

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10087

研究課題名(和文) バクテリアソーティングを用いた母乳中IgAの新生児腸内細菌叢への関与機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of interaction between secretory IgA in the breast milk with neonatal microbiota in the gut by use of bacterial sorting

研究代表者

杉山 正彦 (Sugiyama, Masahiko)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：00270877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：健康ヒト成人ボランティア便のIgA-SEQの結果、ヒト成人では、IgA結合細菌が多い個体群、IgA結合細菌が少ない個体群、及び中間群の3群に分類する事ができた。また、IgA結合細菌とIgA非結合細菌のspecies(種)レベルでの解析では、個体間では一様ではなかったが、門(phylum)レベルの解析ではIgA結合細菌には、Firmicutes(門)が圧倒的に多い事が判明した。以上から、消化管の分泌型IgAは、ある種の腸内細菌(Firmicutes)に特異的に結合していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ヒト成人では、IgA結合細菌が多い個体群、IgA結合細菌が少ない個体群、及び中間群の3群に分類できる事が判明した。また、門(phylum)レベルの解析ではIgA結合細菌には、Firmicutes(門)が圧倒的に多い事が判明し、消化管の分泌型IgAは、ある種の腸内細菌に特異的に結合することが示唆された。消化管の分泌型IgAは宿主腸管免疫にとって極めて重要な要素のひとつであり、本研究が明らかにした、分泌型IgAがヒト腸内細菌叢を主に構成するFirmicutes(門)に多く結合する現象は、分泌型IgAが正常な腸内細菌叢の維持に重要な役割を果たしている可能性を示唆する結果である。

研究成果の概要(英文)：IgA-SEQ of the healthy human volunteer feces revealed that human microbiota was divided into three groups, IgA high-coating, middle-coating and low-coating group. In addition, the Firmicutes were much abundant division of bacteria in IgA high-coating bacteria in phylum level, whereas there were no significant differences in species level. Thus, it was suggested that secretory IgA in the intestine specifically bound to the commensal bacteria belonging to the Firmicutes.

研究分野：小児外科

キーワード：IgA-SEQ 腸内細菌 母乳 新生児

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管分泌型 IgA が、腸内細菌の病原性に深く関与していることが知られている。昨今、免疫学的解析手法の改良によって、フローサイトメトリー (FACS) と次世代シーケンサーによる解析 (16s メタ解析) を統合した IgA-SEQ が開発され、T 細胞依存的に産生される IgA がより病原性の高いバクテリアに結合し腸管免疫防御に大きな役割をはたしていることなど、腸内細菌への IgA の「結合程度」と「細菌の病原性」にはある程度の相関があることもわかってきている (Palm NW, *et al.* Cell 2014) (Bunker JJ, *et al.* immunity 2015) (Kau AL, *et al.* Sci Transl Med 2015)。これまでの研究で、腸内常在菌叢が宿主の健康、病態に大きな影響を与えることが明らかとなっているが、出生直後に無菌の母体から細菌種が無数に生息する外界に暴露される過程で形成される、正常な腸内細菌叢の形成過程の詳細は未だ明らかになっていない。本研究では、母乳中の分泌型 IgA の正常な腸内細菌叢形成への役割と関与に着目し、どのように正常な腸内細菌叢が形成されていくかの一端を分子レベルで解明することを目的としている。

2. 研究の目的

これまで、腸管分泌型 IgA が、腸内細菌の病原性に深く関与していることが多数報告されている。一方で、これまで母乳中の分泌型 IgA が出生初期の腸内環境の維持に重要であることは周知であるが、詳細なメカニズムの解明はなされていない。本研究では、出生初期の母乳投与が正常な腸内細菌叢形成に重要であることを明らかにすることを目的とし、未熟児に特有な病態として知られ一度罹患すれば生死に関わる壊死性腸炎 (NEC) の発症予防や小児の成長に重要となる未熟腸管の機能維持に対する新たな治療戦略が提起でき、少子化社会を向かえた現代社会に大きな役割を果たすことができると考える。

3. 研究の方法

申請者は IgA-SEQ を使用して、バクテリアへの分泌型 IgA の結合の程度と細菌の病原性がある程度相関することに着目し、以下の 4 点について研究を遂行する。

1) 母乳中の分泌型 IgA による腸内細菌叢形成と腸管免疫系確立への関与に関する検討

出生直後の仔マウスを通常飼育グループとヒト母乳での飼育グループ、人工乳での飼育グループの 3 グループに分け育てる。腸管内分泌型 IgA の分泌が盛んになる、生後数週間までの便または腸内容液を回収し IgA-SEQ を使って IgA が結合する細菌種の評価を行う。また、生後 2~4 週の段階で、小腸パイエル板や粘膜固有層に多数存在する免疫担当細胞を FACS や各種免疫染色等の手法で評価検討する。

2) 無菌マウスの外界適応過程における分泌型 IgA の役割に関する検討

出生後から無菌環境で育ったマウス (無菌マウス) は細菌種と共存していない個体となる。無菌状態の胎児が産産を経て外界に暴露される事を模倣して、これらの無菌マウスを外界環境にさらすと (SPF 化マウス) 半数以上が数日以内に死亡する。これら死亡した SPF 化マウスの解剖を行うと、腸管が高度な炎症状態を呈している (図 1)。また、生存し得た SPF 化マウス

でも、高度に萎縮した盲腸が認められる等、外界環境に暴露後の生存過程において、高度な炎症が腸管に生じていた事がわかる。これらの事実と臨床的背景をもとに考察すると、母乳中の分泌型 IgA が腸管内腔で病原性の高い細菌に結合することで、宿主の過剰免疫反応を抑制する可能性がある。そこで、マウス母乳、ヒト母乳を SPF 化マウスに投与して、非投与群と比較し、死亡率、IgA-SEQ での細菌 coating およびパイエル板や粘膜固有層に多数存在する免疫担当細胞を FACS や各種免疫染色等の手法で評価検討する。本研究においては、マウス母乳が十分獲得できないことが予想されるため、比較的手に入りやすいヒト母乳も使用する。マウスとヒトでは種が異なるが、それぞれの母乳中には分泌型 IgA が豊富に存在するため、IgA-SEQ による評価は可能と考える。

3) ヒト新生児の外界適応過程における分泌型 IgA の役割に関する検討

出生直後に外界に暴露されるヒト新生児の糞便を採取して IgA-SEQ を行う。可能であれば、母乳ではなく粉ミルクで育つ児の便も回収し比較検討する。生後から 1 か月の間（新生児期）で推移する腸内環境と IgA の関係をヒトの検体を用いて評価し、マウスの実験系と比較する。

4) 分泌型 IgA 高度結合細菌の病原性の検討

IgA-SEQ を用いてマウス糞便・マウス腸内溶液またはヒト糞便から菌を分離し、IgA が高度に結合する細菌を選定する。選定された特定の菌株は、各種培養条件で培養した後、実際の生体内で特定のバクテリアの関与を検証するため、無菌マウスに投与してノトバイオマウスを作製する。これらのノトバイオマウスは作製後 3~4 週間を目安にして、パイエル板や粘膜固有層に多数存在する免疫担当細胞を FACS や免疫染色等の手法で評価し、ヘルパー T 細胞のうち Th1 細胞が産生するインターフェロン γ (IFN γ) や腸管免疫の恒常性を保つ役割を担うヘルパー T 細胞 (Th17) 等の細胞を解析し、腸管免疫に影響を与えるか否かの検討を行う。

4. 研究成果

健常ヒト成人ボランティア便の IgA-SEQ の結果（図 1）、ヒト成人では、IgA 結合細菌が多い個体群、IgA 結合細菌が少ない個体群、及び中間群の 3 群に分類する事ができた（図 2）。また、IgA 結合細菌と IgA 非結合細菌の種(species)レベルでの解析では、個体間では一様ではなかったが（図 3）、門(phylum)レベルの解析では IgA 結合細菌には、Firmicutes（門）が圧倒的に多い事が判明した（図 4）。以上から、消化管の分泌型 IgA は、ある種の腸内細菌(Firmicutes)に特異的に結合していることが示唆された。

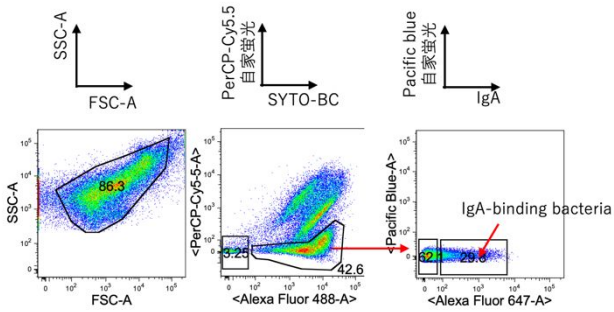


図1: IgA-SEQのgating strategy

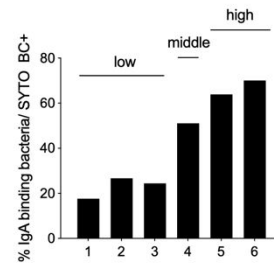


図2: 各個人のIgA結合細菌の割合

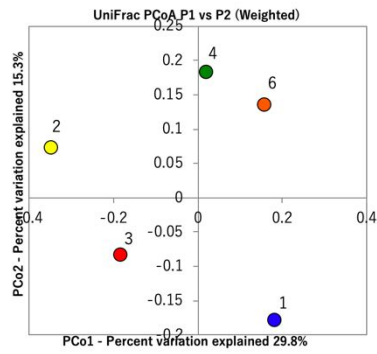


図3: IgA結合細菌の主成分分析(species)

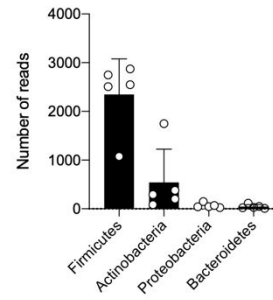


図4: IgA結合細菌のリード数(phylum)

5. 主な発表論文等

なし

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：藤代 準

ローマ字氏名：Fujishiro Jun

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：教授

研究者番号（8桁）：60528438

研究分担者氏名：新 幸二

ローマ字氏名：Atarashi Koji

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：・医学部（信濃町）

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60546787

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。