

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09668

研究課題名(和文) 乳幼児早期マウスへの抗生剤投与の自然リンパ球への影響と喘息との関連

研究課題名(英文) Effects of antibiotic exposure during early infant on mucosal innate lymphoid cells and their relation to bronchial asthma

研究代表者

山西 慎吾 (Yamanishi, Shingo)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：00465337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は乳児早期からの抗菌薬曝露が腸内細菌叢変化を介して粘膜免疫の変化を誘導し、特に自然リンパ球の変化が喘息の病態に關与する可能性について検討した。マウスに離乳直後から抗菌薬(アモキシシリン)を持続的に曝露することにより、腸内細菌叢の多様性が減少すること、離乳期の腸内細菌として優勢菌である乳酸菌とビフィズス菌が消失し、バクテロイデス属が最優勢菌となることがわかった。次にこのような腸内細菌叢構成の変化による腸管や肺での粘膜内免疫細胞プロファイルの変化を検討したところ、腸管においては粘膜内免疫細胞数の減少とILC2細胞数の減少を認めた。

研究成果の概要(英文)：We examined whether changes in mucosal immune cell profile, especially a profile of innate lymphoid cells, through altering the intestinal microbiota caused by antibiotic exposure, are associated with pathophysiology of asthma. First, we examined the effects of antibiotic exposure using Amoxicillin during infant on murine intestinal microbiota, we found that Amoxicillin exposure resulted in predominance of genus Bacteroides, with disappearance of genus Lactobacillus and genus Bifidobacterium. Also, we found decreased intestinal microbial diversity in Amoxicillin group compared with control group. Next, we examined mucosal immune cell profile in both intestine and lung, we found that profound decrease in mucosal immune cells and ILC2 cells in the intestine.

研究分野：アレルギー

キーワード：腸内細菌叢 粘膜免疫 自然リンパ球 気管支喘息 乳児早期 抗菌薬

1. 研究開始当初の背景

ヒトの消化管には1000種類以上で100兆個を越える細菌が生息しているとされている。この細菌群は、宿主に対して栄養代謝の補助、消化管粘膜免疫の誘導および維持、免疫寛容の誘導、更には感染制御といった様々な役割を果たして宿主に共生している。近年、慢性炎症性疾患（アレルギー疾患、炎症性腸疾患、肥満など）の急激な増加が先進国を中心に起きており、世界的な医療問題になっているが、その原因として細菌叢の攪乱(dysbiosis)が発症に関与している可能性が指摘されている。近年、アレルギーの病態形成の一因としてバリア障害が考えられている。乳幼児早期の抗生剤投与はdysbiosisを引き起こし、これにより粘膜免疫の発達障害および粘膜バリア障害が生じる可能性を示唆する。そして、このような粘膜に抗原が曝露されることで様々なアレルギー疾患の発症につながるのではないかと推察する。

近年、粘膜内でTh細胞と似た性質をもち、自然免疫に関与する免疫細胞として自然リンパ球 (innate lymphoid cell, ILC) の存在が明らかになった。このILCにはTh細胞群と同様の亜群が存在し、その分化は粘膜上皮からのサイトカイン種類に影響される。粘膜上皮では腸内細菌叢やその代謝産物などによる環境の変化のシグナルを感知している。このシグナルの変化は粘膜上皮からのサイトカインシグナルの変化となり、この変化により粘膜内のILC profileは変化すると考えられている。また、ILCからのサイトカインは粘膜上皮に作用し上皮細胞からのムチンや抗菌物質の産生、上皮細胞間のタイトジャンクションの調節を行い、粘膜バリア形成の維持に重要な役割を果たしている。このようなことから近年、このILCが慢性炎症性疾患の病態形成に関連することが明らかにされてきた。

そこで本研究ではこのILCに焦点を当て、特に乳幼児期の抗菌薬曝露による腸内細菌叢構成変化がILCに及ぼす影響を検討する。

2. 研究の目的

本研究では乳幼児早期の抗菌薬曝露により腸内細菌叢構成の変化および粘膜免疫の構成変化が起こり、このことがアレルギーの病態形成に関与すると仮説をたて、この仮説を検証するために以下の検討を行う。

- (1) **抗菌薬曝露マウスの腸内細菌叢構成と粘膜の自然リンパ球の構成変化を検討**
- (2) **アレルギー負荷での粘膜自然リンパ球の構成変化の検討**
- (3) **抗菌薬曝露時のプロバイオティクス/プレバイオティクス投与による介入効果の検討。**

3. 研究の方法

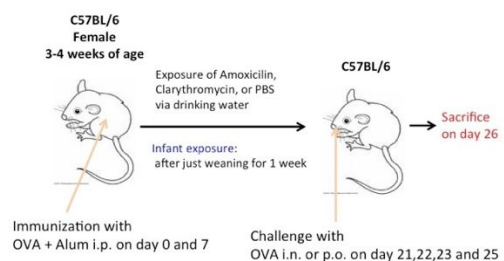
(1) 抗菌薬曝露による腸内細菌叢構成の変化の検討

方法：離乳早期マウスに抗菌薬(アモキシシリン、または無添加)を、飲料水を介して1または4週間曝露させる。抗菌薬曝露前、1週間後、4週間後に体重測定、糞便採取を行い、糞便を用いて腸内細菌叢解析を行う。

(2) 抗菌薬曝露による粘膜免疫細胞構成の変化の検討

方法：離乳早期マウスに抗菌薬(アモキシシリン、または無添加)を、飲料水を介して4週間曝露させる。抗菌薬曝露4週間後に腸管、肺を摘出し、それぞれの臓器から粘膜免疫細胞を抽出したのちフローサイトメトリ解析を行う。

(3) アレルギー負荷による粘膜免疫細胞プロファイルの変化の検討



方法: 離乳早期マウスに抗菌薬(アモキシシリンまたは無添加)を、飲料水を介して4週間曝露させる。抗菌薬曝露後に抗原感作を行う。抗原感作2週間後から経口および経鼻で抗原曝露を行う(図参照)。抗原曝露後に腸管および肺を摘出し、それぞれの臓器から免疫細胞を抽出してILCsの解析を行う。

(4) 抗菌薬曝露時プロバイオティクス/プレバイオティクス投与によるプロファイルの変化の検討

方法: 離乳早期マウスに抗生剤(アモキシシリンまたは無添加)を、飲料水を介して4週間曝露させ、抗生剤曝露と同時に飼料をプロバイオティクス/プレバイオティクスを添加したものに変更する。抗菌薬曝露後4週間後に腸管および肺を摘出し、それぞれの臓器から免疫細胞を抽出してILCsの解析を行う。

(5) (4)においてアレルギー負荷による粘膜免疫細胞プロファイルの変化の検討

方法: 離乳早期マウスに抗菌薬(アモキシシリン、または無添加)を、飲料水を介して4週間曝露させ、抗菌薬曝露と同時に飼料をプロバイオティクス/プレバイオティクスを添加したものに変更する。抗菌薬曝露後に抗原感作を行う。抗原感作2週間後から経口および経鼻で抗原曝露を行う。抗原曝露後に腸管および肺を摘出し、それぞれの臓器から免疫細胞を抽出して

* (2)~(5)では同時に腸内細菌叢、腸管組織内のサイトカインプロファイルおよび組織学的検討も行う。

4. 研究成果

(1) 抗菌薬曝露による腸内細菌叢構成の変化の検討

4週令(離乳後)のマウスの糞便を用いた腸内細菌叢解析(T-RFLP法)ではLactobacillales目とBacteroidesが優勢菌であった。このマウスに離乳後から、飲料

水を介して4週間アモキシシリンを曝露し、8週令でのマウスの糞便を用いた腸内細菌叢解析では、非曝露群ではLactobacillales目とBacteroidesに加え、Bifidobacterium、Prevotellaが優勢菌だが、アモキシシリン曝露群ではLactobacillales目、Bifidobacteriumが消失し、Bacteroides、Clostridium Cluster XIが優勢であった。このように抗菌薬(アモキシシリン)曝露により腸内細菌叢構成が著しく変化することが確認できた(図1)。

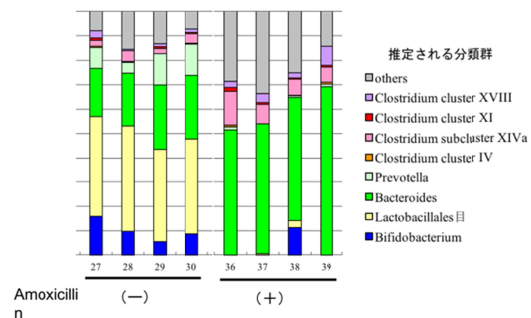


図1 腸内細菌叢解析

また、両群の体重を比較すると抗菌薬曝露群は非曝露群と比較し、体重増加の傾向を認められた(図2)。

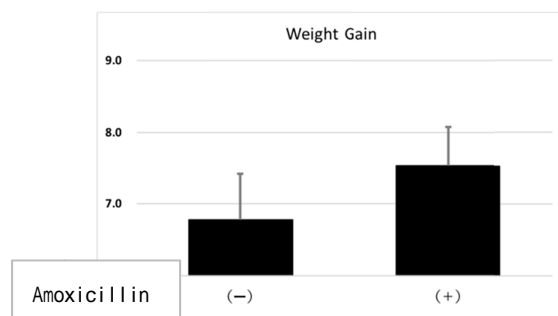


図2 体重の変化

(2) 抗菌薬曝露による粘膜免疫細胞構成の変化の検討

4週令(離乳後)のマウスに4週間アモキシシリンを曝露した後に、8週令で腸管および肺を摘出し、それぞれの臓器からリンパ球を抽出してフローサイトメトリー解析を行った。腸管においては抗菌薬非曝露群に比し、曝露群では顕著な粘膜内リンパ球数の減少を認め、また、ILC2の細胞数の減少も認められた(図3)。

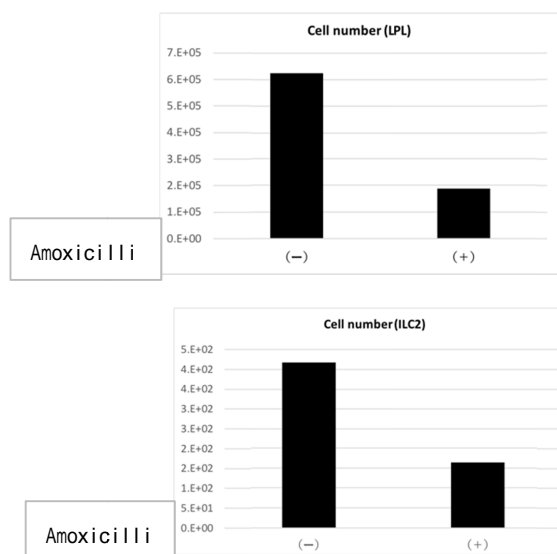


図3 腸管粘膜免疫細胞解析

(3)～(5)さらにこのような腸内細菌叢および粘膜免疫の変化が喘息の病態に關与する可能性を檢討するためアレルギーモデルマウスを用いて検討したが、一定した結果が得られず、その後の検討が行うことができていない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山西 慎吾 (YAMANISHI, Shingo)
 日本医科大学・医学部・助教
 研究者番号：00465337

(2)研究分担者

田辺 雄次郎 (TANABE, Yujiro)
 日本医科大学・医学部・助教
 研究者番号：00643818

尾崎 優介 (OZAKI, Yusuke)
 日本医科大学・医学部・助教
 研究者番号：60740561

ルビー パワンカール (Pawankar, Ruby)
 日本医科大学・医学部・教授
 研究者番号：00287674

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()