

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07181

研究課題名（和文）D-アミノ酸に着目した腸管粘膜免疫制御とIgA腎症発症メカニズムの解析

研究課題名（英文）The role of microbial D-amino acids in the pathology of IgA nephropathy

研究代表者

鈴木 将貴（Suzuki, Masataka）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：90595000

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではバクテリア由来D-アミノ酸が宿主の腸管免疫を刺激し、B細胞の分化に影響を与えることを明らかにした。中でもD-アラニンが宿主のマクロファージを刺激し、炎症性サイトカインの産生を促進することでB細胞の生存を亢進させることを見出した。さらにD-アミノ酸代謝酵素の活性欠損マウスの解析により、D-アミノ酸代謝障害が腸内細菌叢を変化させ、IgA産生形質細胞の増加と血中IgAの増加をもたらすことを明らかにした。IgA腎症のモデルマウスであるHIGAマウスにおいてD-アミノ酸酸化酵素の活性が失われていることを見出し、HIGAマウスの血中IgA増加の一因であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では初めてバクテリアの特徴的な代謝物であるD-アラニンが免疫刺激作用を持つことを報告した。D-アミノ酸の代謝異常は腸内細菌叢を変化させてIgAに関連する過剰免疫を誘導することから、IgA関連自己免疫疾患と関係している可能性が示された。なかでもIgA腎症モデル動物でD-アミノ酸代謝活性が失われていたことから、D-アミノ酸代謝酵素の補完または腸内細菌叢の調節によりIgA腎症の発症予防と進行抑制ができる可能性を示している。また、D-アミノ酸がB細胞の運命を調節していることから、IgA以外の免疫にも関わっている可能性があり、自己免疫疾患やアレルギー疾患との関わりも考えられる。

研究成果の概要（英文）：D-amino acids are one of the characteristic metabolites in commensal bacteria. However, it have not been identified the role of D-amino acids in host immunity. In this study, we found that bacterial D-amino acids stimulate intestinal immune system and modulate B cell fate. Especially, Bacterial D-alanine activated macrophages to produce inflammatory cytokines such as TNF-alpha and IL-1beta that promoted B cell survival. Furthermore, we found that inactive mutation in DAO gene developed intestinal dysbiosis, increased IgA+ plasma cells in the small intestine, and accumulated IgA in the blood in mice. These mechanisms are involved in over production of IgA nephropathy mouse model named HIGA mouse.

研究分野：免疫学

キーワード：D-アミノ酸 B細胞 マクロファージ IgA腎症 腸内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は腎糸球体に IgA が沈着し、組織炎症を誘導することにより糸球体濾過能の低下をもたらす、腎不全を引き起こす自己免疫疾患である。近年のゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、その病態メカニズムに消化管粘膜における過剰免疫が関与することが示唆された。IgA は大部分が小腸粘膜に局在する形質細胞により産生されることから、粘膜における B 細胞から形質細胞への分化が重要と考えられる。GWAS 解析結果の一つの例として、B 細胞の分化刺激である BAFF の関連が明らかにされた。しかしながら具体的な IgA 腎症発症メカニズムは提示されていない。

我々の研究グループでは腸内細菌が産生する D-アミノ酸に着目し、宿主-腸内細菌相互作用について研究を行って来た。腸内細菌は細胞壁の構築や細菌間のコミュニケーション手段として D-アミノ酸を利用している。一方、哺乳類は小腸上皮に D-アミノ酸分解酵素 DAO を発現し、一部は消化管管腔へと放出することで D-アミノ酸代謝により産生される過酸化水素により腸内細菌叢をコントロールしている。DAO 活性欠損マウスでは IgA の産生が亢進しており、さらに IgA 腎症モデルマウスである HIGA マウスにおいて DAO の活性が失われていることを見出した。

2. 研究の目的

上述した過去の報告と我々の研究グループにおける観察結果をもとに、消化管粘膜の D-アミノ酸代謝異常と腸内細菌叢の変化が IgA 産生を増加させ、IgA 腎症発症のきっかけとなるのではないかと推察した。そこで DAO 活性喪失による腸内細菌叢の異常と宿主の IgA 産生に与える影響を分子レベルで明らかにし、IgA 腎症の発症の治療標的を明らかにすること目的とし、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 消化管および関連リンパ組織中免疫細胞の解析

野生型、DAO 活性欠損 (DAO^{G181R}) マウス、TCR ダブルノックアウトマウス、TCR DAO^{G181R} トリプル変異マウスの小腸から、EDTA, Dispase, Collagenase および DNase を用いて粘膜下層の細胞を採取した。また、パイエル板からは 70 μm のメッシュを通して細胞を採取した。それぞれ Percoll 密度勾配法によりリンパ球を精製した。得られた免疫細胞の集団をフローサイトメトリーを用いて形質細胞へと分化する B 細胞の表面抗原 (CD45, B220, IgM, IgD, IgA) を解析した。B 細胞 (CD45+, B220+, IgM+) の生死は 7AAD 染色により確認した。

(2) 小腸内細菌叢の解析

小腸遠位部より消化管内容物を回収し、Phenol:Chloroform:isoamyl alcohol 溶液、SDS および EDTA を含む混合液中、ガラスビーズにより細菌を破砕し、遠心分離後に得られた上清から細菌ゲノム DNA を採取した。スピナラムを用いて精製したゲノム DNA をテンプレートとし、27Fmod および 338R プライマーを用いて 16S rDNA 配列の V1-V2 領域を PCR により増幅した。PCR 産物をスピナラムで精製し、それらを鋳型として Nextera XT primer kit で PCR 増幅することによりサンプルごとにインデックス配列を付加した。PCR 産物を精製後、濃度を均一にした上でブライブラリを作成し、illumina Miseq により網羅的にシーケンス解析を行った。

(3) IgA-seq

小腸管腔内で IgA と結合している細菌を同定するために IgA-seq を行った。抗マウス IgA 抗体と Protein G magnetic beads を混合し、抗体を beads に結合させた後、小腸内容物の懸濁液上清と混合してマグネットにより IgA 結合細菌を精製した。残った上清は IgA 非結合サンプルとして回収した。IgA 結合サンプルおよび IgA 非結合サンプルをそれぞれ上述の菌叢解析と同様の方法で細菌を解析した。

(4) 小腸粘膜組織における網羅的遺伝子発現解析

TCR ダブルノックアウトマウス、TCR DAO^{G181R} トリプル変異マウスの小腸からガラスプレートを用いて物理的に粘膜層を採取し、phenol/chloroform 法により RNA を精製した。マイクロアレイによる遺伝子発現解析は株式会社理研ジェネシスに委託した。得られた発現解析データは Ingenuity pathway analysis および DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) による Gene Ontology 解析を行った。

4. 研究成果

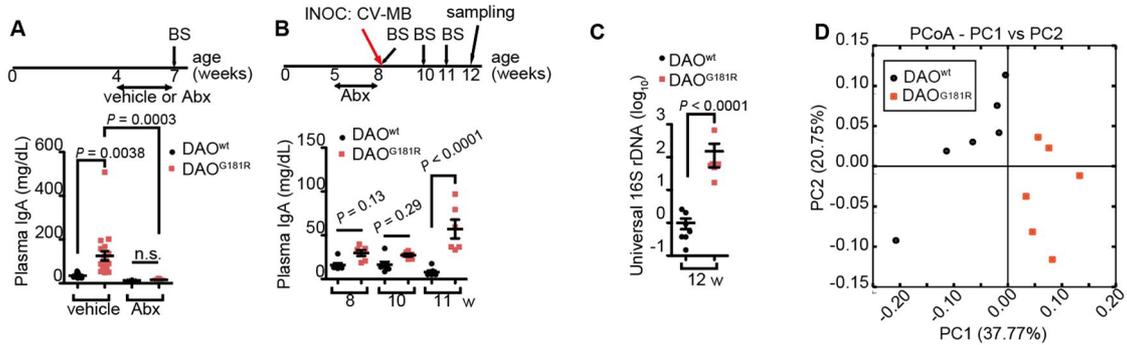


図1 DAO^{G181R} マウスでは腸内細菌依存的に IgA 産生が亢進

(1) 主な成果

D-アミノ酸分解酵素活性欠損による IgA 産生増加のメカニズムを明らかにするため、まず DAO^{G181R} マウスに抗生物質を投与し、腸内細菌の影響を検討した。その結果、DAO^{G181R} マウスで増加していた血中 IgA は抗生物質により有意に抑制された。また、抗生物質投与を中止すると3週間後に血中 IgA の増加が認められた(図 1A,B)。この時、小腸内容物に含まれる腸内細菌の数を qPCR により検討したところ、DAO^{G181R} マウスで有意に腸内細菌が増加していた(図 1C)。これらの結果から、DAO は腸内細菌の増殖を抑えることで IgA 産生を抑制している可能性が示された。また、菌叢解析の結果から、DAO^{G181R} マウスでは野生型と異なる菌叢を持つことが明らかになった(図 1D)。

続いて2つの異なる菌叢を持つ環境における野生型と DAO^{G181R} マウスの小腸粘膜下層における B 細胞集団を解析した。1つ目の菌叢は DAO 活性の有無に影響を受けない菌叢であり、Lactobacillus 属が 90%を占める菌叢(SS-MB)と定義した。2つ目の菌叢は SPF 環境であり、DAO 活性の影響を受ける菌叢(CV-MB)とした(図 2A)。CV-MB 環境では血液中 IgA および粘膜下層 IgA+形質細胞の増加が認められた一方、興味深いことに、SS-MB では DAO^{G181R} マウスでも血中 IgA および小腸粘膜下 IgA+形質細胞の集団の変化も認められなかった(図 2B,C)。これらの結果から、SPF 環境の特定の菌が IgA 産生に寄与していると考えられた。

他方、IgD+, IgM+ ナイブ B 細胞の集団は CV-MB 環境下では差はなかったが、SS-MB 環境下では DAO^{G181R} マウスで有意に増加していた(図 2D,E)。この結果から、細菌からの代謝物が B 細胞の分化に影響を与えている可能性が示唆された。

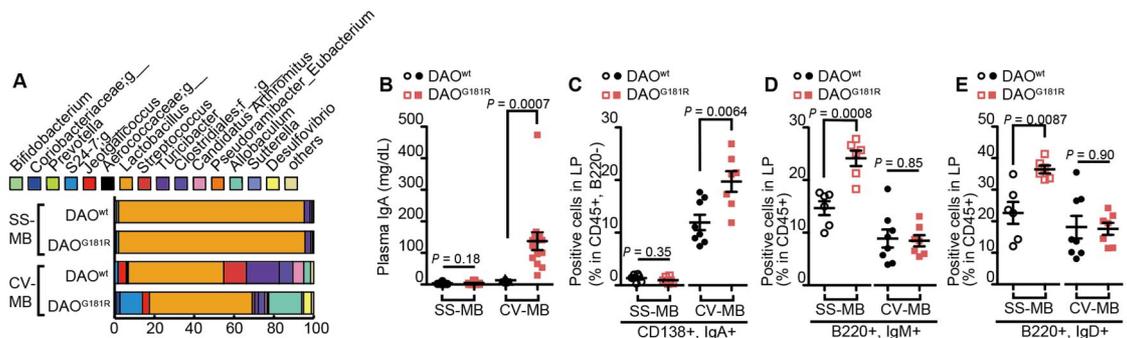


図2 DAO^{G181R} マウスでは腸内細菌叢に依存して IgA 産生が誘導され、DAO 活性の影響を受けない菌叢ではナイブ B 細胞の増加が認められた

B 細胞の分化経路には大きく分けて T 細胞依存経路と T 細胞非依存経路の2種類が知られている。ナイブ B 細胞への分化と IgA+形質細胞への分化に対する T 細胞への依存性を明らかにするため、DAO^{G181R} マウスを TCR ダブルノックアウトマウスと交配し、トリプル変異マウスを作成した。SPF 環境細菌をこのマウスに移植したところ DAO^{G181R} マウスで認められた IgA の増加は TCR のダブルノックアウトにより認められなくなったことから、IgA+形質細胞への分化は T 細胞に依存していることが明らかになった(図 3A)。さらにこれらのマウスの腸内細菌で IgA に捕捉される菌叢を IgA-seq という手法により解析したところ、Candidatus Arthromitus や Clostridium 属が T 細胞に依存して捕捉されることが確認された(図 3B)。Candidatus Arthromitus は T 細胞依存的に IgA 産生を誘導することが知られていることから、DAO^{G181R} マウスの IgA 増加メカニズムの一旦は Candidatus Arthromitus が関与していると考えられた。

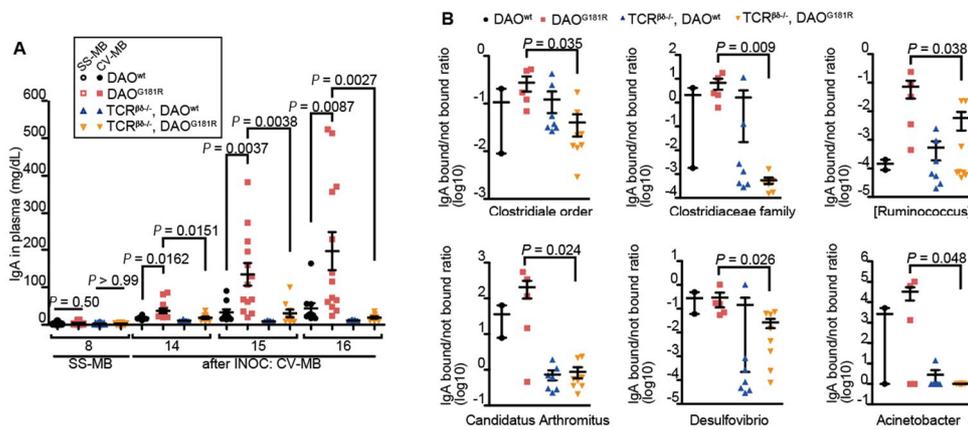


図3 DAOG181R マウスでは T 細胞依存的に IgA 産生が誘導される

続いてナイーブ B 細胞の増殖メカニズムへの T 細胞の関与を検討した。SS-MB 環境で DAO^{G181R} マウスの IgD⁺ IgM⁺ B 細胞の増加が認められたのと同様、TCR を欠損した DAO^{G181R} マウスでも IgD⁺ IgM⁺ B 細胞の増加が観察された。したがってナイーブ B 細胞の増加メカニズムは T 細胞に依存しないと考えられた (図 4A)。T 細胞に依存しないナイーブ B 細胞の増加メカニズムを解析するため、TCR ダブルノックアウトおよびトリプル変異マウスの小腸粘膜固有層のトランスクリプトーム解析を行った。GO 解析の結果、免疫および炎症反応に関連する遺伝子発現の変化を認め、IPA 解析により上流因子として TNF や IFN γ 、IL-1 の関与が示唆された。qPCR でこれらのサイトカインの発現がトリプル変異マウスで増加していること、さらに初期の炎症を誘発する Alarmin、serum amyloid protein などの増加も確認された (図 4B, C)。

炎症反応を惹起する腸内細菌代謝物を網羅的に解析するため、小腸内容物のメタボローム解析を行った。しかしながら質量分析装置によるメタボローム解析では DAO と関連することが知られるの変化を確認することができなかった。一方、DAO マウスでは血液および小腸粘膜上皮組織のも D-アラニンが増加することが確認された (図 4D)。D-アラニンは腸内細菌の代表的な代謝物であるが、免疫細胞に対する影響は明らかでなかった。そこで小腸粘膜より分離した免疫細胞に D-アラニン进行处理したところ、TNF の増加を認めた (図 4E)。なかでも CD11b⁺ マクロファージから TNF が産生されていることを確認した (図 4F)。続いてマクロファージと B 細胞が共存する腹腔の細胞を用いて D-アラニンの B 細胞への影響を検討したところ、マクロファージ共培養の環境で B 細胞の生存が亢進することを確認した (図 4G)。すなわち D-アラニンはマクロファージを刺激して産生される TNF や IL-1 などのサイトカインを介して B 細胞の生存に影響を与えていると考えられた。

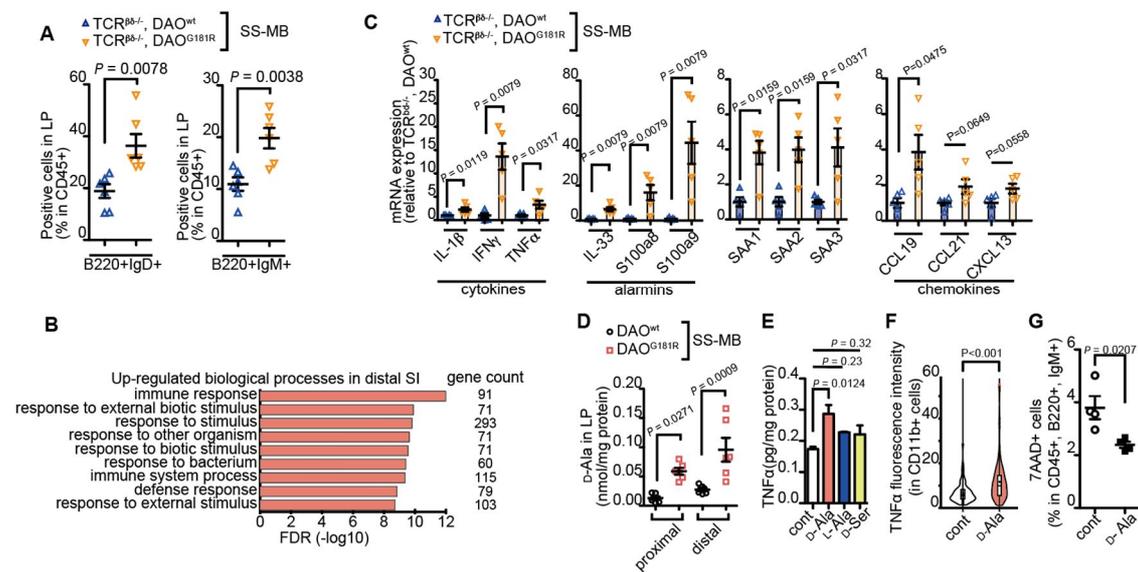


図4. D-アラニンはマクロファージからの炎症性サイトカイン放出を促進し、B細胞の生存を亢進させる

(2)国内外における位置づけとインパクト

細菌細胞壁の構成要素や細菌外膜成分などが哺乳類などの真核生物の細胞に発現するパターン認識受容体により感知されて免疫応答を惹起することは広く知られている。生物の進化の過程でバクテリアは D-アミノ酸を利用し、真核生物は利用しない方向に進んできた。すなわち D-アミノ酸は古くからのバクテリアに特徴的な代謝物である。しかしながら D-アミノ酸が真核生物の免疫に与える影響はほとんど明らかにされていない。今回我々は DAO 活性欠損マウスを解析することで、DAO が腸内細菌叢を制御しているだけでなく、小腸粘膜で B 細胞から IgA 産生形質細胞への分化を制御していることを明らかにした。そのメカニズムとして、細胞壁を持つ全てのバクテリアが産生する D-アラニンがマクロファージを刺激することで B 細胞の分化を制御することを世界で初めて明らかにした。さらに IgA 腎症モデルマウスである HIGA マウスでは DAO 活性が失われていること、HIGA マウスの DAO 活性が IgA 産生と関連していることを発見した。

(3)今後の展望

HIGA マウスで DAO 活性が失われていることから、dysbiosis が IgA の過剰産生を誘導していると考えられる。Dysbiosis を制御することで IgA 産生を抑えることができれば IgA 沈着の抑制と、それらに起因する腎臓の炎症病態を改善できる可能性がある。現在、HIGA マウスの腸内細菌叢を変化させることで dysbiosis の改善と腎臓の表現系への影響を確認している。

また、本研究では十分に解明できなかった D-アラニンの認識メカニズムについて明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Suzuki Masataka, Gonda Yusuke, Yamada Marina, Vandebroek Arno A., Mita Masashi, Hamase Kenji, Yasui Masato, Sasabe Jumpei	4. 巻 9
2. 論文標題 Serum d-serine accumulation after proximal renal tubular damage involves neutral amino acid transporter Asc-1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-019-53302-2	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 -
1. 著者名 Sasabe Jumpei, Suzuki Masataka	4. 巻 9
2. 論文標題 Emerging Role of D-Amino Acid Metabolism in the Innate Defense	5. 発行年 2018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.2018.00933	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Sasabe Jumpei, Suzuki Masataka	4. 巻 68
2. 論文標題 Distinctive Roles of D-Amino Acids in the Homochiral World: Chirality of Amino Acids Modulates Mammalian Physiology and Pathology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Keio Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 1~16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2302/kjm.2018-0001-IR	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 鈴木将貴, 権田裕亮, 笹部潤平	4. 巻 9
2. 論文標題 D-セリン -腎疾患バイオマーカーとしての可能性.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腎臓内科・泌尿器科	6. 最初と最後の頁 327-333
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 Suzuki M, Sujino T, Chiba S, Harada Y, Goto M, Takahashi R, Mita M, Hamase K, Kanai T, Ito M, Waldor MK, Yasui M, Sasabe J.	4. 巻 -
2. 論文標題 Host-microbe cross-talk governs amino acid chirality to regulate survival and differentiation of B cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	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) 10.1126/sciadv.abd6480.	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4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Suzuki M, Goto M, Takahashi R, Ito M, Aiso S, Sasabe J
2. 発表標題 Loss of DAO activity triggers IgA nephropathy through disturbed mucosal immunity
3. 学会等名 IMMUNOLOGY 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki M, Sujino T, Goto M, Takahashi R, Ito M, Yasui M, Sasabe J.
2. 発表標題 DAO regulates mucosal IgA production through modulation of gut microbiota and B cell proliferation
3. 学会等名 国際D-アミノ酸学会(IDAR2019)(国際学会)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木将貴
2. 発表標題 DAO controls IgA production through both T cell dependent and independent pathway.
3. 学会等名 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Suzuki M
2. 発表標題 Bacterial D-amino acids regulate mucosal IgA production
3. 学会等名 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------	---------