

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20H03506
研究課題名(和文) IgAによる腸内共生細菌の維持調節メカニズムの解明

研究課題名(英文) How IgA regulates gut microbial homeostasis

研究代表者

鈴木 敬一郎 (Suzuki, Keiichiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・客員研究員

研究者番号：90391995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：IgAは腸管内腔で腸内細菌叢を維持する重要な役割を担っている。そのメカニズムは不明の点が多く残されているが、我々の過去の研究ではIgAの糖鎖が重要な役割を担っている事が示唆されている。本研究で様々なIgAを比較解析した所、IgAの糖鎖は大腸内腔において腸内細菌の影響により大きく変化する事が明らかとなった。また、無菌マウスに数種類の既知の細菌種あるいは糞便細菌叢を定着させる実験を行ったところ、細菌の種類によってIgA糖鎖の分解あるいは生成に関与するものの両者が存在する事が判明した。以上より、IgA糖鎖は腸内細菌との複雑な相互作用によって調節される事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管IgAは腸内細菌を制御して腸管恒常性の維持に重要な役割を果たしているが、IgAと腸内細菌の相互作用メカニズムは複雑で多くの不明点が残されている。本研究によって、腸内細菌がIgAの糖鎖構造に大きな変化を加えている事が明らかとなり、腸内細菌が腸管液性免疫の質に重大な影響を与えている事が示唆された。今後の研究によってIgAにおける特定の糖鎖が腸内細菌の構成と機能をどのように変化させるのかを明らかにする必要がある。これらの研究によって、人為的に腸管免疫機能を変化させる方法の開発に繋がると考えられる。さらに長期的には、腸内細菌の異常が関連する炎症性腸疾患や自己免疫性疾患の治療に資すると期待される。

研究成果の概要(英文)：IgA regulates the composition and function of gut microbiota, but the mechanisms how IgA promotes such function remains unknown. Our previous works suggest that IgA-glycan plays an important role to regulate gut homeostasis. In this study, we found that the IgA-glycan profile is mainly modified in large intestinal lumen by the effect of gut microbiota. The experiments with mono or multi colonization of gut microbiota in germ free animals showed that the IgA-glycan profile is finely tuned by the effect of unique function of several bacterial species. Mathematical simulation reveals that some bacterial species degrade IgA-glycans, and others make positive impacts on IgA-glycan profile by adding specific sugar chains on IgA. Our works reveal that IgA-glycan profile is finely regulated by the effect of complex interactions between gut microbiota and IgA.

研究分野：免疫学

キーワード：IgA 糖鎖 腸内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管には 1000 種類以上の常在細菌が存在し、宿主との共生関係を築いている。この中で、ある種の腸内細菌は粘膜バリアー機能を増強させるが、別の細菌種は強い刺激を誘導して腸管炎症の原因となるものもある。従って、腸内細菌の構成を調節することが腸管恒常性を維持するためには必須であるが、その最前線で働いているのが腸管免疫組織であり、免疫グロブリン A (IgA) は生体防御機構の主役として重要な役割を担っている。IgA が常在細菌を制御するメカニズムについては最近になって複数の報告がなされており、少なくとも以下の 4 つについて報告がなされている。1. 炎症刺激が強い細菌種の異常増殖を抑制する。2. 鞭毛に結合して細菌の運動性を抑制する。3. 刺激性の強い細菌分子に結合して標的分子の遺伝子発現を抑制する。4. 生体防衛的に働く細菌種に結合し、腸管粘液への定着と細菌叢全体の代謝機能を促進する。

以上より、IgA は腸内細菌の増殖抑制と機能促進の両面を調節していると考えられている。我々の研究によると IgA の糖鎖がその調節に重要な役割を果たしていると考えられる。従って IgA の糖鎖と腸内細菌がどのような相互作用をして腸管恒常性を維持しているのかについて理解する事は、腸内共生細菌の乱れに伴う疾患、すなわち炎症性腸疾患や自己免疫疾患などの治療に資する可能性があるが、研究開始当初においては知見が得られていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腸管 IgA が腸内細菌叢の恒常性を維持するメカニズムにおいて IgA の糖鎖修飾がどのように関連するのかを明らかにする事である。糖鎖は構造的に高度な複雑系あり腸管 IgA の糖鎖構造にアプローチした研究は数が少ない。従って、生理的な腸管 IgA の糖鎖プロファイルについて解析する事が第一段階の目的である。次に、マウスへの抗生物質投与や無菌マウスへの細菌定着などによって腸内細菌叢をコントロールして腸内細菌叢と IgA 糖鎖との関連について解析する。IgA と腸内細菌の相互作用は高度な複雑系であるのでシステム生物学の導入によって理解が飛躍的に進む事が期待される。そこで、IgA の糖鎖パターンと腸内細菌について得られるデータがどの程度相関を持つのかについて機械学習に組み込んで数理的な解析を行い、IgA 糖鎖と腸内細菌の関連について包括的に理解する事を目指す。

3. 研究の方法

(1) 使用動物：

使用した動物は全て C57BL6 背景のマウスである。SPF 環境下で飼育された動物については C57BL6/J、無菌マウスについては C57BL6/N 系統のマウスを用いた。抗生物質投与については 100mg/kg のメトロニダゾールを 24 時間毎にゾンデを用いて 7 日間の経口投与を行い、同時に 0.66mg/mL のシプロフロキサシンを飲料水に混合して 7 日間の投与を行った。無菌マウスへの SPF マウスの腸内細菌の定着については、SPF マウスの糞便を PBS 中にて粉碎して直接無菌マウスに経口投与した。SFB の定着については、SFB をモノコロナイズしたマウスの糞便を経口投与した。その他の菌体については培養した菌体を 1×10^8 CFU ずつ 3% NaHCO₃/PBS に懸濁して経口投与した。全ての動物実験は理化学研究所 横浜研究所の動物実験施設において実験倫理委員会の承認のもとに行った。

(2) 腸管 IgA の糖鎖プロファイルに関する解析：

まず、簡易的に糖鎖を測定できる IgA-糖鎖-ELISA 法を確立した。プレート上に固相化した抗 IgA 抗体で生理的な腸管 IgA をキャプチャし、次にビオチン化したレクチンを用いて糖鎖成分を定量する方法である。安定的に測定可能な 9 種類のレクチンを用いてデータ解析を行った。使用したレクチン (同定できる糖鎖) は以下の通りである。SNA (SA (a 2.6) & (a 2.3) - Gal), UEA-I (a-L-fucose), AAL (Fucose-linked(a-1,6) to GlcNAc), WGA (GalNAc), DSA (GlcNAc dimer to tetramer), ConA (a-man, a-glc), ABA (O-type), DBA (a-galNAc), SBA (a-galNAc)。レクチンによる糖鎖測定と同時に IgA 量を ELISA 法にて測定し、それぞれの糖鎖量を IgA 量で補正を行い、同じ IgA 量あたりの糖鎖量を相対値にて比較検討した。

(3) IgA の抽出：

小腸・大腸内容物あるいは糞便に含まれている IgA については、内容物または糞便を計量し、その 10 倍量の PBS を加えて手動的に粉碎・混合した後に 10 分以上静置、遠心を行い上清を回収して検体として使用した。小腸・大腸組織の培養については、組織を取り出した後にコラゲナーゼを用いて単細胞に分離し、培養液中にて数日間の培養を行った。培養液を回収・遠心を行い上

清を回収して検体として使用した。小腸・大腸内容物中の IgA は腸管上皮を介して分泌されるので分泌因子が付加され、かつ腸内細菌との相互作用を経た後であるのに対して、培養上清中の IgA は形質細胞から分泌された直後であるために分泌因子が付加されておらず、かつ腸内細菌との相互作用を経していない、という違いがある。

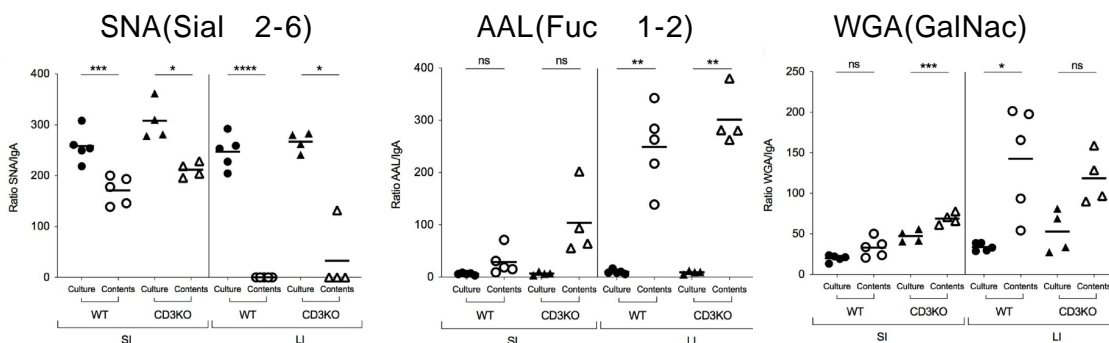
(4)腸内細菌の 16SrRNA シーケンス解析：

QUIGAN 社のキットを用いて糞便からの細菌ゲノム DNA の抽出を施行した。16SrRNA の V1-V2 領域のプライマーを用いて DNA の増幅を行い、アンプリコンを Beckman 社のキットを用いて精製した。次に、Illumina 社のキットを用いて複数のサンプルを混合したライブラリを作成し、Illumina 社の MiSeq を用いてシーケンスを行った。得られたシーケンスデータは QIIME プラットフォームを用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) IgA の糖鎖プロファイルは大腸内腔において大きく変化する

IgA の糖鎖修飾がどのように調節されるのかを理解する目的で、様々な種類の IgA を抽出し、糖鎖修飾について比較検討した。IgA の糖鎖修飾に影響を及ぼす因子として以下の 3 つの因子を想定した。1. T 細胞依存的・非依存的免疫応答経路による影響 2. IgA が腸管上皮を介して粘膜固有層から腸管内腔に分泌される事による影響(この過程で IgA には分泌因子が付加される)3. 小腸・大腸内腔で腸内細菌と反応する事による影響。これらの影響について検討する目的で以下の IgA について抽出を行った。1. 全ての IgA サンプルを野生型マウス、あるいは T 細胞欠損 (CD3 欠損) マウスから調整する 2-a. 腸管粘膜固有層の IgA 形質細胞を培養して培養液中の IgA を抽出する。この IgA には分泌因子が付加されていない。 2-b. 腸管内容物中に存在する IgA を抽出する。この IgA には分泌因子が付加されている。 3. 腸管内容物については小腸内と大腸内の内容物から IgA を抽出する。小腸と大腸の腸内細菌組成は大きく異なっているために腸内細菌の作用について比較が可能となる。これらの IgA を抽出して代表的なレクチンによるレクチン-ELISA 法を用いて糖鎖の定量測定と比較検討を行った。この結果、以下の事が判明した。1. 野生型マウスと T 細胞欠損マウスの比較において、培養上清・小腸内容物・大腸内容物の同じ調整方法を行った場合には IgA 糖鎖についての大きな差は認めない(図 1)。すなわち IgA の糖鎖は T 細胞依存的・非依存的免疫応答経路による影響を大きくは受けない。2. 培養上清と腸管内容物の比較において、IgA の糖鎖は小腸において大きな違いを認めないが大腸においては明確な差を認めている(図 1)。この結果は、少なくとも小腸においては分泌因子が付加された事による IgA 糖鎖への影響は少ない事を示している。3. 小腸と大腸の比較において、培養上清同士を比較した場合には大きな違いを認めないが内容物同士を比較した場合には有意な差を認める(図 1)。従って、IgA の糖鎖は腸管内腔に分泌された後に小腸内と大腸内で異なる調節を受けている。大腸では培養上清と内容物でも糖鎖調節が有意に異なっていた事を考え合わせると、腸管 IgA の糖鎖は大腸内腔で腸内細菌の作用によって有意な調節を受けている事が示唆される(図 1)。

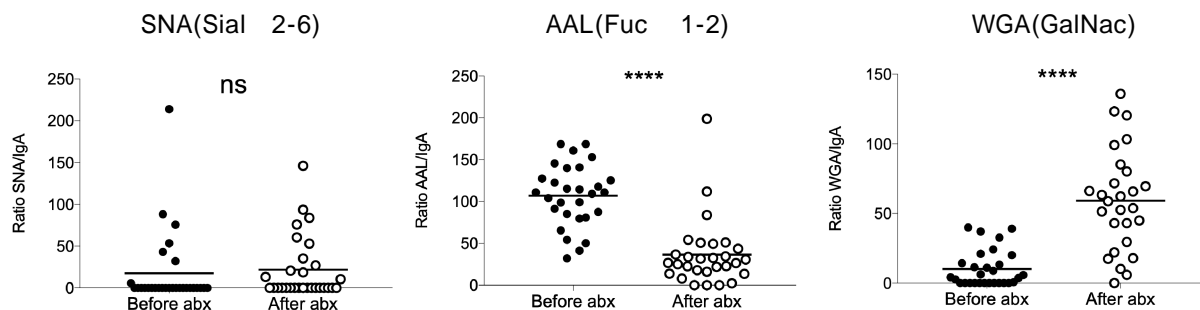


(図 1) IgA 糖鎖の定量：3 種類の代表的なレクチン(SNA、AAL、WGA)を用いて測定できる IgA 糖鎖 (Sial 2-6、Fuc 1-2、GalNac) の定量結果を示す。WT:野生型マウス CD3KO : T 細胞欠損マウス SI :小腸 LI :大腸 Culture:培養上清 Contents : 内容物

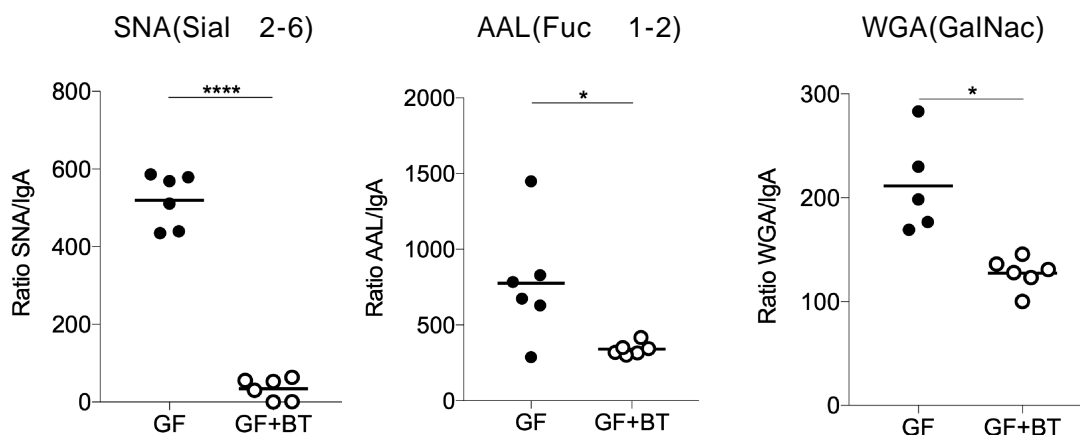
(2) IgA の糖鎖は腸内細菌によって調節を受ける

IgA の糖鎖が大腸の腸内細菌によって調節を受けるかどうか、について検討する目的で、野生型の SPF マウスに抗生物質の経口投与を行って腸内細菌を変動させる実験を行った。各マウスの糞便を収集して糞便 IgA の糖鎖を測定した所、Sial 2-6 については有意な変化を認めなかったが Fuc 1-2 と GalNac については IgA 糖鎖に有意な変化を認めた(図 2)。腸内細菌による IgA 糖鎖の調節について、さらに直接的な検討を加える目的で無菌マウスの腸管内に Bacteroides thetaiotaomicron (B.theta)をモノコロナイズする実験を行った。糞便 IgA の糖鎖を比較した所、Sial 2-6、Fuc 1-2 と GalNac の全てにおいて有意な変化を認めた(図 3)。変化のパター

ン(増加または減少)については糖鎖の種類によって抗生物質投与の場合とは異なるパターンを示した。Sial 2-6 は抗生物質投与では変化しなかったが *B. theta* のモノコロナイズでは減少、Fuc 1-2 は抗生物質投与と *B. theta* のモノコロナイズ両方で減少、GalNac については抗生物質投与で増加したが *B. theta* のモノコロナイズで減少した。以上の結果より、IgA の糖鎖は腸内細菌によって調節を受けているが、腸内細菌の種類と状態によって異なる制御を受けている事が示唆された。



(図2) SPF マウスに抗生物質(メトロニダゾールとシプロフロキサシン)を7日間経口投与した後に糞便を採取した。糞便中の IgA における糖鎖をレクチン ELISA 法にて測定した。



(図3) 無菌マウス(GF)に *B. theta* を経口投与する事によってモノコロナイズ (GF+BT) して糞便を採取した。糞便中の IgA における糖鎖をレクチン ELISA 法にて測定した。

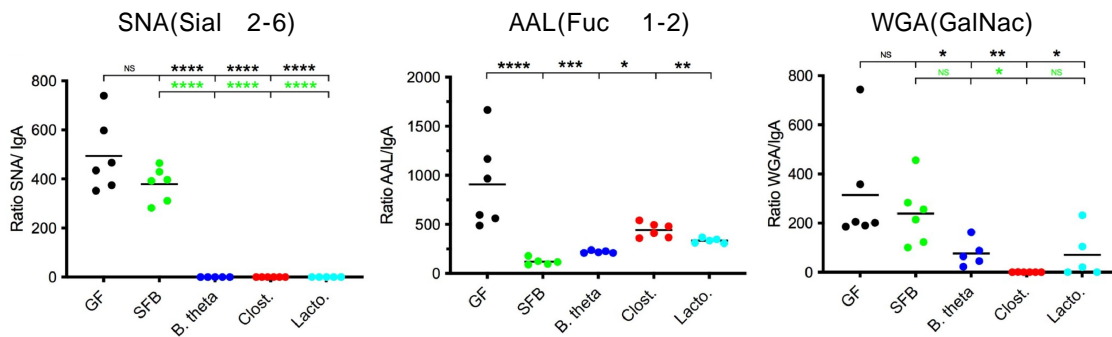
(3) IgA の糖鎖は腸内細菌の組合せによって複雑な調節を受ける

腸内細菌の組合せによって IgA の糖鎖プロファイルにどのような変化が生じるのかを理解する目的で、無菌マウスに1種類ずつ異なる細菌種を2週間毎に連続的に定着させる実験を行った(図4)。ここでは、初めに主に小腸に存在する SFB をモノコロナイズさせ、その2週間後に *B. theta* の追加定着を行った。さらに2週間毎にクロストリジウム属(4種類混合)とラクトバチルス属(3種類混合)の追加定着を行って糞便の採取を行い糞便中 IgA の糖鎖について検討を行った(図4)。



(図4) 無菌マウスへの腸内細菌の連続定着実験のスキーム

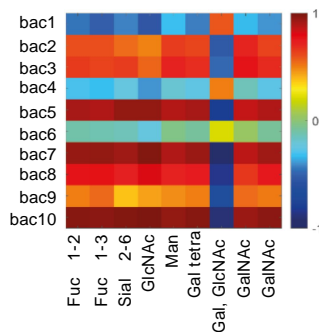
SFB の単独定着によって Fuc 1-2 を含むいくつかの糖鎖について有意な低下を認めた(図5)。次に *B. theta* を追加定着させると大部分の IgA 糖鎖について無菌マウスと比較して有意な低下を示した。続いてクロストリジウム属をさらに追加定着させた動物では Fuc 1-2 が有意な上昇を示し、最後にラクトバチルス属を追加定着させた場合には GalNac が有意な上昇を示した(図5)。従って、細菌種によって IgA 糖鎖を分解する種(SFB と *B. theta*)と糖鎖生成に寄与する種(クロストリジウム属とラクトバチルス属)が存在する事が明らかとなった。



(図 5) 無菌マウスに腸内細菌を連続定着させた実験における糞便 IgA 糖鎖のレクチン ELISA による定量。

(4) 生理的な腸内細菌叢による腸管 IgA 糖鎖の制御における数理モデルを用いた解析

生理的な条件の腸内細菌によって IgA 糖鎖がどのような調節を受けるのかを理解する目的で無菌マウスに野生型 SPF マウスの糞便を経口移植した後に経時的に糞便の採取を行った。この糞便に含まれる細菌種を 16SrRNA シーケンスにより同定すると共に IgA 糖鎖をレクチン ELISA 法により定量した。これらのデータを用いて細菌種と IgA 糖鎖の関連について検討を行った(図 6)。



(図 6) 無菌マウスへの糞便移植実験。腸内細菌種(bac1-bac10)と糖鎖の関連マトリックス

10 種類の細菌種と 9 種類の IgA 糖鎖について機械学習を用いた数理的な解析を行い、量的な相関マトリックスを作成した(図 6)。多くの細菌種については IgA 糖鎖との間に正の関連が認められた。すわわち、多くの細菌種は IgA 糖鎖を生成する方向に働いていると考えられた。図 6 において 3 種類の細菌種 (bac1, bac4, bac6) については負の相関が認められ、これらの細菌種は IgA 糖鎖を分解する方向に働いている事が示唆された。これらの結果より、生理的な条件下では IgA 糖鎖の生成と分解に関連する細菌種が混在しており、その複雑なバランスに基づいて IgA 糖鎖が制御されていると考えられた。

(5) 結論

今回の我々の研究より、腸管 IgA 糖鎖の調節には腸内細菌の働きが大きな関与を持つ事が示された。細菌種によって IgA 糖鎖の生成に関わるものと分解に関わるものが存在し、腸内細菌叢のバランスによって IgA 糖鎖の構造は大きく変化する事が理解された。過去の研究と合わせると、IgA と腸内細菌の関わりは双方向的であり、IgA 糖鎖が腸内細菌を制御する影響と腸内細菌が IgA 糖鎖を調節する影響とが高度な複雑系を構成する事によって腸管恒常性を維持していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Guzman-Bautista ER, Suzuki K, Asami S, Fagarasan S.	4. 巻 66
2. 論文標題 Bacteria-immune cells dialog and the homeostasis of the systems.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Curr Opin Immunol.	6. 最初と最後の頁 82-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.coi.2020.05.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------