

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17686

研究課題名(和文)腸管免疫誘導組織内共生細菌による、腸管恒常性維持機構およびクローン病との関連

研究課題名(英文) Maintenance of Intestinal Homeostasis by Symbiotic Bacteria Residing in Intestinal Immune-inducing Tissues and Its Association with Crohn's Disease

研究代表者

柴田 納央子 (Shibata, Naoko)

早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・次席研究員(研究院講師)

研究者番号：60794542

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)：本研究課題では、Alcaligenes菌由来のリポ多糖の炎症活性が低い一方で、B細胞によるIgA産生の促進をすることや、アルカリゲネス菌を過剰増殖させると、桿状からフィラメント状へ形態変化し、形態変化に伴い菌体内に蓄積するシトクロムcが、樹状細胞のアポトーシスを誘導することが明らかになった。さらに、Alcaligenes菌のクローン病発症や増悪化への影響については、小腸大腸型クローン病において血清中Alcaligenes菌特異的IgG抗体価とクローン病重症度が強い正の相関を示し、Alcaligenes菌特異的抗体価が、クローン病の新規客観的指標となりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管においてIgAは、病原性細菌・ウイルスの侵入阻害や、毒素の中和を行うことが知られており、本研究成果は、Alcaligenes菌が腸管免疫誘導組織であるパイエル板内に共生することで、IgA産生促進を介した生体防御に寄与していることを示唆している。また近年、腸内細菌叢や腸内細菌由来の代謝産物の異常が、関節リウマチの発症や自閉症、神経系の発達や機能に影響することが報告されており、本研究課題から得られる成果は、腸管にとどまらず、将来的には全身性の免疫疾患や炎症性疾患、神経疾患に対する新しい予防法および治療法へと波及する可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed that while lipopolysaccharide derived from Alcaligenes has low inflammatory activity, it promotes IgA production by B cells and efficiently induces antigen-specific immune responses when used as an adjuvant in vaccines. In addition, when Alcaligenes is overgrown, the form changes from rod-like to filamentous, and cytochrome c accumulated in the bacterial cells with the form change induces apoptosis of dendritic cells. In addition, regarding the effect of Alcaligenes on the onset and aggravation of Crohn's disease, a strong positive correlation was observed between serum Alcaligenes specific IgG antibody and Crohn's disease severity in small intestine colon type Crohn's disease. These results suggest that Alcaligenes specific antibody titer can be a new objective index for Crohn's disease.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：腸管免疫 腸内細菌 樹状細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

人体最大の免疫臓器である腸管は、粘膜免疫システムと呼ばれるユニークな免疫システムを発達させ、多様な病原微生物に対する生体防御と、食餌性抗原や常在細菌に対する寛容を同時に成立させることで、腸管組織における免疫学的恒常性を維持している。その腸管リンパ組織の代表格であるパイエル板は、抗原取り込みに特化した M 細胞を有し、その後の免疫反応を規定していると言われている。

申請者らは、2010 年にパイエル板内部の共生細菌叢を解析し、マウス、サル、ヒトのパイエル板内部に、日和見細菌群の一種である *Alcaligenes* 菌が定常的に共生していることを発見した (Obata T, Shibata N, et al., PNAS, 2010)。一方、クローン病を始めとした炎症性腸疾患は原因不明の疾患であるが、宿主粘膜免疫系と食餌性抗原・腸内細菌の異常な相互作用の関与が推定されており、その侵入門戸であるパイエル板は、クローン病では初期病変が出現するなど、疾患形成に大きく関与していると考えられる。しかし、定常状態、炎症性腸疾患発症状態における、パイエル板内共生細菌と宿主粘膜免疫系の直接的相互作用についての解析は乏しい。そこで、本研究課題では、マウス、サル、ヒトのパイエル板内部に共生する *Alcaligenes* 菌に着目し、定常状態での *Alcaligenes* 菌による免疫制御機構や、共生の生理学的意義、クローン病の発症・増悪化における、*Alcaligenes* 菌の関与機構を明らかにし、将来的には組織内共生細菌群の生理学的存在意義とメカニズムに立脚した腸管関連免疫疾患の新規予防法・治療法開発を目指す。

### 2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では(1)樹状細胞を起点とした、*Alcaligenes* 菌による T 細胞・B 細胞の分化、機能制御機構や、同機構に寄与する *Alcaligenes* 菌由来生理活性分子を探索する。(2) *Alcaligenes* 菌の形態変化機構と、それに伴う *Alcaligenes* 菌の性状変化を、菌体側・宿主側両側面から解析し明らかにする。(3)クローン病の発症・増悪化における *Alcaligenes* 菌の関与機構を解明し、新規診断マーカー・病態重症度測定指標としての応用可能性について検討していく。また将来的には、これまでほとんど解析されてこなかった、小腸大腸型クローン病と小腸型クローン病の発症メカニズムの差異についても、*Alcaligenes* 菌の全身拡散を起点とした解析により明らかにし、発症メカニズムに基づいた、クローン病の新規病型別治療法の確立につなげたい。

### 3. 研究の方法

本研究課題ではパイエル板内部に最優勢で共生する *Alcaligenes* 菌に着目し 下記の 3 つの解析を軸に、*Alcaligenes* 菌による免疫制御機構や共生の生理学的意義、また腸管関連免疫疾患との関連を明らかにする。

(1)樹状細胞を起点とした、*Alcaligenes* 菌による T 細胞・B 細胞の分化、機能制御機構や、腸炎防御機構を解明

(1- )*Alcaligenes* 菌の凍結乾燥菌から抽出・精製したリポ多糖や、メタボローム解析・HPLC により、*Alcaligenes* 菌の生理活性分子を探索する

(1- )*Alcaligenes* 菌の生理活性分子の動態及び、宿主腸管免疫系への影響を解明する。

(2) Alcaligenes 菌の形態変化機構と、それに伴う Alcaligenes 菌の性状変化

(2- ) 形態変化した Alcaligenes 菌の性状変化について、ラマン分光分析や免疫学的・分子生物学的解析から明らかにする

(2- ) で明らかにした Alcaligenes 菌の性状変化による、宿主免疫細胞群への影響を解明する。

(3)Alcaligenes 菌のクローン病発症や増悪化への影響の解明

(3- )Alcaligenes 菌の組織内共生異常と、クローン病発症・増悪化の関連を明らかにする

(3- ) 血清中、糞便中 Alcaligenes 菌特異的抗体価の、クローン病診断マーカーとしての応用利用可能性を検討する。

#### 4 . 研究成果

(1)樹状細胞を起点とした、Alcaligenes 菌による T細胞・B細胞の分化、機能制御機構や、腸炎防御機構を解明

樹状細胞を起点とした、Alcaligenes 菌による T細胞・B細胞の分化、機能制御機構や腸炎防御機構の解明を目的として、Alcaligenes 菌の生理活性分子の探索を行った。その結果、Alcaligenes 菌から抽出、精製したリポ多糖の炎症活性が低く、大腸菌のリポ多糖で引き起こされる敗血症症状を、ほとんど引き起こさないことが明らかになった。一方で、Alcaligenes 菌のリポ多糖は、B細胞による IgA 産生の促進や、ワクチンのアジュバントとして使用した際に、抗原特異的な免疫応答を効率的に誘導することが明らかになった。

腸管において IgA は、病原性細菌の侵入阻害や、毒素の中和を行うことが知られており、本研究成果は、Alcaligenes 菌が腸管免疫誘導組織であるパイエル板内に共生することで、IgA 産生促進を介した生体防御に寄与していることを示唆している。本研究結果の一部は *Mucosal Immunology* 誌にアクセプトされている。

また、腸管組織内共生細菌である Alcaligenes 菌の産生する膜小胞を介した、宿主腸管免疫系制御機に着目した研究を推進し、下記のような研究成果を得ている。

細菌からの膜小胞の放出刺激としては主に、DNA 損傷と Quorum sensing が知られており、各膜小胞誘導経路により産生される膜小胞内容物とその免疫制御機構に着目した解析を、ラマン分光分析法および免疫学的解析により行った。その結果、Alcaligenes 菌が膜小胞内に短鎖脂肪酸を高濃度に封入していることが明らかになった。短鎖脂肪酸は代表的な生理活性分子として研究が進められているが、実際の生体内における動態の多くは未解明である。今後、アルカリゲネス菌由来の膜小胞を介した、免疫制御機構について、ラマン分光分析や免疫学的・分子生物学的解析により明らかにしていく。

(2) Alcaligenes 菌の形態変化機構および、全身炎症誘起機構の解明

アルカリゲネス菌を過剰増殖させると、桿状からフィラメント状へ形態変化をすることが判明した。また、フィラメント状への形態変化に伴い、アルカリゲネス菌の菌体内にシトクロム c が蓄積し、一部のシトクロム c は菌体外へ放出されることを見出した。シトクロム c は通常、細菌細胞膜や動物細胞のミトコンドリア内膜において、好気呼吸電子伝達系の電子供与体として機能しているが、ミトコンドリアからシトクロム c が細胞質へ放出されると、アポトーシス促進因子として作用することが知られている。これらの報告と一致し、アルカリゲネス菌が定常的に共生している樹状細胞に、形態変化後のアルカリゲネス菌を感染させることで、樹状細胞の細胞

質におけるシトクロム c が増加し、それと連動しアポトーシスが高率に誘導されることが明らかになった。以上の解析結果から、アルカリゲネス菌の共生破綻機序として、アルカリゲネス菌の形態変化に伴う菌体内シトクロム c の蓄積及び、シトクロム c の樹状細胞の細胞質への放出と、それに起因したアポトーシス誘導機構の存在が新たに示唆された

### (3)Alcaligenes 菌のクローン病発症や増悪化への影響の解明

健常人とクローン病患者のパイエル板を蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法により解析した結果、健常人のパイエル板内に Alcaligenes 菌が検出される一方で、クローン病患者のパイエル板には全く検出されない症例が多いことが分かった。また、クローン病患者の血清中では Alcaligenes 菌特異的 IgG 抗体価が増加傾向にあり、小腸大腸型クローン病においては血清中 Alcaligenes 菌特異的 IgG 抗体価とクローン病重症度が強い正の相関を示すことが分かってきた。さらに、小腸大腸型クローン病において、血清中 Alcaligenes 菌特異的 IgG 抗体の標的抗原タンパクについても解析を進め、候補分子を得ている。以上から、クローン病の発症・増悪化に、Alcaligenes 菌が関与することや、血清中 Alcaligenes 菌特異的 IgG 抗体価がクローン病の新規診断マーカーや、小腸大腸型クローン病の重症度を測る、新規客観的指標となり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 柴田納央子、清野宏	4. 巻 38
2. 論文標題 腸内細菌と炎症性腸疾患	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharma Medica	6. 最初と最後の頁 17-22
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 無
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 Hosomi Koji, Shibata Naoko, Shimoyama Atsushi, Uto Tomoya, Nagatake Takahiro, Tojima Yoko, Nishino Tomomi, Takeyama Haruko, Fukase Koichi, Kiyono Hiroshi, Kunisawa Jun	4. 巻 11
2. 論文標題 Lymphoid Tissue-Resident Alcaligenes Establish an Intracellular Symbiotic Environment by Creating a Unique Energy Shift in Dendritic Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 --
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.561005	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 該当する
1. 著者名 Takahashi I, Hosomi K, Nagatake T, Toubou H, Yamamoto D, Hayashi I, Kurashima Y, Sato S, Shibata N, Goto Y, Maruyama F, Nakagawa I, Kuwae A, Abe A, Kunisawa J, Kiyono H.	4. 巻 32
2. 論文標題 Persistent colonization of non-lymphoid tissue-resident macrophages by Stenotrophomonas maltophilia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. Immunol.	6. 最初と最後の頁 133-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz071	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 該当する
1. 著者名 TH Takizawa, N Shibata, Y Kurashima, H Kiyono, T Kurita-Ochiai, and K Fujihashi.	4. 巻 8
2. 論文標題 Distinct roles for Peyer's patch B cells for induction of antigen-specific IgA antibody responses in mice administered oral recombinant Salmonella.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 531-541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz029	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 該当する

1. 著者名 Naoko Shibata, Jun Kunisawa, Koji Hosomi, Yukari Fujimoto, Keisuke Mizote, Naohiro Kitayama, Atsushi Shimoyama, Hitomi Mimuro, Shintaro Sato, Natsuko Kishishita, Ken J Ishii, Koichi Fukase, and Hiroshi Kiyono.	4. 巻 103
2. 論文標題 Lymphoid-tissue resident Alcaligenes LPS induces IgA production without excessive inflammatory responses via TLR4 agonist activity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/mi.2017.103	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 該当する

1. 著者名 Naoko Shibata, Jun Kunisawa, Hiroshi Kiyono.	4. 巻 8
2. 論文標題 Dietary and microbial metabolites in the regulation of host immunity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2017.02171	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 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 N. Shibata
2. 発表標題 Induction of apoptosis in host cells associated with morphological changes of intra-tissue symbiotic bacteria
3. 学会等名 Tokyo 2020 UCSD-IMUST International Joint Research Symposium
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 N Shibata
2. 発表標題 Morphological changes of intra-tissue opportunistic bacteria, Alcaligenes, are accompanied by cytochrome c accumulation and induce host cell apoptosis
3. 学会等名 Rising Stars in Cutting Edge Immunology Research
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田納央子、國澤純、安藤正弘、細川正人、堀井俊平、細見晃司、竹山春子、清野宏。
2. 発表標題 腸管組織内に共生する日和見細菌アルカリゲネス菌の形態変化に伴う、シトクロムc蓄積と宿主細胞のアポトーシス誘導
3. 学会等名 第71回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 N. Shibata
2. 発表標題 Lymphoid tissue-resident Alcaligenes LPS induces IgA production without excessive inflammatory responses via weak TLR4 agonist activity.
3. 学会等名 20th German-Japanese Joint Symposium on Life and Medical Sciences: Interdisciplinary Research for Ageing Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 N Shibata, J Kunisawa, K Hosomi, H Mimuro, S Sato, K J Ishii, H Kiyono.
2. 発表標題 LPS from lymphoid-tissue resident Alcaligenes induces IgA without excessive inflammation via its weak TLR4 agoinist activity.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会 学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田納央子、細見晃司、下山淳史、王韻茹、吉井健、深瀬浩一、清野宏、國澤純
2. 発表標題 小腸パイエル板組織内共生細菌アルカリゲネスの免疫機能とアジュバント応用
3. 学会等名 日本小児消化管感染症研究会
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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