

平成 21年 5月 20日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580148
 研究課題名 (和文) 腸内で共生または排除が誘導される細菌による腸管免疫系応答と遺伝子発現の解析

研究課題名 (英文) The gut immunoresponses and the genetic expression induced by intestinal commensal bacteria or pathogenic bacteria

研究代表者

細野 朗 (HOSONO AKIRA)
 日本大学・生物資源科学部・准教授
 研究者番号：70328706

研究成果の概要：

腸管には膨大な数の腸内共生菌が生息する一方で、有害な病原微生物の排除を行う免疫グロブリン A (IgA) 産生が調節されている。本研究は、マウスの腸内共生菌の優性菌である *Bacteroides* と *Lactobacillus* に注目し、IgA 産生がどのように調節されているのかを細胞分子生物学的な手法によって解析した。その結果、*Bacteroides* が IgA 産生細胞への分化を強く誘導する機構が明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：免疫学・微生物・遺伝子・腸内共生細菌・IgA

1. 研究開始当初の背景

腸管粘膜は主に免疫グロブリン (Ig) A の産生応答によって感染防御を行っている。一方で、腸管には 100 兆個以上もの腸内細菌が積極的な排除を受けずに宿主と共生し、完全に排除されることがなく腸内免疫系の発達に関与していることが知られている。既に腸内細菌の存在しない無菌環境下飼育 (GF) マウスと通常環境下飼育 (CV) マウスとの比較により、腸内細菌が IgA 産生細胞の数を増加させ IgA 産生応答を亢進することがわかっている。しかし、これまでは腸内細菌が腸管での IgA を促進することは腸内細菌の主要存在部

位である大腸部位における報告は極めて少なく、腸内細菌がどのような機序で大腸での IgA 産生応答を制御しているのかは不明であった。特に、腸内には 500 種以上の腸内共生細菌が存在し相互作用を行いながら複雑な共生系を成立させていると考えられるため、特定の腸内共生細菌が与える腸管免疫系への影響について厳密に解析することは非常に難しく、腸内細菌の菌種の違いと IgA 産生に対するその作用についてはほとんど検討されていないのが現状である。

2. 研究の目的

腸内共生菌は宿主において完全に排除されることなく腸管内に共生できる細菌群であるが、IgA 産生応答を腸内共生菌がどのように惹起しているのか、さらに IgA 産生応答の誘導に強く関与している腸内共生菌について解明できれば、標的となる腸内共生菌を宿主において作用させることにより、腸粘膜での IgA 産生応答を活性化させ感染防御に役立てることが期待されている。そこで、本研究は、腸内細菌の分布が異なる小腸と大腸において特定の腸内共生細菌が IgA 産生誘導におよぼす影響を明らかにすることをめざし、特に、これまで未解明であった大腸部位での IgA 産生機構の解明への腸内共生細菌の影響を細胞分子レベルでの解析により行った。

3. 研究の方法

代表的なマウス腸内共生菌である *Bacteroides* と *Lactobacillus* の加熱 (85°C、10 分間) 菌体を用い、IgA 産生に与える影響を比較した。すなわち、Balb/c マウスよりパイエル板細胞を採取し、この細胞に *B. acidifaciens* 3 菌株 (B7、B18、B23) と *Lactobacillus* 3 菌株 (LA: *L. johnsonii* 129、LM: *L. murinus* 91、LF: *L. reuteri* 106) を添加して共培養した。そして、培養 7 日後の IgA 陽性細胞の割合をフローサイトメーターで、さらに培養上清中の総 IgA 量を ELISA 法でそれぞれ定量した。また、B 細胞中 activation-induced cytidine deaminase (AID) の mRNA 発現量を解析した。

さらに、*B. acidifaciens*、*L. johnsonii* をそれぞれ無菌マウスに単独定着させたマウス (BA・LA マウス) を作製し、腸管組織中 IgA 産生量、IgA 産生細胞の割合を解析した。

4. 研究成果

マウスパイエル板細胞と腸内共生菌との共培養 7 日後の培養上清中に分泌された総 IgA 産生量は、*Lactobacillus* よりも *Bacteroides* の方が有意に高かった。このとき IgA 産生細胞も *Bacteroides* の方が *Lactobacillus* よりも高い割合を示した。また、IgM から IgA へのクラススイッチに必須の酵素である AID の経時的な mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により解析したところ、*Bacteroides* 群の方が *Lactobacillus* 群よりも有意に AID の mRNA 発現量が高いことが明らかとなった。以上の結果から、腸内共生菌の中には IgA 産生を促進する菌が存在し、その作用は菌種間で異なることが明らかとなった。特に、*Bacteroides* 群は *Lactobacillus* 群に比べて AID の発現を強く増加させることで IgM から IgA へのクラススイッチを促進し、IgA 産生細胞を増加させる特徴をもつことが示唆された。

さらに、B23 株、LA 株をそれぞれ GF マウスに単独定着させたマウス (BA マウス、LA

マウス) を作製し、*in vivo*での各腸内共生菌の IgA 産生への作用を解析した。その結果、大腸組織中に分泌された IgA 産生量は BA マウスが LA、GF マウスに比べて有意に高値であった。また、BA マウスでは GF、および LA マウスよりも大腸粘膜固有層中に IgA⁺細胞数が多く発現していることを組織観察から明らかにした。さらに大腸リンパ小節の胚中心の形成は GF、LA ではほとんどみられなかったのに対し、CV マウスと BA マウスでは胚中心の形成が観察された。これらの結果から、*in vitro*で IgA 産生を強く誘導する作用がみられた B23 は *in vivo*でもその作用が確認された。また、B23 は大腸リンパ小節の B 細胞の分化の場である胚中心の形成を促し、IgA 産生細胞を増加させていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1) K Kasakura, K Takahashi, T Aizawa, A Hosono, and S Kaminogawa. A TLR2 ligand suppresses allergic inflammatory reactions by acting directly on mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (in press). (査読有)
- 2) M Tsuda, A Hosono, T Yanagibashi, S Hachimura, K Hirayama, Y Umesaki, K Itoh, K Takahashi, S Kaminogawa. Intestinal *Bifidobacterium* association in germ-free T cell receptor transgenic mice down-regulates dietary antigen-specific immune responses of the small intestine but enhances those of the large intestine. *Immunobiol*, 214 (4), 279-289 (2009). (査読有)
- 3) T Yanagibashi, A Hosono, A Oyama, M Tsuda, S Hachimura, Y Takahashi, K Itoh, K Hirayama, K Takahashi, and S Kaminogawa. *Bacteroides* induce higher IgA production than *Lactobacillus* by increasing activation-induced cytidine deaminase expression on B cells in murine Peyer's patches. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 (2), 372-377 (2009). (査読有)
- 4) T Yanagibashi, A Hosono, M Tsuda, S Hachimura, K Hirayama, K Itoh, K Takahashi, and S Kaminogawa. *In vitro*

- observation of the effect of intestinal bacteria on IgA production by immunocytes in the large intestine: comparison between germfree and conventional mice. *Animal cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 15: 257-262 (2008). (査読有)
- 5) Y Hiramatsu, A Hosono, Y Nakanishi, M Muto, S Hachimura, R Sato, K Takahashi, and S Kaminogawa. Immunomodulatory effects of orally administered *Bifidobacterium* components on intestinal lymphoid tissues. *Animal cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 15: 105-110 (2008). (査読有)
- 6) M Tsuda, A Hosono, T Yanagibashi, S Hachimura, K Hirayama, Y Umesaki, K Itoh, K Takahashi, and S Kaminogawa. Murine intestinal bacteria modulate antigen-specific cytokine production by intestinal immune cells derived from germ-free TCR-transgenic mice. *Animal cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 15: 111-116 (2008). (査読有)
- 7) Y Hiramatsu, A Hosono, K Takahashi and S Kaminogawa, *Bifidobacterium* components have immunomodulatory characteristics dependant on the method of preparation. *Cytotechnol*, 55 (2-3), 79-87 (2007). (査読有)
- 8) M Tsuda, A Hosono, T Yanagibashi, S Hachimura, K Hirayama, K Itoh, K Takahashi and S Kaminogawa, Prior stimulation of antigen-presenting cells with *Lactobacillus* regulates excessive antigen-specific cytokine responses in vitro when compared with *Bacteroides*. *Cytotechnol*, 55 (2-3), 89-101 (2007). (査読有)
- 9) T Hashizume, F Momoi, T Kurita-Ochiai, S Kaminogawa, A Hosono, K Kataoka, N Shinozaki-Kuwahara, M N Kweon and M Yamamoto, Isolated lymphoid follicles are not IgA inductive sites for recombinant *Salmonella*. *Biochem Biophys Res Commun*, 360 (2), 388-393 (2007). (査読有)
- 10) T Fukasawa, K Murashima, I Matsumoto, A Hosono, H Ohara, C Nojiri, J Koga, H Kubota, M Kanegae, S Kaminogawa, K Abe, and T Kono, Identification of marker genes for intestinal immunomodulating effect of a fructooligosaccharide by DNA microarray analysis. *J Agric Food Chem*, 55 (8), 3174-3179 (2007). (査読有)
- [学会発表] (計 33 件)
- 1) 津田真人, 細野朗, 柳橋努, 松本一幸, 八村敏志, 伊藤喜久治, 平山和宏, 高橋恭子, 上野川修一, 腸内共生細菌による刺激は腸管免疫系T細胞の食品抗原に対する低応答性を促進する. 日本農芸化学会2009年度大会 (2009年3月27-29日, 福岡).
- 2) 平松靖浩, 細野朗, 高橋恭子, 上野川修一, 加熱処理した*Bifidobacterium*菌体は特徴的なCD4⁺T細胞応答を誘導する. 日本農芸化学会2009年度大会 (2009年3月27-29日, 福岡).
- 3) 柳橋努・細野朗・大山克人・津田真人・八村敏志・高橋宜聖・伊藤喜久治・平山和宏・高橋恭子・上野川修一, *Bacteroides*はB細胞のAID発現を誘導し腸管IgA産生を亢進する. 日本農芸化学会2009年度大会 (2009年3月27-29日, 福岡).
- 4) 今野拓馬, 細野朗, 平松靖浩, 八村敏志, 高橋恭子, 上野川修一, 盲腸リンパ節細胞は小腸パイエル板細胞に比べて菌体成分に対する免疫応答が制御された特徴をもつ. 日本農芸化学会2009年度大会 (2009年3月27-29日, 福岡).
- 5) 杉由高・高橋恭子・細野朗・上野川修一, 腸管上皮細胞におけるTollip遺伝子の発現制御機構. 日本農芸化学会2009年度大会 (2009年3月27-29日, 福岡).
- 6) 松本一幸, 細野朗, 柳橋努, 津田真人, 八村敏志, 伊藤喜久治, 平山和宏, 高橋恭子, 上野川修一, 腸内共生菌は小腸パイエル板のCD11c⁺細胞の発現を高めて腸管免疫系を修飾する. 日本農芸化学会2009年度大会 (2009年3月27-29日, 福岡).
- 7) 大山克人・細野朗・柳橋努・津田真人・八村敏志・高橋宜聖・伊藤喜久治・平

- 山和宏・高橋恭子・上野川修一, マウス腸内共生菌が誘導する腸管IgA産生応答についてのin vitroでの解析. 日本農芸化学会2009年度大会 (2009年3月27-29日, 福岡).
- 8) 松本一幸, 細野朗, 柳橋努, 津田真人, 八村敏志, 伊藤喜久治, 平山和宏, 高橋恭子, 上野川修一, 腸内共生菌は小腸パイエル板抗原提示細胞の細胞応答を修飾する. 第42回日本無菌生物ノートバイオロジー学会 (2009年1月23-24日, 大阪).
 - 9) M Tsuda, A Hosono, T Yanagibashi, S Hachimura, K Itoh, K Takahashi and S Kaminogawa. Gut commensal bacteria induce to down-regulate cytokine responses to oral antigen by Peyer's patch cells. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 (2008年12月1-3日, 京都).
 - 10) T Yanagibashi, A Hosono, S Hachimura, Y Takahashi, K Itoh, K Takahashi, and S Kaminogawa. *Bacteroides acidofaciens* strongly induce IgA production by promoting germinal center formation in the large intestine. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 (2008年12月1-3日, 京都).
 - 11) K Kasakura, K Takahashi, A Hosono, and S Kaminogawa. Suppressive effects of TLR2 ligands on allergic reactions of mast cells. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 (2008年12月1-3日, 京都).
 - 12) K Takahashi, Y Sugi, A Hosono, S Kaminogawa, Regulatory mechanisms of TLR4 gene transcription in intestinal epithelial cells. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 (2008年12月1-3日, 京都).
 - 13) Y Sugi, K Takahashi, A Hosono, S Kaminogawa, IEC-specific regulation of Tollip gene expression. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 (2008年12月1-3日, 京都).
 - 14) A Oyama, A Hosono, T Yanagibashi, M Tsuda, S Hachimura, Y Takahashi, K Itoh, K Hirayama, K Takahashi, and S Kaminogawa. Comparison of Immunoglobulin A induction by commensal bacteria, *Bacteroides* and *Lactobacillus*. The 21st Annual and International Meeting of the JAACT (JAACT 2008 Fukuoka), Fukuoka, Japan (Nov. 24-27, 2008).
 - 15) T Konno, A Hosono, Y Hiramatsu, S Hachimura, K Takahashi and S Kaminogawa. Comparison of Immunoresponses between cecal patch cells and Peyer's patch cells stimulated by bacterial components. The 21st Annual and International Meeting of the JAACT (JAACT 2008 Fukuoka), Fukuoka, Japan (Nov. 24-27, 2008).
 - 16) 杉由高・高橋恭子・細野朗・上野川修一. 腸管上皮細胞におけるTollip遺伝子の発現制御機構. 第12回腸内細菌学会 (2008年6月12-13日).
 - 17) 津田真人, 細野朗, 柳橋努, 八村敏志, 平山和宏, 伊藤喜久治, 高橋恭子, 上野川修一. 経口摂取した抗原に対する小腸パイエル板のT細胞応答は腸内共生菌によって制御される. 日本食品免疫学会第4回学術大会 (JAFI 2008) (2008年5月13-14日, 東京).
 - 18) 原田岳, 細野朗, 何方, 高橋恭子, 川瀬学, 久保田晃, 平松優, 上野川修一. *Lactobacillus* GG 株と *L. gasseri* TMC0356株の腸管免疫応答に与える影響の違いについて. 日本食品免疫学会第4回学術大会 (JAFI 2008) (2008年5月13-14日, 東京).
 - 19) 今野拓馬, 細野朗, 平松靖浩, 八村敏志, 高橋恭子, 上野川修一. 腸管内の *Bifidobacterium* 菌体は管腔側より盲腸リンパ小節に取り込まれ、免疫応答を修飾する. 日本食品免疫学会第4回学術大会 (JAFI 2008) (2008年5月13-14日, 東京).
 - 20) 柳橋努, 細野朗, 津田真人, 八村敏志, 高橋宜聖, 平山和宏, 伊藤喜久治, 高橋恭子, 上野川修一. 腸内に共生する *Bacteroides* 菌は *Lactobacillus* 菌よりもマウス大腸粘膜におけるIgA産生応答を強く誘導する. 日本食品免疫学会第4回学術大会 (JAFI 2008) (2008年5月13-14日, 東京).

- 21) 梅田幸子, 小川晋平, 高橋宜聖, 山田潔, 細野朗, 辻典子, 戸塚護, 上野川修一, 佐藤隆一郎, 八村敏志. 小腸パイエル板CD3⁺IL-2R⁺細胞のIgA産生誘導能の解析. 日本食品免疫学会第4回学術大会 (JAFI 2008) (2008年5月13-14日, 東京).
- 22) 柳橋努・細野朗・津田真人・八村敏志・高橋宜聖・平山和宏・伊藤喜久治・高橋恭子・上野川修一. 腸内細菌は小腸におけるIgA産生より大腸におけるそれを強く誘導する. 日本農芸化学会2008年度大会 (2008年3月26-29日, 名古屋).
- 23) 津田真人, 細野朗, 柳橋努, 八村敏志, 平山和宏, 伊藤喜久治, 高橋恭子, 上野川修一. 腸内細菌はパイエル板細胞の経口抗原に対するサイトカイン産生の抑制と制御性T細胞の発現を誘導する. 日本農芸化学会2008年度大会 (2008年3月26-29日, 名古屋).
- 24) 杉由高, 高橋恭子, 細野朗, 上野川修一. 腸管上皮細胞におけるTollip遺伝子の発現制御機構. 日本農芸化学会2008年度大会 (2008年3月26-29日, 名古屋).
- 25) 梅田幸子, 高橋宜聖, 小川晋平, 馬淵信行, 山田潔, 細野朗, 辻典子, 戸塚護, 上野川修一, 佐藤隆一郎, 八村敏志. 小腸CD3⁺IL-2R⁺細胞はpoly I:C刺激とインフルエンザウイルス感染に応答してIL-5を高発現する. 日本農芸化学会2008年度大会 (2008年3月26-29日, 名古屋).
- 26) K Takahashi, A Hosono, S Kaminogawa, Regulation of TLR gene expression in intestinal epithelial cells/腸上皮細胞におけるTLR遺伝子の発現制御. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 (2007年11月20-22日, 東京).
- 27) G Harata, K Takahashi, F He, A Kubota, A Hosono, and S Kaminogawa, Directly effects of *Lactobacillus* GG and *L. gasseri* TMC0356 on mast cells. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 (2007年11月20-22日, 東京).
- 28) G Harata, F He, M Kawase, A Kubota, M Hiramitsu, A Hosono, K Takahashi, and S Kaminogawa, Differentiated implication of *Lactobacillus* GG and *L. gasseri* TMC0356 on gut-associated immune lymphoid tissues. The 4th Asian Congress on Lactic Acid Bacteria, Shanghai, China (Oct. 14-16, 2007).
- 29) M Tsuda, A Hosono, T Yanagibashi, S Hachimura, K Hirayama, K Itoh, K Takahashi and S Kaminogawa, Murine intestinal commensal *Lactobacillus* modulates antigen-specific cytokine production via antigen-presenting cells differently to *Bacteroides*. 13th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2007), Tokyo, Japan (Jul. 9-12, 2007).
- 30) T Yanagibashi, A Hosono, M Tsuda, S Hachimura, Y Takahashi, K Hirayama, K Itoh, K Takahashi, and S Kaminogawa, *Bacteroides acidofaciens* induces differentiation of IgM⁺ cells into IgA-plasma cells from the large intestine. 13th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2007), Tokyo, Japan (Jul. 9-12, 2007).
- 31) 平松靖浩, 細野朗, 高橋恭子, 上野川修一. 処理条件の異なる*Bifidobacterium* 菌体調製物とその免疫修飾作用の相関について. 日本動物細胞工学会2007年度大会 (JAACT 2007) (2007年7月3-4日, 高崎).
- 32) 相澤奉文, 高橋恭子, 笠倉和巳, 細野朗, 上野川修一. 腸内細菌由来菌体成分によるマスト細胞のアレルギー応答の調節. 日本動物細胞工学会2007年度大会 (JAACT 2007) (2007年7月3-4日, 高崎).
- 33) 平松靖浩, 細野朗, 高橋恭子, 上野川修一. 調製法の異なる*Bifidobacterium* 菌体成分が修飾する免疫応答の特徴. 第11回腸内細菌学会 (2007年6月14-15日, 東京).

〔図書〕(計 4件)

- 1) 細野朗. 日本食物繊維学会監修: 食物繊維 基礎と応用. 東京: 第一出版, 2008: 173-176.

- 2) 細野朗. 食品機能性の科学編集委員会編：食品機能性の科学. 東京：産業技術サービスセンター, 2008: 777-779.
- 3) 細野朗, 酒井健夫・上野川修一編：日本の食を科学する. 東京：朝倉書店, 2008: 36-45.
- 4) 柳橋努・細野朗・上野川修一. 上野川修一監修：乳酸菌の保健機能と応用. 東京：シーエムシー出版, 2007: 15-23.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細野 朗 (HOSONO AKIRA)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：70328706

(2) 研究分担者

高橋 恭子 (TAKAHASHI KYOKO)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：70366574

上野川 修一 (KAMINOGAWA SHUICHI)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：50011945

(3) 連携研究者

特記事項なし