

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05914

研究課題名(和文) 腸内細菌を介した盲腸の抗体産生機構と食品成分による調節

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms underlying the generation of intestinal bacteria-reactive antibody in the cecal patches and their modulation by food components

研究代表者

津田 真人 (TSUDA, Masato)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：50525681

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)：盲腸リンパ節における腸内細菌反応性IgG抗体の誘導機序と腸内細菌による調節作用の解明を目的とした。BALB/cマウスの盲腸リンパ節において腸内細菌反応性IgG2b抗体を高産生する特徴とその細胞学的機序を示した。抗生物質投与マウスおよびブリーダーの異なるマウスの解析から、盲腸リンパ節B細胞のIgG2b抗体発現および血液中IgG2b抗体の誘導に關与する腸内細菌群の候補を同定した。プレバイオティクス摂取により、盲腸リンパ節におけるIgG2b抗体産生応答を調節できる可能性を示した。これらの結果は、食品成分を利用した腸内細菌叢への介入による感染防御のための標的として応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、盲腸リンパ節による抗体産生の仕組みと腸内細菌による調節機序の一端を明らかにした。これらの機構は、感染症や炎症反応などの予防や症状の緩和のために、プレバイオティクスなどの腸内細菌叢を調節する食品成分により大腸における抗体産生応答を制御するための新たな作用点としての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the mechanisms underlying the generation of intestinal bacteria-reactive IgG antibody in the cecal patches and their regulation by gut microbiota. We showed that cytological features in cecal patches for antibody production that B cells have high ability to generate intestinal bacteria-reactive IgG2b and non-B cells have an ability to help IgG2b class switching from naive B cells. We identified the candidates of bacterial family or genus which contribute to generate IgG2b expressing B cells and the pool of IgG2b antibody in the serum using antibiotics-treated mice and mice purchased from different breeders. In addition, we showed that intervention of prebiotics to mice upregulated the IgG2b responses in the cecal patches.

研究分野：食品科学

キーワード：腸内細菌 腸管関連リンパ組織 抗体 プレバイオティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗体は免疫反応により B 細胞が最終分化した形質細胞から分泌されるタンパク質であり、特定の異物を特異的に認識・結合することにより、病原体や毒素などの中和作用やマクロファージや好中球による貪食促進作用などの生体防御反応にはたらく。抗体は 5 種類のクラスとさらにサブクラスに分類される。腸管などの粘膜組織には IgA 抗体、血液中には IgG 抗体が主要なクラスの抗体として存在している。IgA 抗体は小腸に存在するパイエル板などの腸管関連リンパ組織の胚中心において、抗原未感作な IgM⁺B 細胞から IgA⁺B 細胞へのクラススイッチにより誘導され、血液中の IgG 抗体は全身免疫系のリンパ組織である脾臓が主要な誘導組織であると考えられている。

近年、健常なヒトやマウスの血液中の IgG 抗体の一部が、腸内細菌に結合性を示すことが報告された (Zeng et al., *Immunity* 44:647-658, 2016, Fadlallah et al., *J Allergy Clin Immunol.* 143(4):1575-1585, Koch et al., *Cell* 165:827-841, 2016)。この IgG 抗体は比較的広範囲の種類の腸内細菌に結合する性質を持ち、*Salmonella* などの病原細菌に対する感染防御や、血中および腸管粘膜における炎症の抑制に寄与することが示唆されている。したがって、腸内細菌結合性 IgG 抗体の産生誘導機構を理解し、それを応用することにより感染症の予防や治療の方法の確立につながることを期待される。また、腸内細菌結合性 IgG 抗体は自然免疫系の活性化に関与する MyD88 シグナル経路に依存して誘導されることが示されているが、その生成を担う主要な免疫誘導組織や、細胞・分子レベルでの機序の詳細は十分に明らかにされていない。申請者は、マウスにおいて、大腸部位の腸管関連リンパ組織のひとつである盲腸リンパ節は、小腸のパイエル板に比べて、特定の IgG サブクラスの抗体産生能が高いこと、さらに、盲腸リンパ節の IgG 発現 B 細胞の分化・誘導には腸内細菌の存在および MyD88 シグナルが重要であることを見出していた。しかし、盲腸リンパ節において、パイエル板とは異なるアイソタイプの抗体が誘導される細胞・分子レベルの機序や血液中の腸内細菌結合性 IgG 抗体の供給源としての機能を有するかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

血液中に存在する腸内細菌反応性 IgG 抗体は感染防御に寄与することが知られていることから、盲腸リンパ節がその主要な機能を担っているかを明らかにすることを目指した。さらに、盲腸リンパ節における腸内細菌特異的 IgG 抗体の産生には腸内細菌の存在が重要であることから、その誘導に関与する腸内細菌を同定することと共に、細胞・分子レベルの機序を明らかにすることを目的とした。さらに、食品成分を利用した腸内細菌の介入による新たな標的として、本研究から得られる成果を感染症予防・緩和の方法の開発につなげることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 盲腸リンパ節において産生される IgG 抗体の腸内細菌結合性の評価

通常環境下の BALB/c マウスの脾臓、パイエル板、盲腸リンパ節から細胞調製後、菌体成分刺激下で培養した。糞便から調製した腸内細菌を固相化した ELISA プレートを用いて、培養上清中の腸内細菌結合性 IgG 抗体量を測定した。また、各組織の細胞から ELISPOT 法により腸内細菌結合性 IgG 抗体発現 B 細胞の検出を行った。

(2) 血液中腸内細菌結合性 IgG 抗体の産生誘導組織としての盲腸リンパ節の役割の検証

SPF 環境下で飼育した BALB/c マウスに、盲腸切除術を行い、2 週間通常飼育後の血中の総 IgG 抗体量および腸内細菌結合性 IgG 抗体量を測定した。

(3) 盲腸リンパ節で IgA 抗体よりも IgG 抗体を産生する細胞学的機序の解明

マウスの盲腸リンパ節細胞から濾胞性樹状細胞の細胞表面分子の発現を指標に分離条件の検討を行った。また、マウスの盲腸リンパ節およびパイエル板由来の非 B 細胞画分の細胞を分離した。脾臓由来のナイーブ B 細胞を LPS 単独もしくはサイトカインを添加して、クラススイッチを誘導する培養系において、非 B 細胞画分の細胞群を添加し、クラススイッチ誘導能の評価を行った。

(4) 盲腸リンパ節を介した腸内細菌結合性 IgG 抗体産生を誘導する腸内細菌の同定

抗生物質(主にグラム陽性菌、グラム陰性菌、嫌気性菌に抗菌スペクトルを持つアンピシリン、ネオマイシン、バンコマイシン、メトロニダゾール)の飲水投与により腸内細菌叢を制限したマウスから盲腸内容物を採取し、次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 盲腸内細菌叢解析を行った。さらに、盲腸リンパ節の B 細胞の IgG 抗体発現と血中 IgG 抗体価の解析を行った。これらの解析の組み合わせにより、盲腸リンパ節および血中の腸内細菌結合性特異的 IgG 抗体産生に関与する盲腸内の細菌種の候補の同定を試みた。また、腸内細菌叢が異なるマウス条件を設定

するため、3社の異なるブリーダーから購入したマウスにおいても同様の解析を行った。

(5) 盲腸リンパ節の抗体産生を促進する機能性食品の評価

腸内細菌叢を変化させる機能性食品成分としてフラクトオリゴ糖を選択した。フラクトオリゴ糖を含む飼料を2週間BALB/cマウスに摂取させた後、盲腸リンパ節のB細胞のIgG抗体発現と血中IgG抗体価の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 盲腸リンパ節において産生されるIgG抗体の腸内細菌結合性の評価

通常マウス由来の盲腸リンパ節細胞の培養上清中には、パイエル板および結腸リンパ節に比べて、総IgG抗体および腸内細菌結合性IgG2b抗体が高産生されたことから、盲腸リンパ節のB細胞は腸内細菌結合性のIgG2b産生能が高いことが確認された(図1)。また、ELISPOT法による解析からも同様の傾向が認められた。

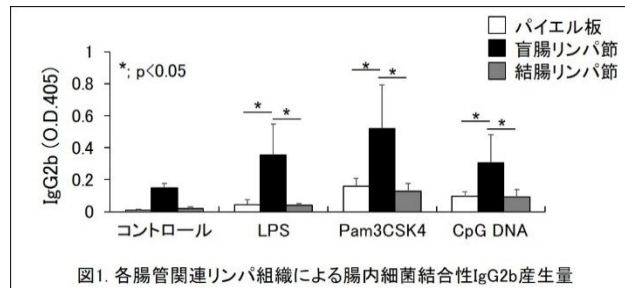


図1. 各腸管関連リンパ組織による腸内細菌結合性IgG2b産生量

(2) 血液中腸内細菌結合性IgG抗体の産生誘導組織としての盲腸リンパ節の役割の検証

盲腸リンパ節による血液中IgG2b抗体の供給における役割を検討するため、通常環境下の成体マウスに盲腸部分切除術を行った後、血液中抗体量を測定した。しかしながら、血液中IgG2b抗体量の大きな変化は認められなかった。成体マウスにおいて既に誘導・存在するIgG2b陽性B細胞や形質細胞による影響が考えられるため、さらなる条件検討が必要である。

(3) 盲腸リンパ節でIgA抗体よりもIgG抗体を産生する細胞学的機構の解明

盲腸リンパ節におけるIgG2b誘導を補助する細胞・分子機序を明らかにするため、盲腸リンパ節から濾胞性樹状細胞の分離条件検討を行った。しかし、機能解析のために必要な細胞数を得られなかった。そこで、当初の計画を変更し、盲腸リンパ節およびパイエル板由来の非B細胞画分の細胞を分離し、同細胞群によるクラススイッチ誘導能の評価を行った。その結果、パイエル板に比べて盲腸リンパ節由来の非B細胞群はIgG2bクラススイッチ誘導能が高い傾向が認められた。今後は、非B細胞群中の血球系・間質系細胞の評価や、同細胞群のIgG2b誘導に関わる機能性分子の探索を行う。

(4) 盲腸リンパ節を介した腸内細菌結合性IgG抗体産生を誘導する腸内細菌の同定

腸内細菌結合性IgG抗体産生を誘導する腸内細菌の探索について検討を行った。異なるスペクトルの抗生物質飲水投与により腸内細菌叢を制限したマウスを作製し、盲腸リンパ節B細胞のIgG発現と血中IgG抗体量の解析、次世代シーケンサーを用いた16S rRNA盲腸内細菌叢解析を行い、IgG産生応答に関与する腸内細菌の同定を試みた。アンピシリンまたはバンコマイシンを飲水投与したBALB/cマウスにおいて、盲腸リンパ節の胚中心B細胞の割合と血中IgG2b抗体量の低下が認められた(図2)。

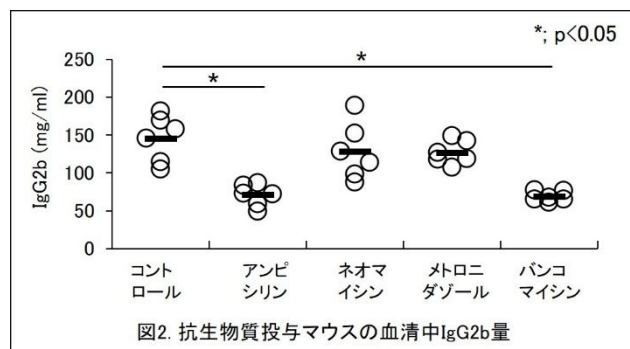


図2. 抗生物質投与マウスの血清中IgG2b量

さらに、盲腸内細菌叢解析から、これらのマウスにおいて特定の科の細菌の占有率が顕著に低下すると同時に、腸内細菌叢の多様性も低下していた。

抗生物質投与マウスを用いた解析では腸内細菌の多様性が低下する問題が生じたため、腸内細菌叢が異なることが知られている3社の異なるブリーダーから購入したBALB/cマウスを用いて、盲腸内細菌叢と抗体産生応答の解析を行った。盲腸リンパ節におけるIgG2b陽性B細胞数と血中IgG2b量がブリーダー間で異なり、このパターンと相関するいくつかの腸内細菌を属レベルで候補として同定した。

上述の解析により盲腸リンパ節を介したIgG2b産生に関与することが予想される候補の細菌群から1種1株を選択し、ノトパイオートマウスを作製した。その結果、無菌マウスに比べて、血液中IgG2b量、盲腸リンパ節のIgG2b陽性B細胞の増加が観察された。

(5) 盲腸リンパ節の抗体産生を促進する機能性食品の評価

腸内細菌叢を変化させる機能性食品成分としてフラクトオリゴ糖を BALB/c マウスに 2 週間摂取させた。盲腸リンパ節の IgG2b 産生応答の促進および血液中の IgG2b 抗体量の増加が確認された。

以上、本研究から盲腸リンパ節による抗体産生の仕組みと腸内細菌による調節作用の一端が明らかになった。これらの機構は感染症や炎症反応などの予防や症状の緩和のために、プレバイオティクスなどの食品成分により大腸における抗体産生応答を制御するための新たな標的としての応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kazumi Osada, Riyuki Kujirai, Akira Hosono, Masato Tsuda, Motoko Ohata, Tohru Ohta, Katsuhiko Nishimori	4. 巻 16
2. 論文標題 Repeated exposure to kairomone-containing coffee odor improves abnormal olfactory behaviors in heterozygous oxytocin receptor knock-in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in behavioral neuroscience	6. 最初と最後の頁 983421-983421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnbeh.2022.983421	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 -
1. 著者名 Hikari Narabayashi, Chiharu Koma, Kazuaki Nakata, Mion Ikegami, Yusuke Nakanishi, Jun Ogihara, Masato Tsuda, Akira Hosono, Shigemasa Hanazawa, Kyoko Takahashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Gut microbiota-dependent adaptor molecule recruits DNA methyltransferase to the TLR4 gene in colonic epithelial cells to suppress inflammatory reactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 1005136-1005136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2022.1005136	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 -
1. 著者名 Masato Tsuda, Hiraku Okada, Natsuki Kojima, Fumiya Ishihama, Yuhei Muraki, Toshiki Oguma, Nanako Hattori, Takumi Mizoguchi, Kiyooki Mori, Satoshi Hachimura, Yoshimasa Takahashi, Kyoko Takahashi, Shuichi Kaminogawa, Akira Hosono	4. 巻 -
2. 論文標題 Cecal patches generate abundant IgG2b-bearing B cells that are reactive to commensal microbiota	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Immunology Research	6. 最初と最後の頁 2022:3974141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2022/3974141	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 -
1. 著者名 岡田開、津田真人、細野朗	4. 巻 51(2)
2. 論文標題 小腸と大腸の腸管関連リンパ組織の抗体産生能と抗原結合性の比較	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 無菌生物	6. 最初と最後の頁 39-43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Takahashi K., Sugi Y., Nakano K., Kobayakawa T., Nakanishi Y., Tsuda M., Hosono A., Kaminogawa S.	4. 巻 4(4)
2. 論文標題 Regulation of gene expression through gut microbiota-dependent DNA methylation in colonic epithelial cells epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 178-190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/immunohorizons.1900086	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 津田真人、細野朗	4. 巻 50(2)
2. 論文標題 小腸と大腸の腸管関連リンパ組織の役割と腸内細菌による機能調節	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 無菌生物	6. 最初と最後の頁 65-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 津田真人、細野朗	4. 巻 50(2)
2. 論文標題 小腸と大腸の腸管関連リンパ組織B細胞の抗体発現と血清中抗体量の相関における腸内細菌の関与	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 無菌生物	6. 最初と最後の頁 88-90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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16件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉村美和, 津田真人, 細野朗
2. 発表標題 脂肪酸の摂取条件が食品抗原を介した免疫応答に与える影響
3. 学会等名 第56回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiraku Okada, Masato Tsuda, Satoshi Hachimura, Yoshimasa Takahashi, Kyoko Takahashi, Akira Hosono
2. 発表標題 Different ability between Peyer's patches and Cecal patches to generate IgA +/ IgG2b+ B cells that are reactive to commensal microbiota
3. 学会等名 第51回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 溝口拓海, 津田真人, 細野朗
2. 発表標題 食物アレルギー誘導時のマウス肺細胞はalarminに対する応答性が亢進する
3. 学会等名 日本食品免疫学会18回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高麗千晴, 中田一彰, 津田真人, 細野朗, 高橋恭子
2. 発表標題 腸内細菌による大腸上皮におけるTLR4遺伝子のDNAメチル化制御機構
3. 学会等名 日本食品免疫学会18回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鯨井麗晋, 坂本 彩乃, 河上 知華, 石塚 里瑚, 山田 萌夏, 細野朗, 津田真人, 大畑素子, 長田和実
2. 発表標題 食品の匂い成分が嗅覚認知機能に及ぼす影響について
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田開, 津田真人, 小島菜月, 石濱史也, 溝口拓海, 服部菜々子, 森清彰, 高橋宜聖, 八村敏志, 細野朗
2. 発表標題 盲腸リンパ節B細胞の抗体発現における腸内細菌の影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古川凱斗, 津田真人, 宇野直哉, 岡田開, 大川真由, 田代桃佳, 八村敏志, 細野朗
2. 発表標題 フラクトオリゴ糖の経口摂取は盲腸リンパ節を介して IgA 産生を誘導する
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津田真人, 細野朗
2. 発表標題 腸内細菌による小腸と大腸の抗体産生の調節作用
3. 学会等名 第55回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細野朗, 津田真人, 岡田開, 大崎雄介, 白川仁, 駒井三千夫
2. 発表標題 ピオチン欠乏が腸管免疫系を介した免疫修飾に関与する
3. 学会等名 第55回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田隆, 中田一彰, 津田真人, 細野朗, 高橋恭子
2. 発表標題 大腸上皮で高発現するmiRNAの同定と機能解析
3. 学会等名 日本食品免疫学会17回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川凱斗, 津田真人, 宇野直哉, 岡田開, 八村敏志, 細野朗
2. 発表標題 フラクトオリゴ糖のIgA産生増強作用におけるCD4+ T細胞の関与
3. 学会等名 日本食品免疫学会17回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴崎 涼太, 古川 凱斗, 津田 真人, 高野 智弘, 王 イバイ, 戸塚 護, 八村 敏志, 細野 朗
2. 発表標題 クルクミンと腸内細菌および短鎖脂肪酸の共刺激がパイエル板細胞応答を修飾する
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田 大貴, 岡田 開, 古川 凱斗, 増山 大雅, 竹ノ内 優介, 川上 里奈, 加藤 仁美, 津田 真人, 細野 朗
2. 発表標題 ピオチンが腸管免疫系の細胞応答に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田開, 津田真人, 細野朗
2. 発表標題 小腸と大腸の腸管関連リンパ組織の抗体産生能と抗原結合性の比較
3. 学会等名 第54回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇野直哉, 津田真人, 岡田開, 細野朗
2. 発表標題 フラクトオリゴ糖による腸管および血清中IgA産生亢進と盲腸リンパ節の濾胞性ヘルパーT細胞の調節
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴崎涼太, 古川凱斗, 津田真人, 高野智弘, 戸塚護, 八村敏志, 細野朗
2. 発表標題 食品成分, 腸内細菌および腸内細菌代謝産物の共刺激がIgA産生に与える影響
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 編集: 食品免疫学会 分担: 津田真人	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 474
3. 書名 食品免疫学事典 5章 5-23 腸内細菌の感染防御作用	

1. 著者名 津田真人, 細野朗	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 325
3. 書名 ヒト常在細菌叢と生理機能・全身疾患 監修: 落合邦康	

〔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
研究 分 担 者	細野 朗 (HOSONO Akira) (70328706)	日本大学・生物資源科学部・教授 (32665)	

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
---------	---------