

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：32610

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23977

研究課題名(和文) 宿主免疫機構の発達に必要な腸管微生物叢曝露の時機・内容と炎症性腸疾患病態への関与

研究課題名(英文) Timing and compositions of the gut microbiota required for the development of the host immune system and its role in inflammatory bowel disease pathogenesis

研究代表者

三好 潤 (Miyoshi, Jun)

杏林大学・医学部・学内講師

研究者番号：10528722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：SPF環境下マウスと無菌(germ free, GF)マウスでは、免疫プロファイルが異なることが知られている。4週齢のSPFマウス、exGFマウス(元GFマウスでSPFマウスからの糞便移植のレシピエントとなったもの)、GFマウスの3群を用意した。8週齢時点において、exGF群にはSPF群と同様の腸管微生物叢が生着し、免疫プロファイルはSPF群に類似するものに変化した。10週齢のSPFマウス、exGFマウス、GFマウスにおいては、14週齢時点で、exGF群にはSPF群と同様の腸管微生物叢が生着していたが、免疫プロファイルはGF群に類似したままであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

無菌マウスの免疫機構は通常環境飼育下のマウスと異なることが報告されている。今回、4週齢の無菌マウスに、週齢・性別が一致した通常環境飼育下のマウスの糞便を移植すると、腸管微生物が生着するとともに、免疫機構が通常マウスと類似したものに変化した。一方、10週齢のマウスに同様の処置を行うと、腸管微生物は生着するものの、免疫機構は無菌マウスに類似した状態であった。このことは、幼少期の微生物叢への曝露が健全な免疫発達に必要であることを示唆している。腸管微生物叢と宿主の相互関係、発達における重要な知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been reported the immune profile of germ-free (GF) mice is different from SPF mice. In this study, we prepared 4-week-old SPF mice, exGF mice that were originally GF but received fecal microbiota transfer (FMT) from sex-matched SPF mice, and GF mice. At 8 weeks of age (4 weeks after FMT), we observed that exGF mice have gut microbiota and an immune profile similar to SPF mice. Next, we prepared 10-week-old SPF mice, exGF mice, and GF mice. At 14 weeks of age (4 weeks after FMT), we observed that, although the gut microbiome in exGF mice was similar to SPF mice, the immune profile of exGF mice was still similar to GF mice.

研究分野：消化器内科学

キーワード：腸管微生物叢 腸管免疫 免疫発達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) 発症には遺伝的背景、環境因子により生じる免疫異常が関与していると考えられている。環境因子の一つとして腸管微生物叢 (microbiota) が大きな役割を果たしていることが示唆されている。近年、妊娠中や小児期の抗菌薬使用により児の IBD 発症リスクが上昇することが報告されている (1, 2)。我々は、早期抗菌薬投与に起因する腸管 dysbiosis により児の IBD 発症リスクが上昇するという仮説を立て、上記のヒト疫学的知見を再現するマウス IBD モデルを初めて確立した (3)。本モデルでは周産期に母体に抗菌薬を投与し、仔において、長期にわたる dysbiosis、小児期の免疫発達異常 (リンパ球分化、サイトカインプロファイル) および腸炎発症リスク上昇 (生存率低下) を認めた。追加検討では、成長後も炎症性の免疫状態が持続していた。以上より、宿主の免疫状態が出生後早期の腸管 microbiota によって決定し持続することが示唆された。

我々は、健全な免疫発達において適切な時機 (特に幼少期の一時期) に適切な microbiota に曝露する必要があると考え、この期間内に腸管 dysbiosis を改善することにより宿主の免疫発達を健全な方向へと導き、IBD 発症リスクを軽減することができるのではないかと仮説を立てた。この仮説を検証する第一歩として、我々は、SPF 環境下マウスと無菌 (germ free, GF) マウスでは、同系統、同週齢、同性であっても免疫プロファイルが異なることに着目し、GF マウスに SPF マウスからの糞便移植を異なる時期に行うことにより、宿主免疫機構に与える影響が異なるかについて検討を行なった。

2. 研究の目的

腸管 microbiota への曝露タイミング・内容が宿主免疫発達に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、週齢の異なるマウスを用いた 2 つの実験を行なった。

(1) 4 週齢の SPF 環境下野生型 C57BL/6 マウス (雌雄) および GF C57BL/6 マウス (雌雄) を購入し、GF マウスの一部に性別の一致した SPF マウスから糞便移植を行なった。これにより、SPF 群、exGF 群 (元 GF マウスで SPF マウスからの糞便移植のレシピエントとなったもの)、GF 群の 3 群 (各群につき雌雄 5 匹ずつ) を用意した。8 週齢まで SPF 群、exSPF 群は SPF 環境で飼育し、GF 群は無菌アイソレーター内での飼育を継続した。8 週齢時点 (FMT の 4 週後) において、すべてのマウスを解剖に供し、腸管構造の肉眼的、組織学的評価を行うとともに、脾臓、腸間膜リンパ節、腸管粘膜、血液検体を採取した。脾臓、腸間膜リンパ節についてはフローサイトメトリー解析により CD4⁺T 細胞の分画を検討した。腸管粘膜、血液検体については、qPCR 法、ELISA 法により、サイトカイン、免疫グロブリンの発現、含有量について評価した (実験 A)。

(2) 10 週齢の SPF 環境下野生型 C57BL/6 マウスおよび GF C57BL/6 マウスを購入し、実験 A と同様に、SPF 群、exGF 群、GF 群 (各群につき雌雄 5 匹ずつ) を用意した。14 週齢まで SPF 群、exSPF 群は SPF 環境で飼育し、GF 群は無菌アイソレーター内での飼育を継続した。14 週齢 (FMT の 4 週後) において、すべてマウスを解剖に供し、実験 A と同様の免疫プロファイルの解析を行なった。

4. 研究成果

実験 A において、4 週齢で FMT を受けた exGF マウスでは、8 週齢時点で SPF 群と同様の腸管 microbiota が生着していた。exGF マウスの免疫プロファイルは同週齢の GF マウスとは異なり、同週齢の SPF マウスに類似するものに変化していた。一方、実験 B において、10 週齢で FMT を受けた exGF マウスでは、14 週齢時点で SPF 群と同様の腸管 microbiota が生着していたものの、免疫プロファイルは同週齢の GF マウスと類似し、同週齢の SPF マウスとは異なっていた。

GF マウスでは巨大盲腸が特徴的な腸管構造として知られているが、盲腸サイズは 4 週齢で FMT を受けた exGF マウスでも 10 週齢で FMT を受けた exGF マウスでも、それぞれ週齢が一致した SPF マウスと同等であった。また、結腸長も同様に、それぞれ週齢が一致した SPF マウスと同等であった。しかし、小腸長については、4 週齢で FMT を受けた exGF マウスが週齢が一致した SPF と類似する一方で、10 週齢で FMT を受けた exGF マウスでは週齢が一致した GF マウスに類似していた。これらの結果より、以下の知見が得られた。

(1) 4 週齢の GF マウスでは、週齢相応の腸管 microbiota が生着した場合に、免疫機構の発達が健全化し腸管構造も可逆性がある。

(2) 10 週齢の GF マウスでは、週齢相応の腸管 microbiota が生着するにもかかわらず、免疫機構および腸管構造の一部が不可逆的である。

このことは、健全な免疫発達や腸管発達のために腸管 microbiota に曝露すべき発達の critical window 期間が幼少期に存在することを示唆していると考えられた。

<引用文献>

Ungaro R, Bernstein CN, Gearry R, Hviid A, Kolho KL, Kronman MP, Shaw S, Van Kruiningen H, Colombel JF, Atreja A. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2014 Nov;109(11):1728-38. doi: 10.1038/ajg.2014.246. Epub 2014 Sep 16. PMID: 25223575.

Örtqvist AK, Lundholm C, Halfvarson J, Ludvigsson JF, Almqvist C. Fetal and early life antibiotics exposure and very early onset inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gut*. 2019 Feb;68(2):218-225. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314352. Epub 2018 Jan 10. PMID: 29321166.

Miyoshi J, Bobe AM, Miyoshi S, Huang Y, Hubert N, Delmont TO, Eren AM, Leone V, Chang EB. Peripartum Antibiotics Promote Gut Dysbiosis, Loss of Immune Tolerance, and Inflammatory Bowel Disease in Genetically Prone Offspring. *Cell Rep*. 2017 Jul 11;20(2):491-504. doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.060. PMID: 28700948; PMCID: PMC5667669.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究協力者	久松 理一 (Hisamatsu Tadakazu)		
研究協力者	日比 紀文 (Hibi Toshifumi)		

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