

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05878

研究課題名(和文) 難消化性糖質による腸管IgA誘導の作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on intestinal IgA induction by indigestible carbohydrate

研究代表者

松本 健司 (Matsumoto, Kenji)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：60288701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：難消化性糖質による腸管IgA産生誘導について短鎖脂肪酸やT細胞の関係性からメカニズムを明らかにするために、通常マウスとT細胞が欠損したヌードマウスを用いて3種類のサンプルの効果について比較した。その結果、以下のことが明らかになった。多分岐構造を有する難消化性糖質は腸管IgA産生誘導能が高い。腸管IgAの産生誘導には短鎖脂肪酸を介さない経路が存在する。難消化性糖質による腸管IgA産生誘導はT細胞が存在しなくても起こるが、腸管以外の組織ではT細胞が必要。腸管における短鎖脂肪酸産生は全身免疫に影響を与える。難消化性糖質による腸管ムチン産生誘導には短鎖脂肪酸、IgA、T細胞は関係ない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では化学構造が類似したサンプルを含む3種類の難消化性糖質の腸管IgA産生誘導能について詳細に比較し、化学構造の類似性や腸内細菌による資化性の点(短鎖脂肪酸の増加の有無)から新しい知見を得た。特にT細胞を欠損しているヌードマウスを利用して難消化性糖質を9週間にわたり摂取させて評価した研究はこれまでに報告が無いことから学術的に重要な研究結果である。また、健康志向が世界中で広がる中、難消化性糖質は食物繊維素材として多くの商品が市場に出ている。今回の研究成果は数多くある食物繊維素材の中から消費者が自身に合う商品を選択することに役立つ結果であり、応用面からも重要である。

研究成果の概要(英文)：To investigate the mechanism of action of indigestible polysaccharides-induced IgA production in the intestine, I compared the effects of three forms of soluble dietary fiber (SDF) on the production of IgA in BALB/cAJcl and BALB/cAJcl-nu/nu mice. The findings of this study are as follows. 1. Highly branched glucose polymers have a strong ability for induction of intestinal IgA production. 2. SDF-induced intestinal IgA production has a pathway without accompanying short chain fatty acids production in the cecum. 3. The induction of IgA production by SDFs is occurred T cell-independently in the intestine, but that in the plasma, lung, and submandibular gland is T cell-dependent. 4. SCFAs generated in the large intestine might influence the systemic immune system. 5. The intestinal mucin induction does not relate the cecal SCFAs production and intestinal IgA induction.

研究分野：食品機能学

キーワード：難消化性糖質 水溶性食物繊維 腸 IgA T細胞 短鎖脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

腸管には食事を通して有害微生物や毒素といった様々な因子が侵入してくるため、バリアシステムが存在している。腸管のバリアシステムの一つである粘液中にはムチン、抗菌ペプチド、IgA が含まれている。中でも IgA は炎症反応や免疫応答が起こっていない状態でも恒常的に分泌されている抗体であり、腸管内および腸管上皮細胞において有害微生物の排除や毒素の中和を、炎症反応を伴わずに行う。また、多くの腸内細菌には IgA が結合している。無菌マウスでは IgA の分泌量が少ないことや、IgA の欠失は腸内菌叢の乱れを誘導することが明らかとなり、腸内細菌叢の制御に IgA が重要な働きをしていることが分かってきた。このように、腸管 IgA は健康増進に重要な因子であり、腸管 IgA の産生を促進する食品成分が注目を集めている。

腸管 IgA の産生を促進する食品成分として難消化性糖質があげられる。難消化性糖質が腸管 IgA の産生を促進する作用メカニズムとして、難消化性糖質が腸内細菌によって代謝されて生成する短鎖脂肪酸(主に酢酸、プロピオン酸、酪酸)が重要であることが明らかになってきた。Kim らは短鎖脂肪酸が B 細胞に作用することで B 細胞が活性化し腸管 IgA の分泌が促進されることを報告している(Cell Host & Microbe, 2016)。また、Wu らは短鎖脂肪酸の受容体である GPR43 のシグナル伝達系を介して樹状細胞が B 細胞を刺激して IgA の誘導を促進することを報告している(Mucosal Immunology, 2017)。一方、申請者は難消化性糖質の機能性として腸管 IgA の産生誘導を一つのターゲットとして研究を行ってきた。その結果、既報通り盲腸内短鎖脂肪酸の増加を伴った腸管 IgA 産生の誘導を促進するサンプルもあれば、短鎖脂肪酸の増加を伴わずに強い腸管 IgA 産生の誘導を示すサンプル、短鎖脂肪酸量が増加しているにもかかわらず腸管 IgA の産生誘導が弱いサンプルがあることが分かってきた。これらの結果は難消化性糖質による腸管 IgA 産生誘導効果は短鎖脂肪酸では説明ができないことを示しており、その解明が必要である。

上記背景として難消化性糖質による腸管 IgA 誘導の作用メカニズムの解明をテーマに研究を行うこととなった。

2. 研究の目的

腸管 IgA の発現誘導メカニズムについては大きく分けて小腸パイエル板における抗原提示を介した T 細胞依存性の経路と、腹腔内由来の B 細胞が腸管粘膜固有層に移行して樹状細胞により刺激を受ける T 細胞非依存性の経路が存在する。近年では、腸管リンパ小節内での T 細胞を介さない樹状細胞による B 細胞の活性化による経路も新たに提唱されている(Frontiers in Immunology, 2019)。一方、難消化性糖質による腸管 IgA 産生促進は「背景」に記述したとおり、腸内細菌によって代謝された短鎖脂肪酸の影響であるとされている。しかしながら、申請者のこれまでの研究では短鎖脂肪酸では説明できない腸管 IgA の産生誘導が確認されており、難消化性糖質による腸管 IgA 産生のメカニズムに関してははっきりとしていない現状がある。本研究では腸管 IgA 産生誘導能や腸内細菌による資化性(短鎖脂肪酸の産生量)が異なる 3 種類の難消化性糖質を主なサンプルとして用い、腸管 IgA 産生誘導、および腸管 IgA 産生誘導における短鎖脂肪酸と T 細胞の役割について、マウスを用いた動物実験によって研究し、難消化性糖質による腸管 IgA 産生のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) サンプルについて

本研究では資化性と腸管 IgA 産生誘導能の異なる 3 種類の難消化性糖質を主なサンプルとした。サンプル名とその特徴(予備試験で得られた結果)は以下のとおりである。IgA 産生誘導能は弱い、短鎖脂肪酸を強く誘導するフラクトオリゴ糖(FO)、IgA 産生誘導能は高い、短鎖脂肪酸を誘導しない難消化性グルカン(IG)であるフィットファイバー、IgA 産生誘導能は高く、短鎖脂肪酸を誘導するポリデキストロース(PD)。なお、IG と PD は α 、 β 結合を含む多分岐多糖という点で化学構造が類似しており、IG はすべてがグルコース単位で構成されているのに対し、PD には還元末端にソルビトールを有するものが存在している点が異なっている。

(2) IG の腸管 IgA 産生誘導能に関する研究

難消化性糖質サンプルとして、IG と FO に加え、ハイアミロースコーンスターチ(HAC)を用いて研究を行った。リサーチダイエツト社の精製飼料である D12450H に各サンプルまたはコーンスターチ(コントロール群)を 3% 添加し、実験飼料とした。6 週齢の BALB/cA マウスを購入し、2 週間の予備飼育後に体重と糞中 IgA 量を平均化して 4 群に分けた(各群 n=5)。各実験飼料を 5 週間摂取させ、体重、餌摂取量、糞重量、糞中の IgA 量およびムチン量、盲腸内容物中の短鎖脂肪酸量を測定した。また、小腸パイエル板細胞の遺伝子発現解析を行った。

続いて、IG サンプルを重合度 5 以上と 5 以下の分画に分け、各分画を 3% 添加した飼料を BALB/cA マウス(6 週齢で購入し、8 週齢で使用、各群 n=4)に 9 週間摂取させた。3 週間ごとの糞重量および糞中 IgA 量とムチン量を測定し、盲腸内容物中の短鎖脂肪酸量を測定した。

さらに、3種類のIGサンプルの腸内細菌による資化性を調べるために腸内細菌57種に対する *in vitro* での資化性試験を行った。

(3) BALB/cA マウスおよびヌードマウスを用いた FO、IG、PD の IgA 産生における比較

FO、IG、PD、3種類の難消化性糖質の IgA 産生誘導能に関して BALB/cAJcl マウスおよびヌードマウス (BALB/cAJcl-*nu/nu*) を用いて研究を行った。精製飼料 AIN93G に含まれる 5% のセルロースのうち 3% を各サンプルと置き換え、実験飼料とした。6週齢のマウス (オス) を購入し、2週間の予備飼育後に体重と糞中 IgA 量を平均化してコントロール群、FO 群、IG 群、PD 群に分け (n=6) 9週間飼育し、10週目に安楽死させた。2日分の糞を 2、5、9週目に採取し、糞重量と糞中 IgA 量を測定した。また、餌摂取量、糞重量、糞中ムチン量、盲腸内容物中の短鎖脂肪酸量、血漿中 IgA 量、肺および顎下腺における IgA 量を測定した。さらに脾臓における遺伝子発現解析を DNA マイクロアレイにより実施した。

4. 研究成果

(1) IG の腸管 IgA 産生誘導能に関する研究 (文献 1)

IG、FO、HAC の腸管 IgA 産生誘導はコントロール群と比較して IG 群が 3 倍、FO 群が 1.5 倍、有意に増加したが、HAC 群はコントロール群と差がみられなかった (図 1)。一方、盲腸内容物中の短鎖脂肪酸量に関しては FO 群で n 酪酸が有意に増加していたが、IG 群と HAC 群は増加していなかった。

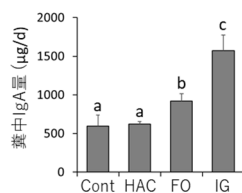


図1. 5週間摂取後の糞中IgA量
(異なる文字間で有意差あり)

腸管 IgA 産生誘導能が最も高かった IG について詳細に検討することとした。IG は活性炭を触媒として作られたグルコース重合体であるが、重合度が低い化合物も含まれているため、重合度 5 以下 (Low-IG) と 5 以上 (High-IG) に分けそれぞれの腸管 IgA 誘導能について検討した。その結果、High-IG は即時的に腸管 IgA 産生を誘導するが、Low-IG は摂取 6 週目以降に徐々に産生を誘導した (図 2)。また、盲腸内短鎖脂肪酸はすべての IG サンプルで増加がみられなかった。小腸パイエル板細胞を用いた遺伝子発現解析では High-IG 群において TGF- β と CD40 リガンドの遺伝子発現の増加が確認でき、High-IG 群では T 細胞依存性の IgA 産生誘導がパイエル板で行われていることが示唆された。

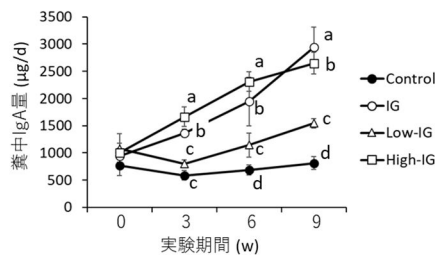


図2. 重合度が異なるIGサンプル摂取による糞中IgA量の推移
(異なる文字間で有意差あり)

IG、Low-IG、High-IG いずれのサンプル摂取でも盲腸内で短鎖脂肪酸の増加を誘導しなかったため、IG が腸内細菌に資化されるかどうかを *in vitro* の系で調べることにした。ヒト腸内常在菌を含め 57 種類の腸内細菌に対する資化性を調べたところ、High-IG を利用できる細菌は *Bifidobacterium breve*、*B. infantis*、*Parabacteroides merdae* の 3 種類であったのに対し、Low-IG は 13 種類の細菌が利用できることが分かり、特に *B. infantis* が利用しやすいことが明らかになった。いずれにせよ、IG を利用できる細菌は多くないことが分かり、このことが IG の摂取で盲腸内の短鎖脂肪酸が増加しない結果になったと考えられる。ただし、IG を利用できる細菌も存在することから、腸内細菌叢が今回用いたマウスと異なる場合は IG 摂取によって盲腸内の短鎖脂肪酸の増加が起これと考えられる。

以上の結果から IG は腸管 IgA の産生を強く誘導するが、大腸内の短鎖脂肪酸を誘導しないことが明らかとなった。

(2) BALB/cA マウスおよびヌードマウスを用いた FO、IG、PD の IgA 産生における比較 (文献 2)

FO、IG、PD の IgA 産生誘導能について腸管に加え、血漿、肺および顎下腺中の IgA 量について比較した。また、通常のマウス (BALB/cAJcl 系統) と T 細胞が欠損したヌードマウス

(BALB/cAJcl-nu/nu) を用い、IgA 産生誘導における T 細胞の関与について検討した。

通常のマウスでは経時的に調べた糞中 IgA 量が IG 群と PD 群で同じような増加を示し、9 週間後にコントロール群と比べて約 5 倍に増加した (図 3)。それに対し、FO 群の増加は他のサンプルに比べて弱く、9 週間後にコントロール群と比べて約 3 倍に増加した。また、FO 群と PD 群において血漿と肺で IgA 量が有意に増加し、顎下腺では増加傾向が見られたが、IG 群では血漿、肺、顎下腺いずれにおいても IgA 量の増加は見られなかった。一方、盲腸内の短鎖脂肪酸量は FO 群と PD 群で有意に増加していたが IG 群ではコントロール群と差がみられなかった。脾臓における DNA マイクロアレイ解析の結果を用いて、遺伝子を機能カテゴリーに分類して分析する GO 解析を行ったところ、FO 群と PD 群間で変動遺伝子の共通性が 70%以上みられたが、IG 群では変動した遺伝子が少なく、FO 群、PD 群と共通する変動遺伝子がなかった。これらの結果から 多分岐の難消化性糖質は腸管において IgA 産生を強く誘導するが、その誘導には必ずしも短鎖脂肪酸量の増加は必要ない、盲腸内の短鎖脂肪酸の増加は全身の免疫系に影響を与え、血漿や肺といった組織での IgA 産生を誘導する、ということが明らかになった。

ヌードマウスの実験において、糞、血漿、肺、顎下腺における IgA 量は通常のマウスに比べてヌードマウスでは非常に少なかったが、糞の IgA 量は FO、IG、PD の摂取により通常マウスレベルまで増加した。一方で、血漿、肺、顎下腺では FO、IG、PD を摂取しても変化は見られなかった。また、通常のマウスと同様に、経時的に調べた糞中 IgA 量が IG 群と PD 群で同じような増加を示したが、通常マウスで見られた 5 週目から 9 週目の増加は見られなかった (図 3)。FO 群の糞中 IgA 量の増加は通常マウスと同様に IG 群と PD 群よりも弱かった。また、ヌードマウスでは FO 群と IG 群で盲腸内短鎖脂肪酸量が有意に増加したが、PD 群では増加しなかった。これら結果から、難消化性糖質は腸管においては T 細胞非依存経路で IgA 産生を増加させるが、血漿や肺組織といった腸管以外では IgA 産生誘導に T 細胞の存在が必要であることが明らかになった。

通常マウスとヌードマウスの結果から、腸管における難消化性多糖摂取による IgA 産生の T 細胞依存性を明らかにした。5 週目までは 3 種類のサンプルによって産生誘導された IgA の 60% 程度が T 細胞依存経路であった。9 週間後は IG、PD では T 細胞依存経路による産生誘導が 80% 程度に増加したが、FO は 60% 程度のままであった。このことから腸管における IgA 産生誘導のメカニズムが IG と PD は共通しており、FO は異なっていると考えられる。

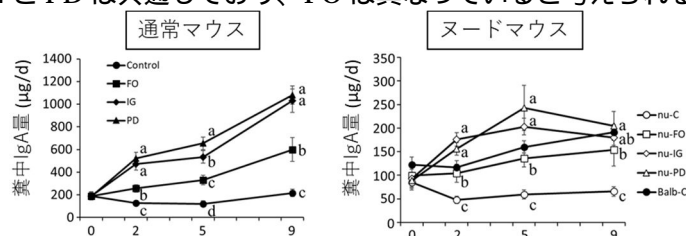


図3. 通常マウスとヌードマウスにおける糞中IgA量の推移
(異なる文字間で有意差あり)

IgA とともに腸管バリア機能に重要なムチンについて、糞中ムチン量を測定することにより比較した結果、通常マウスおよびヌードマウスにおいて IG 群のみ有意に増加した。このことから、難消化性糖質によるムチン産生は IgA 産生、短鎖脂肪酸、T 細胞の存在と関係していないことが明らかになった。

文献 1 . Horinouchi A, Hirai H, Hirano R, Kurihara S, Takagi H, **Matsumoto K**. Intestinal immunomodulatory activity of indigestible glucan in mice and its utilization by intestinal bacteria in vitro. *Journal of Functional Foods*, 87, 104759, 2021.

文献 2 . **Matsumoto K**, Sawano H, Otsubo M, Yui A. Comparison of the effects of three forms of soluble dietary fiber on the production of IgA in BALB/cAJcl and BALB/cAJcl-nu/nu mice. *The Journal of Nutrition*, 153(5):1618-1626, 2023.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumoto K, Sawano H, Otsubo M, Yui A.	4. 巻 153
2. 論文標題 Comparison of the effects of three forms of soluble dietary fiber on the production of IgA in BALB/cAJcl and BALB/cAJcl-nu/nu mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 1618-1626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tjnut.2023.03.037	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 -

1. 著者名 Horinouchi A, Hirai H, Hirano R, Kurihara S, Takagi H, Matsumoto K.	4. 巻 87
2. 論文標題 Intestinal immunomodulatory activity of indigestible glucan in mice and its utilization by intestinal bacteria in vitro.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Functional Foods	6. 最初と最後の頁 104759
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jff.2021.104759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本健司、澤野穂乃香
2. 発表標題 マウスを用いた腸管バリア機能に対する3種類の水溶性難消化性糖質の比較
3. 学会等名 日本応用糖質科学会 2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 由井明日香、澤野穂乃香、松本健司
2. 発表標題 マウスにおけるIgA誘導効果と脾臓遺伝子発現に関する3種類の水溶性食物繊維の比較
3. 学会等名 日本栄養食糧学会 2023年度大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 乳酸菌およびビフィズス菌増殖促進剤	発明者 松本健司、他3名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-106411	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------