

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15953

研究課題名(和文)分泌型イムノグロブリンが腸内微生物叢制御とNAFLD/NASH進展に果たす役割

研究課題名(英文)The role of secretory immunoglobulin in development of NAFLD and NASH

研究代表者

稲嶺 達夫 (INAMINE, Tatsuo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：00549628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝疾患および肝炎(NAFLD/NASH)の発症や進展における腸管の分泌型イムノグロブリン(SIg)の役割の解明を目指した。高脂肪高果糖誘導マウスNAFLD/NASHモデルにおいて、C57BL/6系マウスでは腸管SIgAが減少していた。また、C57BL/6系SIg欠損マウスにおいて、SIgAがNAFLD/NASHモデルの一部の病態に対して保護的に働いていることが明らかとなった。一方で、IgA反応性の異なるBALB/c系マウスでは、SIgAの変動やSIg欠損の影響は異なっていた。今後は、SIgAの保護的な働きの詳細やヒトの患者におけるSIgの変動を明らかにしていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにヒトのNAFLD/NASHにおいて血中IgAと疾患重症度が相関することが報告されているが、腸管SIgAの変動を明らかにした研究はなく、高脂肪食誘導疾患モデルマウスの腸管SIgA変動を見た研究もなかった。本研究では、高脂肪高果糖誘導NAFLD/NASHマウスにおける腸管SIgAの変動やその保護的な役割の一部を明らかにした。さらに、このSIgAの働きはマウスの系統によって異なる可能性を示した。このことは、今後のSIgAの研究においては、ヒトと類似するSIgA変動を示すマウスシステムを利用することが、ヒト病態をより反映した結果を得るために重要であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Dysfunction of gut microbiome had been shown to be related to non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis (NAFLD/NASH). In the study, we sought to reveal a role of gut secretory immunoglobulin A (SIgA), known to modulate gut microbiome, in the disease development. The NAFLD/NASH-model mice, induced by high-fat and high fructose diet, showed decreased fecal SIgA. In addition, pIgR deficient mice, which can't secrete SIgA into the gut, were susceptible to diet-induced NAFLD/NASH more than wild-type mice. These decrement of and protective function of SIgA were observed in C57BL/6 background, but not in BALB/c background.

研究分野：消化器内科学

キーワード：IgA 腸内微生物 脂肪肝 NAFLD

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) はメタボリックシンドロームの肝病変であり、肝細胞への脂肪蓄積を特徴とする。わが国でも食の欧米化等に伴い肥満人口が増加し、成人の検診受診者の約 30%が NAFLD と診断される。一般に NAFLD は良性的の疾患であるが、NAFLD 患者の約 10~20%は、脂肪肝に加えて炎症や線維化を呈する非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に進行する。NASH は進行性の肝疾患であり、重症例では肝硬変進展や肝細胞癌合併に至る。今後ますます患者の増加が予測される NAFLD/NASH であるが、その発症および進展の詳細な機序は未だ明らかではなく、また、特異的な治療法も存在しないため、これらの解決は重要な課題であった。

NAFLD/NASH の発症および進展には、生活習慣や遺伝的素因など複数の因子が多段階において関与するという multiple-parallel hits hypothesis が提唱されているが、近年、腸内細菌叢の異常増殖 (bacterial overgrowth) や微生物叢組成の異常 (dysbiosis) が、NAFLD や肥満の発症と関連することが明らかになってきた。

これまでに NASH 患者や遺伝的肥満マウス、高脂肪食投与マウスにおいて bacterial overgrowth や dysbiosis が観察されており、さらに、NAFLD/NASH モデルマウスで見られる腸上皮バリア機能の障害は、LPS などの菌体成分や代謝産物の門脈血への流入を介して、自然免疫系を活性化し肝障害進展に寄与していると考えられている。

通常、常在微生物と宿主は互いに影響しあい、互いの生理機能や微生物叢組成の恒常性を保っている。微生物叢はビタミンや胆汁酸、短鎖脂肪酸の合成や代謝を介して、宿主の生理機能に寄与する。一方で、宿主は抗菌ペプチドや分泌型イムノグロブリン (SIg) の腸管への分泌を介して腸内微生物叢の恒常性を維持し、また、微生物から腸上皮細胞を保護する。特に、分泌型イムノグロブリン A (SIgA) は腸内微生物に結合することで腸上皮との接触や血流への侵入を阻害し、また、微生物の産生する毒素などを中和することで腸管における first line defense として重要な役割を担う。さらに、無菌マウスにおいて SIgA 産生が減少することや特定の細菌が SIgA 産生を増加させることから、SIgA は宿主-腸内微生物間相互作用の重要なメディエーターであると言える。ヒトにおいては、選択的に IgA を欠損する疾患の患者では、消化器感染症や消化管癌の罹患率が高いことがわかっており、また、IgA 遺伝子欠損マウスや、SIgA や分泌型イムノグロブリン M (SIgM) の腸管への移送を担うトランスポーターである polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) を欠損したマウスでは、腸内微生物叢が変化することや腸上皮のバリア機能が低下することが分かっている。さらに、NAFLD/NASH と IgA との関連は古くから取り上げられており、NAFLD/NASH 患者の血中 IgA の増加や疾患の重症度との相関が報告されている。しかし、NAFLD/NASH における腸管 SIgA (または SIgM) に注目した研究はこれまでになかった。

2. 研究の目的

研究代表者は、「NAFLD/NASH を引き起こす高脂肪食等の食習慣は、腸における分泌型イムノグロブリンの発現や機能を低下させ、腸内細菌叢の異常を招き、疾患の発症および進展へと関わる。」という仮説を立て、NAFLD/NASH において SIg がどのように変化するのか、SIg 欠損は NAFLD/NASH の病態や腸内細菌叢にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NAFLD/NASH における分泌型イムノグロブリンの変動を明らかにする。

日本クレア株式会社から購入した C57BL/6 マウスと BALB/c マウスを用いた。高脂肪食群には、NAFLD/NASH を誘導する Fast Food Diet (FFD) を 20 週間与えた。FFD は摂取カロリーの 40%が脂肪由来の高脂肪食 (AIN-76A Western Diet; TestDiet, St. Louis, MO, USA)、および高グルコース・フルクトース含有水 (グルコース 1.89%、フルクトース 2.31%) から成る。また、コントロール群(Control Diet, CTD) には、摂取カロリーの 12%が脂肪由来の通常食 (AIN-76A; TestDiet) を与え、飲水は FFD 群と同様に高グルコース・フルクトース飲料を与えた。20 週後に、安楽死させ、肝臓等の臓器を採取し、遺伝子発現の定量、組織染色等の病態評価用に保存した。

耐糖能評価は、実験開始 20 週後に腹腔内ブドウ糖負荷試験を行った。8 時間絶食後、尾静脈より採血し、空腹時血糖を測定した。測定後、腹腔内に 20%の D-グルコース液をマウスの体重 10 g あたり 0.1 ml 腹腔内注射した。その後、30 分、60 分、120 分経過後に血糖測定を行った。

腸管 SIgA 定量は、マウスの糞便を採取し、PBS 懸濁後、懸濁液中の IgA 量を Mouse IgA ELISA Quantitation Set (Bethyl, Montgomery, TX, USA) を用いて測定した。

(2) 分泌型イムノグロブリンの欠損が NAFLD/NASH に与える影響を明らかにする。

本研究では、IgA および IgM を管腔側に輸送する pIgR (Entrez Gene ID 18703) の機能欠損マウスを、CRISPR-Cas9 法を用いて作出した。受精卵へのインジェクションなどの生殖工学操作は長崎大学先端生命センター遺伝子実験施設に委託し、C57BL/6N の受精卵または、BALB/c の受精卵を用いて、両系統を遺伝背景に持つ pIgR 欠損マウス (*Pigr*^{-/-}) を作出した。pIgR タンパクの欠損はウエスタンブロット法により確認し、C57BL/6N または BALB/c マウスに 2 世代戻し交配した後、ヘテロマウスの交配により実験に用いる *Pigr*^{+/-} および同腹野生型マウス (*Pigr*^{+/+})

を得た。Pigr^{-/-}および Pigr^{+/+}に FFD を 22 週間与えて NAFLD/NASH を誘導した。

以上の実験は長崎大学動物実験委員会および長崎大学組換え DNA 実験安全委員会の承認を得て行なった。

4. 研究成果

(1) NAFLD/NASH における分泌型免疫グロブリンの変動を明らかにする。

事前実験として、異なる 3 つの生産施設由来の C57BL/6 マウスおよび BALB/c マウスの糞中 SIgA および SIgM レベルを比較したところ、系統間および生産施設間で SIgA レベルが大きく異なることが明らかとなった。一方で、SIgM 量は SIgA の約 1 万分の 1 程度であり、系統および施設間で大きな差はなかった。また、アンピシリンの経口摂取や、同ケージでの共同飼育によって、施設間で見られた腸管 SIgA の差が縮小したことから、施設間の腸管 SIgA の違いは各施設のマウスが持つ施設固有の腸内細菌叢によるものであることが示唆された。

これまでに、マウスの系統間で腸管 SIgA の反応性が異なることや、腸管 SIgA レベルの低いマウスは薬剤誘導性腸炎モデルに対して pIgR 欠損に類似した表現型を示すことが報告されている。つまり、マウスの系統間および施設間の SIgA レベルまたは反応性の違いは、NAFLD/NASH における SIgA の変動や役割を調べる本研究の結果に影響を与える可能性があるため、以降の研究は系統間および施設間の違いを制御して進めることとした。

腸管 SIgA レベルの高い施設由来の C57BL/6 および BALB/c マウスに FFD を 20 週間与え NAFLD/NASH を誘導した。C57BL/6 および BALB/c 両系統において、FFD 群は CTD 群と比較して体重、肝臓重量、肝臓重量-体重比が増加していた。しかし、C57BL/6 の FFD 群では肝臓組織の脂肪滴蓄積および耐糖能異常が見られたが、BALB/c の FFD 群では顕著ではなかった。これらの結果は過去の報告と一致する。一方、腸管および血中の IgA 量を定量したところ、C57BL/6 の FFD 群では血中および腸管 IgA 量が減少していたのに対して、BALB/c の FFD 群では変わらなかった (図 1)。

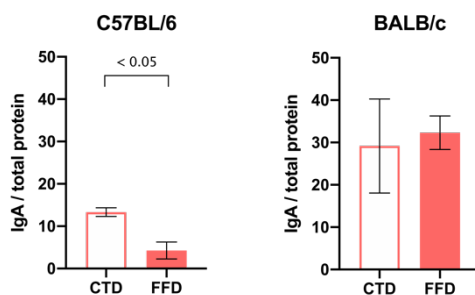


図 1. マウス脂肪肝モデルにおける糞中 IgA 量

以上の結果より、C57BL/6 系マウスおよび BALB/c 系マウス間で NAFLD/NASH 誘導 FFD に対する IgA 反応性が異なっていることが明らかとなり、このことは、NAFLD/NASH における腸管 SIgA の役割が両マウス間で異なっている可能性を示唆している。

(2) 分泌型免疫グロブリン欠損が NAFLD/NASH に与える影響を明らかにする。

当初、IgA 遺伝子欠損マウスおよび pIgR 遺伝子欠損マウスをカリフォルニア大学サンディエゴ校の Bernd Schnabl 博士より入手する予定であったが、系統間で異なる IgA 反応性を踏まえて、C57BL/6 および BALB/c の 2 つの系統の pIgR 遺伝子欠損マウスを長崎大学にて新たに作出した。組換え遺伝子を持つファウンダーマウスは、腸管 SIgA レベルの高い施設由来の C57BL/6N または BALB/c を用いて 2 世代の戻し交配を行い、pIgR 欠損系統とし、以降の実験に用いた。

pIgR 欠損 (Pigr^{-/-}) および同腹野生型 (Pigr^{+/+}) マウスに FFD を 22 週間与えて NAFLD/NASH を誘導したところ、C57BL/6 系 pIgR 欠損マウスは野生型マウスに対して、経口ブドウ糖負荷試験での耐糖能低下を示した。一方で、BALB/c 系の pIgR 欠損マウスと野生型マウス間では差は見られなかった (図 2)。驚いたことに、BALB/c 系マウスの FFD 群では、pIgR 欠損マウスの肝重量、肝重量-体重比が野生型マウスに対して有意に低かった。一方で、C57BL/6 系の FFD 群では、pIgR 欠損マウスの方が高い傾向を示した。

以上の結果から、FFD 誘導 NAFLD/NASH モデルにおける pIgR 欠損の影響が両系統で一部異なることが明らかとなった。C57BL/6 系マウスでは、腸管 SIgA は NAFLD/NASH に保護的に働いており、腸管 SIgA レベルの低下が一部の病態に寄与しているのかもしれない。一方で、BALB/c 系マウスにおいては、このような腸管 SIgA の保護的な働きは異なっている可能性がある。しかし、BALB/c 系マウスは NAFLD/NASH のような炎症性の代謝性疾患に対して C57BL/6 系よりも感受性が低いことが知られている。そのため、BALB/c 系マウスの腸管 SIgA の NAFLD/NASH における役割の解明には今後のより詳細な検討が不可欠である。

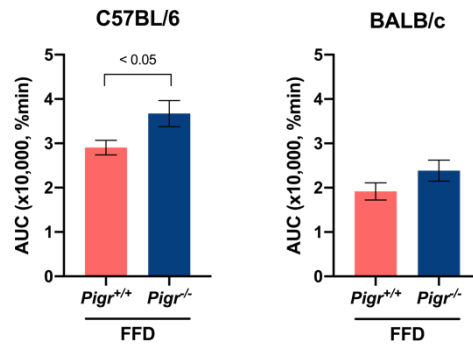


図 2. SIgA 欠損マウスにおける糖負荷反応性

(3) 今後の展開

当初予定と異なり、pIgR 欠損系統を新たに作出することとなったため、コロニー拡大に時間を要した。現在も個体数を増やし、継続して NAFLD/NASH モデルを作出している。また、本研究では NAFLD/NASH モデルにおける腸管 SIgA の変動や役割の一部を明らかにしたものの、当初予定していたその他の表現型への影響や詳細な機序の解明を行うことができなかった。腸内細菌叢への影響も含めて、今後も継続して研究を展開していく予定である。また、動物実験終了後、マウスで見られる腸管 SIg 量の変動がヒトの NAFLD/NASH 患者でも見られるかを明らかにし、ヒト NAFLD/NASH における SIg の役割解明に繋げる予定である。

(4) 研究成果の位置付け

これまでにヒトの NAFLD/NASH において血中 IgA と疾患重症度が相関することが報告されているが、腸管 SIgA の変動を明らかにした研究はなく、マウスで高脂肪食負荷時の腸管 SIgA 変動を見た研究はこれまでなかった。本研究の期間中に、C57BL/6 系における高脂肪食負荷時の腸管 IgA の変動や IgA 遺伝子欠損の影響が報告され、その結果は本研究の C57BL/6 系 pIgR 欠損マウスで見られた結果を支持するものであり、C57BL/6 系マウスでは高脂肪食誘導性の代謝性疾患に対して IgA が保護的に働いていると考えられる。しかし、ヒト NAFLD/NASH 患者と異なり、本研究の C57BL/6 マウスでは FFD 群で血中 IgA が低下していた。また、本研究でマウスの系統間で異なる SIgA の変動や役割が示唆された。これらは、今後の SIgA の研究においては、ヒトと類似する SIgA 変動を示す系統のマウスを利用することが、ヒトの病態をより反映した結果を得るために重要であることを示唆する。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Inamine Tatsuo, Schnabl Bernd	4. 巻 53
2. 論文標題 Immunoglobulin A and liver diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 691-700
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-017-1400-8	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 該当する

〔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 稲嶺達夫, 豊永ちなみ, 松浦真由子, 近藤新二, 塚元和弘
2. 発表標題 腸内細菌が寄与する BALB/c マウス腸管 IgA 量の変化
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 1. 照井海人, 豊永ちなみ, 松浦真由子, 坂本祐介, 石橋潤大, 渡邊佑輔, 塚元和弘, 稲嶺達夫
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患を誘導する高脂肪食による腸管分泌型IgAの変動
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究課題期間終了時点で未発表の研究論文および学会発表の情報は、発表後、代表者が所属する研究室のホームページで随時公開する。
<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/treat/index-j.html>

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	豊永 ちなみ (TOYONAGA Chinami)		
研究協力者	松浦 真由子 (MATSUURA Mayuko)		
研究協力者	石橋 潤大 (ISHIBASHI Junta)		
研究協力者	坂本 祐介 (SAKAMOTO Yusuke)		
研究協力者	照井 海人 (TERUI Kaito)		

6. 研究組織（つづき）

	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	渡邊 佑輔 (WATANABE Yusuke)		