of APRIL (TNFSF13) and BAFF (TNFSF13B) in intestinal Ig induction. PPs are, at least in part, an inductive site for Igs, including IgA. Our results demonstrate that APRIL and BAFF in vivo lowered the frequency of isotype-switched B cells in PPs. These results indicate that APRIL and BAFF paradoxically downregulate homeostatic Ig production in the intestines.

研究分野：免疫学

キーワード：パイエル板 自然リンパ球 腸内細菌 IL-22 APRIL BAFF IgA

## 1. 研究開始当初の背景

腸管には、数千の種より構成される  $10^{12}$  個もの細菌が存在し、その細菌叢は人体へ影響を与えることが報告されている。この細菌叢は各人で異なっており、肉食・菜食中心などの食生活が影響していることが知られている。また、非常に多くの細菌が腸内に存在する一方で、これらの局在は腸管に制限されており、腸管以外へ漏出することは皆無である。これは、リンパ球の一種であり、最近、カテゴリズされた自然リンパ球 (innate lymphoid cell; ILC) によって担われていることが報告されている。自然リンパ球は3つのグループに分類され、このうち腸管内細菌の局在はグループ3 ILC より制御されることが知られている。

腸管での免疫器官の1つとして知られるパイエル板は、腸管での免疫応答の誘導部位として極めて重要な役割を果たすことが知られている。パイエル板の管腔側にはM細胞と呼ばれる細胞が存在し、タンパク質などの比較的小さい分子を取り込むだけでなく、ウイルスや細菌なども積極的に取り込んでおり、パイエル板内部にも細菌が存在することが知られている。これらは、Proteobacteria 門を主としてある程度限局した種により占有される。その中でも *Alcaligenes* 属が主であり、パイエル板内に、これらに対する抗体を産生するB細胞が存在することも明らかとなっている。

一方、一部の腸内細菌はIgAにより被膜され、IgAが細菌の機能を制御していることが知られている。腸管での抗体産生応答の誘導部位と考えられているパイエル板においてはB細胞全体ではIgMが主であるが、IgAをはじめとするクラススイッチした細胞の頻度が脾臓B細胞と比して高い。

## 2. 研究の目的

腸内細菌の制御を将来的な目的とし、そのために、細菌等の侵入口と考えられているパイエル板細胞による細菌制御機構を明らかにすることを目的とした。

他の組織と同様に、パイエル板にも様々なタイプのILCが存在し、その一部はIL-22を多量に産生する。IL-22は上皮細胞に作用し、抗菌タンパク質の産生を誘導することが知られている。そこで、パイエル板において、ILCがパイエル板内に存在する細菌を制御するかどうかを明らかにすることを目的とした。

一方で、前述のように細菌は少なくとも一部はIgA抗体により活動が制限されている。IgAをはじめとする抗体産生応答は少なくとも一部はパイエル板において誘導されていると考えられ、その機序は複雑で巧妙に制御されている。TNFSFに属すTNFSF13/APRILおよびTNFSF13b/BAFFは抗体産生応答を亢進することが知られている。そこで、これらのサイトカインがIgAをはじめとする抗体産生応答に与える影響を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞および小腸内容物・糞中可溶性分画調製

パイエル板細胞および脾臓細胞はコラーゲナーゼを用いて組織より分散し調製した。小腸内容物および糞中可溶性分画はそれぞれ0.1gに対してPBS 1mlを加え懸濁し、遠心により固形物を除いて調製した。

### (2) ELISA およびフローサイトメトリー

アイソタイプ特異的ELISAは標準的な方法により測定した。

各アイソタイプ陽性B細胞および活性化マーカーは特異的蛍光色素標識抗体を用いてフローサイトメトリーにより測定した。

細胞内サイトカイン産生は、パラホルムアルデヒドを用いて固定したのち、0.1%サポニンを用いて膜透過性を上昇させサイトカイン特異的抗体を用いてフローサイトメトリーにより観察した。

特定の細胞は、フローサイトメトリーを用いたセルソーティングにより分取した。

### (3) 定量 RT-PCR

各細胞より標準的な方法でtotal RNAを調製し、oligo dTを用いて逆転写し、cDNAを得た。それをテンプレートとして、SYBR Green Iを用いた定量PCRを行なった。内部標準としてActbもしくはHprtを用い、実際の発現量は内部標準との比により算出した。

### (4) 16S rRNA analysis

パイエル板内の細菌叢の解析は、B6マウスパイエル板よりDNAを調製し、これより、16S領域を細菌共通のプライマーを用いてPCRにて増幅し、これをTAクローニング後、プラスミドを調製し、DNAシーケンシングにて種属を決定した。

### (5) Fc 融合タンパク質の調製

マウスTACI細胞外領域とヒトIgG1 Fc部の融合タンパク質はPCRにより当該領域を増幅し、ベクター上で連結した。これをNS-1ミエローマに遺伝子導入し、安定発現株を得て、その培養上清よりProtein Gカラムを用いて精製した。

### (6) In vivo 処理

抗体およびFc融合タンパク質は3-4日に1回腹腔内に4-5回投与することで行った。

## 4. 研究成果

### (1) パイエル板 ILC は IL-22 を高産生する

ILCの組織ごとの特性を検討するために、まず、さまざまな組織より細胞を調製し、刺激後のILCのサイトカイン産生を検討した。その結果、小腸粘膜固有層およびパイエル板においてIL-22の産生が認められた。パイエル板ILCのIL-22の産生は非刺激でも認められ、in vivoにおいて恒常的に活性化されてい

ることが示唆された。

この IL-22 産生は、抗生物質を投与したマウスでは低下したことから、腸内細菌により誘導されていることが示唆された。また、*in vitro*において、抗 IL-2 抗体と抗 IL-23 抗体の両方を添加した場合に産生低下が認められ、IL-2 もしくは IL-23 により誘導されていることが示唆された。実際、これらの細胞は IL-2R と IL-23R を発現していた。

(2) パイエル板 ILC は抗菌タンパク質の発現を誘導し、細菌を制御している

パイエル板 ILC は IL-22 を産生することから、上皮細胞の抗菌タンパク質産生を制御することが考えられた。そこで、パイエル板 ILC を単離し、小腸上皮細胞と混合培養したところ、抗菌タンパク質の RegIIIβ および γ の発現を上昇させた。さらに、*in vivo*において ILC を抗 CD90 抗体により除去したところ、パイエル板内において、Proteobacteria へは影響が認められなかったが、Bacteroides および Firmicutes が増加しており (図 1)、パイエル板 ILC が細菌を制御していることが示唆された。

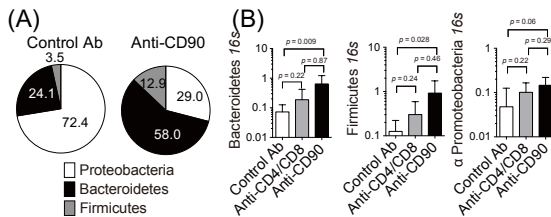


図 1 ILC 除去によりパイエル板内細菌が増加する。

(3) パイエル板 B 細胞は APRIL および BAFF に対して脾臓 B 細胞とは異なる応答を示す

パイエル板 B 細胞は脾臓 B 細胞と比較して無刺激状態で増殖能が高く、rAPRIL もしくは rBAFF の添加で増殖は亢進した。これらの結果より、これらサイトカインの受容体の発現が異なる可能性が考えられたため、受容体の発現をフローサイトメトリーにて検討した。その結果、予想に反し、受容体の発現に差は認められなかった。そこで、活性化状態が異なることが考えられ、活性化マーカーの発現を検討したところ、脾臓 B 細胞は表現型がほとんどが未感作型であったのに対し、パイエル板 B 細胞は多くが活性化型であった。これにより、活性化状態が異なるために、応答が異なることが考えられた。

(4) APRIL および BAFF は腸管での抗体産生を抑制する

次に、APRIL および BAFF が *in vivo* でも抗体産生応答に与える影響を検討した。マウスに APRIL もしくは BAFF 遺伝子導入株を増殖能を奪った後に 2 週間に 4 回投与し、パイエル板におけるそれぞれのアイソタイプ別頻度を観察した。その結果、APRIL もしくは BAFF

を発現させた両方の場合で IgG1 および IgG2b 陽性の頻度が有意に低下していた (図 2A)。そこで、APRIL および BAFF の共通の受容体である TACI をヒト IgG1 Fc 部と融合させた TACI-Fc を投与することで、APRIL および BAFF のシグナルを阻害した状態で、同様にアイソタイプ別頻度を検討した。その結果、予想されたように、TACI-Fc 投与で IgG1、IgG2b さらに IgA 陽性細胞の頻度が有意に増加した (図 2B)。さらに、小腸内の IgA 量、および、パイエル板における胚中心 B 細胞の頻度検討したところ、有意に上昇していた (図 3)。これらより、腸管では、全身性リンパ器官と異なり、APRIL および BAFF に対して異なる応答を示すことが明らかとなった。

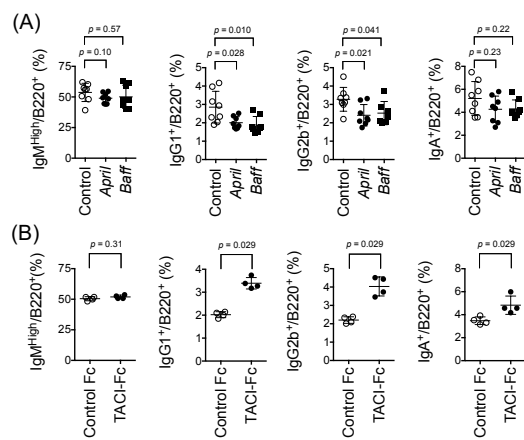


図 2 APRIL および BAFF は腸管抗体産生を抑制する

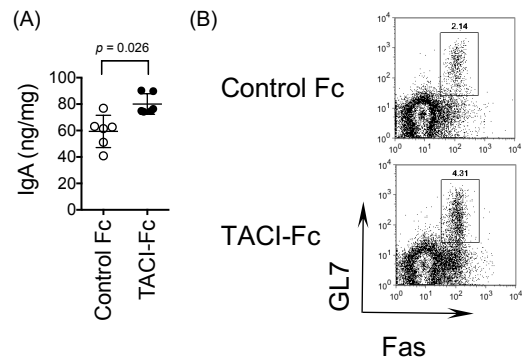


図 3 APRIL および BAFF は腸管 IgA 産生を抑制する

これらの結果は、下記に示すように学術雑誌に受理されており、評価できる。また、粘膜における免疫応答の制御を考えた場合、免疫応答を人為的に調節する基礎的な知見となりうると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Hashiguchi, M., Kashiwakura, Y., Kanno, Y., Kojima, H., Kobata, T. Tumor necrosis factor superfamily member (TNFSF) 13 (APRIL) and TNFSF13B (BAFF) downregulate homeostatic immunoglobulin production in the intestines. Cell. Immunol. 323:41-48. 2018. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.10.009.

② Hashiguchi, M., Kashiwakura, Y., Kojima, H., Kobayashi, A., Kanno, Y., Kobata, T. Peyer's patch innate lymphoid cells regulate commensal bacteria expansion. Immunol. Lett. 165:1-9. 2015. doi: 10.1016/j.imlet.2015.03.002.

[学会発表] (計 4 件)

① Hashiguchi, M., Kashiwakura, Y., Kojima, H., Kanno, Y., Kobata, T.: Tumor necrosis factor superfamily member (TNFSF) 13, APRIL and TNFSF13B, BAFF downregulate homeostatic immunoglobulin production in intestines. 第 454 回日本免疫学会総会・学術集会, 仙台, 2017 年 12 月 14 日.

② Hashiguchi, M., Kashiwakura, Y., Kojima, H., Kanno, Y., Kobata, T.: Differences in specificity and production between IgA and IgG in Peyer's patches. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会, 那覇, 2016 年 12 月 5 日.

③ Hashiguchi, M., Kobayashi, A., Kashiwakura, Y., Kojima, H., Kanno, Y., Kobata, T. Peyer's patch innate lymphoid cells regulate commensal bacteria expansion. 16th ICI meeting. Melbourne, Australia, 2016. Aug 22.

④ Hashiguchi, M., Kashiwakura, Y., Kojima, H., Kanno, Y., Kobata, T.: Peyer's patch innate lymphoid cells regulate commensal bacteria expansion. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 2015 年 11 月 20 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

橋口 昌章 (HASHIGUCHI, Masaaki)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 20372443

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

該当なし

### (4)研究協力者

小林 彩乃 (KOBAYASHI, Ayano)

田作 佑弥 (TASAKU, Yumi)