

令和 元年 6月 14日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02632

研究課題名(和文) Molecular mechanisms for IgA-mediated regulations of host-microbiota symbiosis

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for IgA-mediated regulations of host-microbiota symbiosis

研究代表者

ファガラサン シドニア (Fagarasan, Sidonia)

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・チームリーダー

研究者番号：00391970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、T細胞欠損マウスの腸管内でIgAが常在細菌を非特異的に被覆している事を見出した。細菌と非特異的に結合するIgAについてさらに詳細な解析を行い、バクテロイデス属細菌において非特異的IgAによって制御される遺伝子要素を同定した。この遺伝子は、細菌-細菌間の相互作用に重要な役割を果たしており、腸内細菌全体の構成と代謝機能を制御する為に必須の因子である事が明らかとなった。また、この遺伝子は腸内細菌の機能を介して炎症性腸疾患に対して防御的に作用する事を見出した。これらの結果により、IgAの機能を制御する事が炎症性腸疾患に対する新たな対処方法の開発につながるのではないかと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌の乱れは炎症性腸疾患、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、パーキンソン病を含む神経性疾患などの病態と大きく関わっている。本研究ではIgAによって腸内細菌にもたらされる遺伝子変化が炎症性腸疾患に対して防護的に働いている事が明らかとなった。今回の研究で同定された細菌遺伝子、あるいは腸管IgAの性質を制御する方法が明らかになれば、炎症性腸炎に対する新しい制御方法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this project we gained important insights into the characteristics and function of mucosal immunoglobulin A (IgAs). Furthermore, we identified and characterized IgA-dependent gene elements of Bacteroides species that are critical factors for regulation of mucosal homeostasis via the bacteria-bacteria interaction.

研究分野：Immunology

キーワード：Immunology IgA

1. 研究開始当初の背景

Coevolution for millions of years of hosts and microbes has generated multifunctional dependence in many bidirectional pathways. Mammals invest huge energy to keep the balance of the gut commensal bacterial communities, while commensals also provide metabolites and activate signaling pathways to regulate the host physiology.

During our studies we obtained solid evidence that specific arms of the adaptive immune system play critical roles in controlling the growth and distribution of commensal bacterial species in the gut. Central to our research is the concept that the emergence of adaptive immune system with its diversified antigen-recognition receptors and secretion of immunoglobulin (Ig) A contributed to the establishment of advanced symbiotic relationships with the gut microbiota. Using AID-deficient mice which lack all Ig isotype other than IgM, we revealed for the first time that the IgA plays a critical role in sustaining equilibrium with gut commensal microorganisms (*Fagarasan et al., Science 2002, Suzuki et al., PNAS 2004*). We demonstrated that the IgA is required for maintaining diverse and balanced communities of commensal bacteria, because in its absence we observed enormous expansion of uncultured anaerobic bacteria especially the small intestine. Recently, such phenotype is known as SIBO (small intestine bacterial overgrowth) and is implicated in mucosal and systemic diseases, from inflammatory diseases to chronic fatigue and fibromyalgia.

We further demonstrated that not only IgA per se, but somatically mutated and selected IgA in germinal centers are involved in complex symbiotic relationships, and that such IgAs are controlled by various T cell subsets (*Kawamoto et al., Science 2012; Kawamoto et al., Immunity 2014*). Indeed, we found that balanced and diverse bacterial communities are critical for development and maturation of the immune system, including generation of IgA. By contrast, less diverse and unbalanced bacteria elicit inflammatory responses, leading in time to disease development like allergies and autoimmunity. Therefore, the homeostasis at mucosal and systemic levels depend in the quality and repertoire of immune system which in turn influence the diversity and quality of microbiota.

数百万年にも及ぶ共進化によって、宿主と微生物は多機能かつ双方向の相互作用を発達させてきた。哺乳動物は腸内細菌を維持する為に多大のエネルギーを費やしており、一方で常在細菌も様々な代謝物を生成したり、シグナル経路を活性化させたりして宿主の生理機能を制御している。

我々は過去の研究を通して、獲得免疫の作用が腸内常在細菌の発育と分布に重大な働きを及ぼしている事を証明してきた。我々の研究が明らかにした内容の概略は、「獲得免疫系が多様な抗原受容体の作用を介して免疫グロブリン A (Immunoglobulin A: IgA) を産生し、それによって宿主-腸内細菌の共生関係を構築している」というものである。すなわち、IgA が腸内常在細菌叢の平衡を保つために重大な働きを担っている事を世界に先駆けて発見したのである (*Fagarasan et al., Science 2002, Suzuki et al., PNAS 2004*)。これらの研究では、IgM 以外の免疫グロブリンクラスを産生できない AID 欠損マウスを用いて研究を行なった。AID 欠損マウスでは腸管 IgA が産生されない。我々の研究は、IgA を欠損する AID 欠損マウスの小腸内で培養困難な嫌気性細菌が異常増殖する事を示したのである。この研究によって、IgA が多様でバランスのとれた

腸内常在菌を維持する為に必須である事が明らかとなった。このような小腸内細菌の異常増殖は、近年 SIBO (small intestine bacterial overgrowth) と呼ばれ、粘膜から全身に及ぶ炎症性疾患、慢性疲労、繊維筋痛症などに関連すると考えられている。

さらに我々は、IgA の中でも抗原に適応するための遺伝子変異を有し、かつ、胚中心において細胞レベルの選択を受けて抗原に強い反応を示す B 細胞クローンから産生される IgA が、複雑な常在細菌との共生関係を維持する為に重要な役割を果たしている事を示した。また、このプロセスが T 細胞によって制御されている事を明らかにした (Kawamoto *et al.*, *Science* 2012; Kawamoto *et al.*, *Immunity* 2014)。さらに、バランスの取れた多様な腸内細菌が、IgA 産生を含む免疫系の成熟を促している事もこれらの研究によって明らかになった。逆に、多様性とバランスを欠いた腸内細菌は炎症を惹起してアレルギーや自己免疫疾患の発症につながるという事は、国内外の様々な研究によって示されている。従って、粘膜と全身の恒常性は免疫系の質に依存しており、さらには腸内細菌の多様性と質にも影響しているのである。

2 . 研究の目的

In this project we aimed at a deeper understanding of the role of IgA at mucosal surfaces. Indeed, it took almost 20 years to be widely accepted that IgA production impacts the composition and shapes the microbial landscape in the gut. However, how exactly the IgA function to achieve such impacts remained unknown. Thus, we set up experiments designed for uncovering how IgA secreted into the gut lumen impacts the bacterial communities. We evaluated the bacterial coating by IgA and the consequences of such coating for the bacteria itself as well as the whole assembly of bacterial species in the intestine.

本研究の目的は、粘膜表面における IgA の機能をより深く理解する事である。我々が過去に研究を発表した後「IgA が腸内細菌全体の構成を制御している」という事実が広く受け入れられるまでには約 20 年の歳月を必要とした。しかし、IgA が実際にどのようなメカニズムを介して腸内細菌叢を制御するのかについては、未だに明らかになってはいない。我々は、腸管内に分泌された IgA が腸内細菌に影響を与えるメカニズムを明らかにする目的で実験をデザインした。ここでは、IgA でコートされた細菌の評価と、IgA が細菌に結合する事によって、細菌そのもの、あるいは腸内細菌の全体構成にどのような変化をもたらすのかについて検討を行なった。

3 . 研究の方法

We started by evaluating the IgA coating properties in normal mice and several immunodeficient mice. Among the later group we investigated in more details T cell deficient mice. We evaluated the microbiota composition in wild type and T cell-deficient mice by 16S rRNA sequencing and also visualized the IgA coating of bacteria at single cell level by flow cytometric analyses as well as single bacteria visualization techniques. Interestingly, fecal bacteria collected from T cell-deficient mice were highly coated by IgA comparing with the fecal bacteria collected from wild type animals. Single bacteria visualization by using imaging flow cytometry showed that the IgA binds on the specific portion of the bacterial cells in the gut of wild type mice, but the IgA-binding was likely non-specific, covering the whole bacterial surfaces in T cell-deficient gut. The IgA supercoating pattern associated with a reduced diversity of bacterial species in T cell-deficient mice compared with wild type mice. These results led us to hypothesize that some IgAs coating might lead to trapping of bacteria

into the mucus layer while other IgA coating may lead to elimination of bacteria from the gut or to the coating of very selected bacterial species. We next analyzed the IgAs generated in T cell-deficient mice which were transplanted with antigen-specific T cells and immunized with the respective antigen. We screened several hybridoma lines obtained from the gut plasma cells from such mice and chose to evaluate the function of one heavily glycosylated IgA clone that bound several bacterial species belonging to the Bacteroidetes phylum. In order to evaluate the impact of IgA binding on bacteria, we chose *Bacteroides thetaiotaomicron* (*B. theta*) because its genome was recently decoded. We found that IgA binding to *B. theta* induces *in vivo* the expression of a functionally uncharacterized molecular family encoded within the polysaccharide utilization loci (PUL), suggesting the binding of IgA to bacteria “transcriptionally prepared” the bacteria for sugar metabolism which should take place within the gut mucus layer. Indeed, the upregulation of PUL was observed only in mucus trapped bacteria but not in free bacteria present in the intestinal content. Furthermore, we could visualize *B. theta* trapped together with IgA in the mucus layer. Interestingly, the upregulation of PUL necessitated IgA and the presence of other bacteria, suggesting very complex symbiotic network modulated by IgA. We next generated deletion mutants of the PUL genes in *B. theta* and found that only wild type strain but not mutant strains of *B. theta* benefited the host. Indeed, in a chemically-induced colitis model, wild type *B. theta* but not mutants *B. theta* conferred protection from deadly inflammation. The protection associated with expansion of Firmicutes species producing protective metabolites (butyrate, acetate) only in the presence of wild type *B. theta* but not mutants *B. theta*.

まず、IgA による腸内細菌コートの状態について、正常マウスと何種類かの免疫不全マウスにおける状態を比較する事から研究を開始した。免疫不全マウスの中でも、T 細胞欠損マウスについては特に詳細な検討を行なった。16SrRNA のシーケンスによる腸内細菌構成の解析に加えて、フローサイトメトリーと単一細胞レベルでの可視化技術を用いた解析を行う事によって、IgA と腸内細菌の結合や、それに伴う細菌叢構成の変化などについて解析を行なった。興味深い事に、T 細胞欠損マウスの腸内細菌は正常マウスの腸内細菌と比較して IgA によりコーティングされている割合が有意に高かった。イメージングフローサイトメトリーという技術を用いて単一細菌を可視化した所、野生型マウスの腸内細菌では菌体の特定部位だけに IgA が結合していたが、T 細胞欠損マウスの腸内細菌では細菌表面全体で非特異的に IgA が結合おり、腸内細菌が IgA によって過剰にコーティングされる原因になっていると考えられた。また、T 細胞欠損マウスの腸内細菌が IgA によって過剰にコーティングされているという現象は、腸内細菌叢構成の多様性低下と相関関係を持つ事も示唆された。これらの結果から、IgA には機能的に異なる種類のもが存在し、腸管内の粘液に細菌を捕捉する作用を持つ IgA と、腸管外に細菌を排出する作用を持つ IgA が存在するのではないか、という仮説を考えた。また、IgA は強い糖鎖修飾を持つ事が国外の研究によって示されているので、糖鎖修飾の状態が IgA の機能に違いをもたらしているのではないかと考えてその後の研究を進める事とした。IgA における糖鎖の作用を評価する目的で、T 細胞欠損マウスに抗原特異的な T 細胞を移植し、その特異抗原（非細菌抗原）で免疫したマウスにおいて産生される腸管 IgA を用いてハイブリドームを作製した。複数のハイブリドーム株の中から、強い糖鎖修飾をもつ IgA を産生するクローンをスク

リーニングして抽出し、単クローン IgA を精製した。この単クローン IgA は非細菌抗原を認識するにも関わらず、バクテロイデス門の細菌に強く結合する事が明らかになった。IgA 結合が細菌に与える影響を解析する為に、全ゲノム配列が明らかになっている *Bacteroides thetaiotaomicron* (*B. theta*) と IgA との腸管内における相互作用を解析した。その結果、IgA は腸管内で *B. theta* の polysaccharide utilization loci (PUL) に属する分子の中で、機能不明の遺伝子の発現を上昇させる事を見出した。この結果は、IgA 結合が粘液内における細菌の糖代謝を促進する作用を持つ可能性を示唆している。実際、PUL の発現上昇は粘液に付着している細菌においてのみ認められ、粘液と接触せずに腸管内容物中に含まれている細菌では認められなかった。興味深い事に、PUL の発現上昇は IgA に加えて多様な細菌種を必要とする事が明らかとなり、IgA によって複雑な共生ネットワークが制御されていると考えられた。次に、PUL 遺伝子を欠損した *B. theta* を作製した。野生株と欠損株を抗生物質処理後のマウス腸管内に定着させた後に、腸管粘液内の *B. theta* を可視化したところ、PUL 遺伝子が *B. theta* の形態に大きな影響を与えている事が明らかとなった。さらに、腸内細菌の遺伝子発現を RNA-Seq を用いて解析した所、PUL 遺伝子が宿主機能を増強する方向に作用している事が明らかとなった。すなわち、野生型 *B. theta* は宿主機能を増強したが欠損株はその様な機能を持たない事が明らかになったのである。実際、化学物質によって誘導される腸炎モデルマウスを用いて検討を行った所、野生株 *B. theta* は腸炎防衛的に働いたが、欠損株 *B. theta* では致死性の腸炎が惹起された。この腸炎防衛反応は、酪酸や酢酸などの防御因子を産生する Firmicutes 門に属する細菌の増殖によるものであった。この様な防衛的な腸内細菌構成の制御は野生株 *B. theta* によって行われ、欠損株 *B. theta* では認められなかった。

4 . 研究成果

In this project we gained important insights into the characteristics and function of mucosal IgAs. Furthermore, we identified and characterized IgA-dependent gene elements of *Bacteroides* species that are critical factors for regulation of mucosal homeostasis via the bacteria-bacteria interaction.

本研究において、粘液 IgA の特徴と機能について重要な知見を得た。さらに、バクテロイデス属細菌において IgA によって制御される遺伝子要素を同定した。この遺伝子は細菌 細菌間の相互作用を介して粘膜恒常性の維持に重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Nakajima A, Vogelzang A, Maruya M, Miyajima M, Murata M, Son A, Kuwahara T, Tsuruyama T, Yamada S, Matsuura M, Nakase H, Peterson DA, Fagarasan S, Suzuki K. IgA regulates the composition and metabolic function of gut microbiota by promoting symbiosis between bacteria. J Exp Med. 2018 Vol.215(8)2019-2034. Peer reviewed 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Involvement of T cells in antibody diversification and shaping of the microbial landscape. The Franco-Japanese seminar on Immunology, Tokyo, Japan. 招待講演、国際学会. Sidonia Fagarasan, June 23, 2018.
2. Involvement of PD1 in antibody diversification and immune homeostasis. 第32回 (2016) 京都賞記念ワークショップ 基礎科学部門. Kyoto. 招待講演、国際学会. Sidonia

Fagarasan, Nov 12, 2016.

3. Involvement of T cells in antibody diversification and shaping of the gut microbial landscape. International Congress of Immunology 2016, Melbourne.招待講演、国際学会。Sidonia Fagarasan, Aug 22, 2016.

〔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 0 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：服部 正平

ローマ字氏名：Masahira Hattori

所属研究機関名：早稲田大学

部局名：理工学術院

職名：教授(任期付)

研究者番号(8桁): 70175537

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。