

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15674

研究課題名（和文）新生児期早期の腸内細菌叢が制御性T細胞を介して宿主免疫に及ぼす影響

研究課題名（英文）The impact of regulatory t cells on host immunity through microbiota in the early neonatal period

研究代表者

早川 誠一（Hayakawa, Seiichi）

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：60815314

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：細菌叢の差異が示されている帝王切開児と経膣分娩児を対象とし、制御性T細胞（Treg）、T cell receptor（TCR）レパトア解析および乳児期の臨床症状を評価した。帝王切開児と経膣分娩児において新生児期Tregに差はなく、TCRレパトアのパターンには軽微な差を認めた。乳児期のアレルギー疾患発症例において組織学的絨毛膜羊膜炎が多い傾向を認めたが、分娩様式で差はなかった。分娩様式と新生児期Treg、TCRレパトア、アレルギー疾患発症との関連は示されなかったが、生後早期の炎症が乳児期のアレルギー疾患発症へ関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究の目的である帝王切開で出生した児と経膣分娩で出生した児における新生児期の免疫の変化や乳児期のアレルギー疾患発症などの臨床経過における違いは同定できなかった。しかし、本研究で得た新生児期の制御性T細胞やT細胞受容体レパトアの変化の結果は、新生児期の標準範囲となりうる。今後の免疫が関与する新生児疾患の免疫状態の変化の評価に、本結果が利用できる可能性がある点において、意義のある成果と考えている。

研究成果の概要（英文）：We analyzed Tregs and the T-cell receptor (TCR) repertoire in the neonatal period and evaluated the clinical manifestations in infancy to reveal the relationship between immune homeostasis and differences in postnatal bacterial flora. The subjects were infants born either by cesarean section (CS) or vaginal delivery (VD). There were no differences in the number of Tregs, and a slight but not significant difference in the TCR repertoire pattern, when comparing the cells in infants born by CS to those in infants born by VD. There was no association between the mode of delivery and the development of allergic disorders. Histological chorioamnionitis tended to be more common in infants who developed an allergic disorder in infancy.

We did not identify any association between the development of allergic diseases and the mode of delivery, Tregs, or TCR repertoires in the neonatal period. However, early postnatal inflammation may be involved in the development of allergic disorders in infancy.

研究分野：小児科学

キーワード：新生児 制御性T細胞 宿主免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生後早期の環境や微生物抗原への曝露が、その後の長期間にわたる免疫の恒常性に影響を与え、アレルギー疾患や自己免疫疾患などへの感受性を変化させる可能性が提唱されている(文献1)。これを支持する疫学研究の一つとして、帝王切開で出生した児では、アレルギー疾患の発症が増加することが報告されている(文献1-3)。また、経膣分娩で出生した児では母体の膣常在菌と類似した腸内細菌叢を形成するのに対し、帝王切開で出生した児では皮膚常在菌と類似した腸内細菌叢を形成するとされており、分娩様式による細菌叢の差異が報告されている(文献2)。

制御性T細胞(Treg)は、CD4陽性ヘルパーT細胞のサブセットの一つで、広範な免疫細胞の免疫応答を抑制的に制御することで免疫機構の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。Tregは自己免疫疾患、アレルギー疾患、妊娠など免疫が関連する多彩な病態へも関与する(文献4)。申請者は過去に、外来抗原への曝露が少ない子宮内から多彩な外来抗原に曝露される子宮外へと、生活環境が劇的に変化する新生児期に着目して研究を行い、新生児期早期にTregの中でも免疫抑制効果の強い分画である活性化されたTreg(activated Treg)が有意に増加することを発見した。この結果から、出生後の胎外環境への変化に適応するために必要な免疫応答の抑制に、Tregが重要な役割を果たしている可能性を示した。また、Tregと腸内細菌叢の関連性は過去に多くの研究で示されており、*Clostridium*が産生する酪酸がTregを誘導すること(文献5)、無菌マウスでは大腸のTregが減少することなどが知られている(文献6)。

経膣分娩児と、帝王切開児では出生早期の腸内細菌叢が異なり、この細菌叢の相違がアレルギー疾患発症に関連する可能性があること、そして、腸内細菌叢がTregの誘導に密接に関与すること、さらにTregは免疫反応を制御しておりアレルギー疾患発症などに影響を及ぼすことといった知見から、経膣分娩にて出生した児と帝王切開にて出生した児では、腸内細菌叢の差異により新生児期におけるTregの反応が変化し、その結果として乳児期における免疫調節に影響を与える可能性を考えている。

【参考文献】

- 1) Torow N, et al. J Immunol. 198: 557-563, 2017
- 2) Tamburini S, et al. Nat Med. 22: 713-22, 2016
- 3) Kristensen K, et al. J Allergy Clin Immunol. 137: 587-90, 2016
- 4) Sakaguchi S, et al. Nat Rev Immunol. 10:490-500, 2010
- 5) Atarashi K, et al. Nature. 500: 232-6, 2013
- 6) Atarashi K, et al. Science. 33: 337-41, 2011

2. 研究の目的

近年、アレルギー疾患発症の増加や低年齢化により、アレルギー疾患発症に影響する要因の検討や発症予防の研究が行われている。我々は、生後早期である新生児期の免疫の変化において免疫応答を抑制的に制御するTregに着目して研究を行っているが、利用できる細胞数の制限などの理由から新生児期の末梢血を用いたTregの検討は少なく、新生児期のTregの変化に関しては明らかとされていないことが多い。本研究では、出生直後に予想される腸内細菌叢の相違に起因するTregの数的、ないしは質的な相違が、後のアレルギー性疾患の発症に結びつくとの仮説を立て検証する。具体的には、腸内細菌叢の差異が示されている帝王切開より出生した児と、経膣分娩で出生した児の2群間において、新生児期早期のTregの変化と乳児期におけるアレルギー疾患発症との関連性を比較することで、乳児期のアレルギー疾患発症に影響する因子を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

2019年3月～2021年3月までに広島大学病院新生児集中治療室（NICU）へ入院となった34例に対して、両親より同意を取得後に臍帯血、新生児期早期（日齢7～8）末梢血、新生児期後期（生後2～4週）末梢血にて制御性T細胞、T-cell receptor（TCR）レパトアの解析を施行した。同時期に広島大学病院NICUへ入院した36例を追加して、臨床的背景の検討を行った。背景の検討は、在胎週数、出生体重、APGARスコア5分値、性別、分娩様式、出生後の抗菌剤投与の有無、栄養方法、母体へのステロイド投与の有無、組織学的絨毛膜羊膜炎（histological chorioamnionitis: HCAM）の有無、乳児期におけるアレルギー症状について診療録を用いて後方視的に行った。乳児期のアレルギー症状については、6ヶ月以上経過観察が確認された症例に限定し皮膚症状（皮膚乾燥および湿疹）喘息症状（喘鳴、長引く咳嗽）に対して内服または外用による継続的な治療を行っている症例をアレルギー症状有りとした。

Tregの数的解析として、CD4+リンパ球中のCD4+CD25+FOXP3+ TregおよびCD4+CD25+CD127dim Tregの割合を評価した。臍帯血はLymphoprep™（VERITAS）を用いて単核球に分離後に細胞表面染色を行った。新生児早期および後期末梢血は全血を用いて細胞表面染色後に、EasyLyse™（DAKO）により赤血球溶血を行った。FOXP3は細胞表面染色後にHuman FoxP3 Buffer Set（BD）を用いて説明書に従って細胞内染色を行った。TCRレパトア解析は、TCR V antibodiesを用いてCD4+リンパ球、CD4+CD25-細胞（conventional T cells: Tcon）およびCD4+CD25+CD127dim Tregそれぞれの分画におけるTCR Vファミリーの使用頻度を解析した。抗体はanti-CD4-FITC（BD）、anti-CD4-PerCP/Cyanine5.5（BioLegend）、anti-CD25-PE（BD）、anti-CD25-V450（BD）、anti-CD127-APC（BioLegend）、Multi-analysis TCR V antibodies（Beckman Coulter）を細胞表面染色に、anti-FOXP3-Alexafluor647（BD）を細胞内染色に使用し、FACSVerse（BD Biosciences）、BD FACSuite™ softwareを用いてフローサイトメトリーにて解析した。

Treg機能解析を以下の手順で行った。Treg isolation kit（Miltenyi Biotec）を用いて、CD4+CD25-細胞（Tcon）とCD4+CD25+細胞（Treg）を分離し、Tconは、CellTrace™violet Cell Proliferation Kit（Thermo Fisher Scientific）にて標識した。TconとTregを1:0、1:1、4:1の比率で混合し、CD2、CD3、CD28を結合したMACSiBead（Treg suppression inspector, miltenyi biotec）にて刺激し5日間培養を行った。細胞分裂したTconの割合をフローサイトメトリーで解析した。Tcon単独培養とTregと共培養との比較により、TregによるTcon細胞増殖抑制機能を評価した。

臍帯血、新生児早期、後期末梢血を用いたTregおよびTCRレパトア解析では、Bonferroni補正Mann-Whitney検定を、2群間の比較ではMann-Whitney検定またはカイ二乗検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

研究は広島大学疫学研究倫理審査委員会の承認を受けている（早産児における免疫学的側面からの病態解析、E-1560）

4. 研究成果

（1）症例の臨床背景の検討

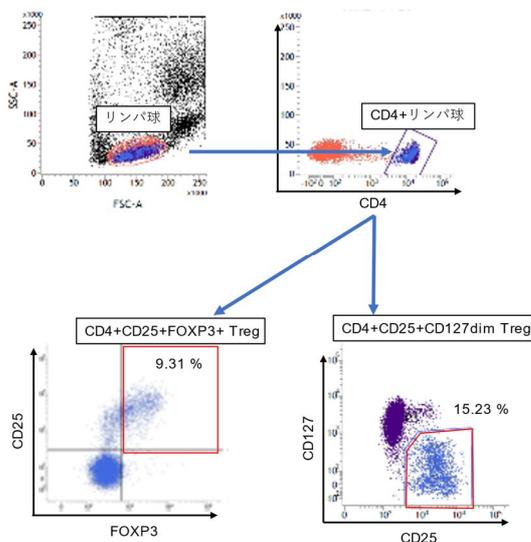
帝王切開群と経膈分娩群における背景の検討では、在胎週数、出生体重、APGARスコア5分値、性別、出生後の抗菌剤投与、栄養方法、母体ステロイド投与、乳児期のアレルギー症状において2群間に有意差は認めなかった。HCAMは経膈分娩群で有意に多かった。6ヶ月以上の経過観察が確認された36例で乳児期におけるアレルギー症状の有無と新生児期の臨床症状との関連を追加して検討した。有意差は認めなかったが、アレルギー症状を呈した群でHCAMが多い傾向を認め

た（アレルギー症状有り群 61.5 % (8/13)、アレルギー症状無し群 26 % (6/23)、 $p=0.08$ ）。分娩様式と乳児期のアレルギー症状発症との関連は認めなかった。

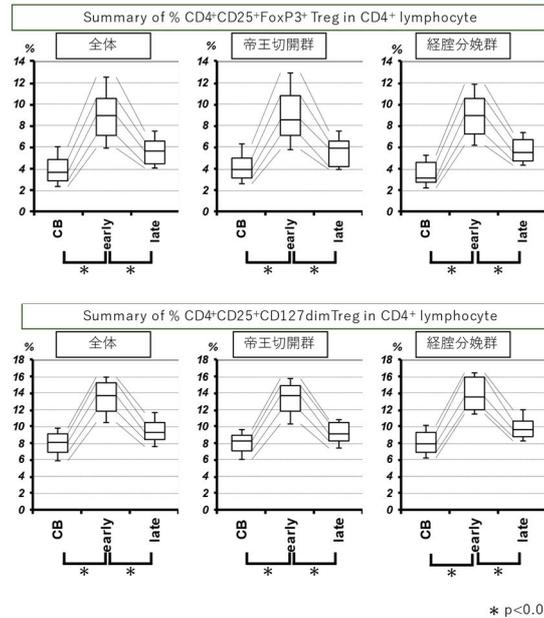
(2) 新生児期における制御性 T 細胞の解析

Fig.1

(A)



(B)

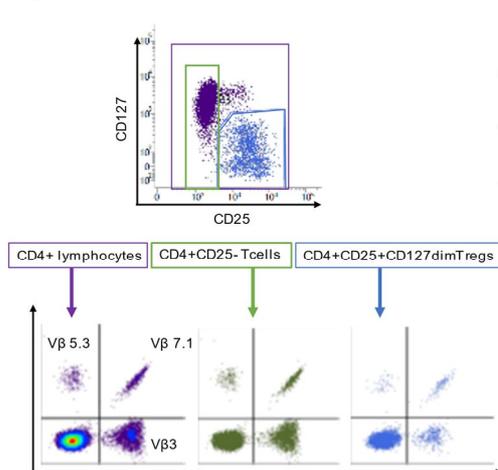


フローサイトメトリーを用いて CD4 陽性リンパ球中の CD4+CD25+FOXP3+ Treg および CD4+CD25+CD127dim Treg の割合を解析した (Fig.1 A)。全体、帝王切開群、経産分娩とも、臍帯血 (CB) および新生児期後期 (late) と比し、新生児期早期 (early) で、CD4+CD25+FOXP3+ Treg と CD4+CD25+CD127dim Treg は有意に増加した。帝王切開群と経産分娩群との比較では、CB、early、late いずれにおいても CD4+CD25+FOXP3+ Treg および CD4+CD25+CD127dim Treg の割合に有意差は認めなかった (Fig.1 B)。

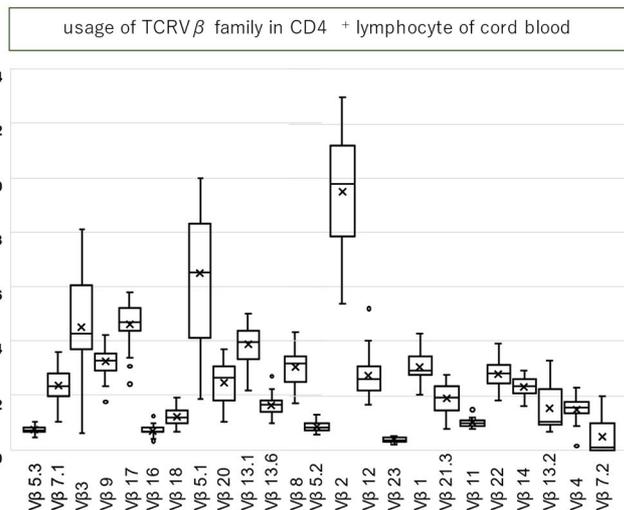
(3) 新生児における TCR レパトアの解析

Fig.2

(A)



(B)



フローサイトメトリーを用いて、臍帯血、新生児早期末梢血、新生児後期末梢血中の CD4+リンパ球、Tcon、Treg における TCRV ファミリーの使用頻度を測定した (Fig.2 A)。臍帯血中 CD4+リンパ球における TCRV ファミリーの使用頻度を示す (Fig.2 B)。

Fig.3

				CD4	Tcon	Treg					CD4	Tcon	Treg
Vβ 5.3	early						Vβ 20	early			Vβ 1	early	有意に増加
	late					late			late	有意に増加			
Vβ 7.1	early					Vβ 13.1	early	有意に増加	有意に増加	Vβ 21.3	early	有意に増加	
	late						late	有意に増加	late		有意に増加		
Vβ 3	early	有意に増加	有意に増加			Vβ 13.6	early			Vβ 11	early	有意に増加	
	late	有意に増加	有意に増加				late		late		有意に増加		
Vβ 9	early					Vβ 8	early	有意に増加	有意に増加	Vβ 22	early	有意に増加	
	late						late		late		有意に増加		
Vβ 17	early					Vβ 5.2	early	有意に増加	有意に増加	Vβ 14	early		
	late						late		late		有意に低下		
Vβ 16	early					Vβ 2	early	有意に増加		Vβ 13.2	early	有意に増加	
	late						late		late				
Vβ 18	early					Vβ 12	early			Vβ 4	early	有意に増加	
	late						late		late		有意に増加		
Vβ 5.1	early					Vβ 23	early			Vβ 7.2	early	有意に増加	
	late						late	有意に増加	late		有意に増加		

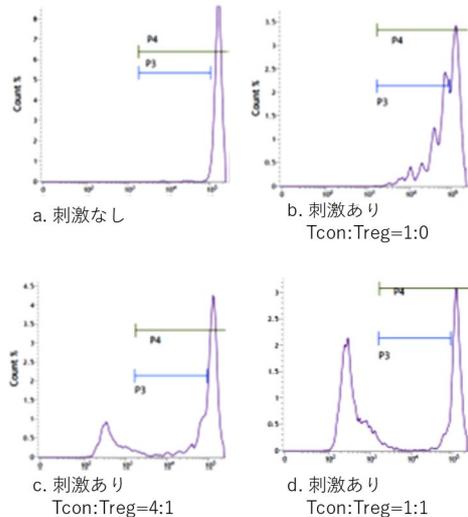
CD4+リンパ球、Tcon、Treg における TCRV ファミリーの使用頻度を、臍帯血との変化として解析した。臍帯血と比較すると、複数の TCRV ファミリーの使用頻度が有意に増加していた。Tcon に比べて Treg では使用頻度の変化は少なかった (Fig.3)。TCRV ファミリー使用頻度の変化のパターンにおいて、帝王切開群と経膾分娩群の差は軽微であった。

(4) 制御性 T 細胞機能解析

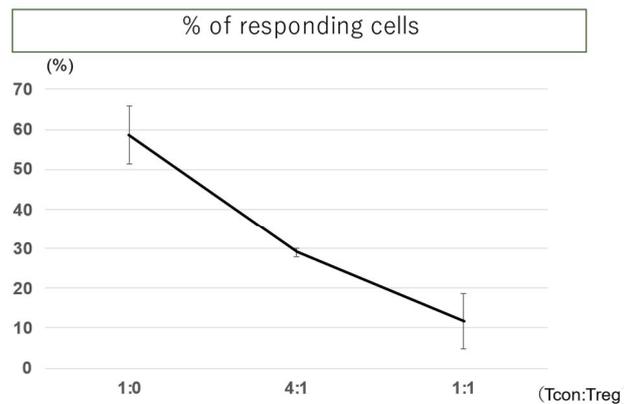
Fig.4

(A)

P4: Tcon全体, P3:細胞分裂したTcon



(B)



Treg と Tcon を異なる比率で混合し Beads を用いた刺激に対する Tcon の増殖をフローサイトメトリーにて解析した (Fig.4 A)。Treg の比率に依存して Tcon の増殖は抑制され (Fig4 B) 日齢 7 において増加している Treg は抑制機能を有する機能的 Treg であることが示された。しかし、細胞の条件や手技の影響により信頼できる再現性に乏しく、定量的な評価は困難であった。

以上の結果からは、帝王切開群と経膾分娩群において、Treg 数および機能、臨床経過の相違を同定することはできなかった。アレルギー発症例で HCAM が多い傾向を認め、出生後の炎症が乳児期のアレルギー発症に影響している可能性が示唆された。この事に関しては、HCAM を対象として、更なる検討が必要である。本研究の Limitation として小規模の検討であったこと、経膾分娩群で組織学絨毛膜羊膜炎が有意に多く 2 群間で背景が一致していないことが挙げられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 S Goda, S Hayakawa, S Karakawa, S Okada, H Kawaguchi, M Kobayashi	4. 巻 204
2. 論文標題 Possible involvement of regulatory T cell abnormalities and variational usage of TCR repertoire in children with autoimmune neutropenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Exp Immunol.	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cei.13559.	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 -

1. 著者名 Tamura M, Satoh-Takayama N, Tsumura M, Sasaki T, Goda S, Kageyama T, Hayakawa S, Kimura S, Asano T, Nakayama M, Koseki H, Ohara O, Okada S, Ohno H, Kobayashi M	4. 巻 32
2. 論文標題 Human gain-of-function STAT1 mutation disturbs IL-17 immunity in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 259-272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz079.	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 -

1. 著者名 Charlotte Schwab et al. Seiichi Hayakawa (81人中23番目)	4. 巻 142
2. 論文標題 Phenotype, penetrance, and treatment of 133 cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-insufficient subjects	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 1932-1946
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2018.02.055.	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 -

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

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