

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

2012年6月8日 現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591301

研究課題名（和文） CD1d, NKT細胞を介したプロバイオティクスの腸管免疫賦活作用の検討

研究課題名（英文） Activation of intestinal mucosal immunization via probiotic strain with the mechanism of Cd1d and NKT cell

研究代表者

松本 哲哉（MATSUMOTO TETSUYA）

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：10256688

研究成果の概要（和文）：

腸内細菌の定着において、CD1d および NKT 細胞がどのように関与するのかを検討した。CD1d 欠損マウスおよび野生型マウスに緑膿菌、大腸菌、黄色ブドウ球菌、およびプロバイオティクスに用いられる *Lactobacillus gasseri* を経口的に接種すると、CD1d 欠損マウスにおいて小腸内の菌数の増加を認めた。さらにバクテリアル・トランスロケーションについても CD1d 欠損マウスで観察された。NKT 細胞を活性化する α -ガラクトシルセラミドの投与によって、腸管内の菌数は逆に減少した。そのメカニズムとして腸管上皮のパネート細胞からライソザイムの産生亢進によるものと考えられた。これらの結果により、CD1d は腸管内の菌の定着に影響を与え、パネート細胞を介した機序が推定された。

研究成果の概要（英文）：

We studied the host mechanisms involved in controlling intestinal colonization with commensal bacteria. Under specific pathogen-free or germ-free conditions, intragastric administration of *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, or *Lactobacillus gasseri* resulted in increased colonization of the small intestine and bacterial translocation in mice lacking Cd1d, compared with wild type mice. In contrast, activation of Cd1d-restricted T cells (NKT cells) with α -galactosylceramide caused diminished intestinal colonization with the same bacterial strains. In vitro data suggest that NKT cells were shown to induce the release of lysozyme from intestinal crypts. These data support a role for Cd1d in regulating intestinal colonization through mechanisms that include the control of Paneth cell function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：腸管免疫、腸内細菌、bacterial translocation、免疫不全

1. 研究開始当初の背景

近年、CD1 を介して活性化される NKT 細胞は宿主側の感染防御に重要な役割を果たしていることが、さまざまな報告で示されている。

2. 研究の目的

本研究は消化管粘膜免疫における CD1 および NKT 細胞の役割について明らかにすることを主たる目的としている。また、常在菌叢に影響を及ぼす因子としてプロバイオティクスの関与を含めて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

CD1d 欠損マウスおよび野生型マウスに緑膿菌、大腸菌、黄色ブドウ球菌、および *Lactobacillus gasseri* を経口的に接種し、消化管内の内容物を採取して、定量的に菌数を測定した。さらに血液、腸間膜リンパ節および肝臓を培養することにより、腸管からのバクテリアル・トランスロケーションについても検討を行った。

4. 研究成果

(1) CD1d 欠損マウスにおける腸管への菌の定着

CD1d 欠損マウスおよび野生型マウスに経口的に緑膿菌を接種し、12 時間後、および 12 日後に腸管の各部位の菌数を検討した結果、CD1d 欠損マウスの方が優位に小腸内の菌数の増加を認めた (図 1)。

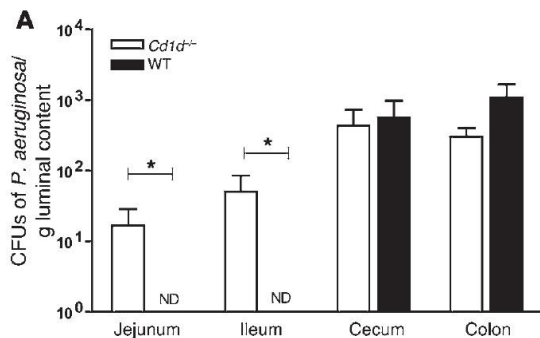


図 1. CD1d 欠損マウスと野生型マウスにおける各種腸管部位の緑膿菌数

(2) 便中菌数の比較

10⁸ CFU の緑膿菌を 3 日間経口的に接種し、12 日後の便を採取して緑膿菌の菌数を検討した結果、CD1d 欠損マウスの方が、野生型マウスよりも多くの菌が便中から検出されることが判明した (図 2)。

これらの結果から緑膿菌は CD1d 欠損マウスにおいて有意に定着しやすいという結果が認められた。

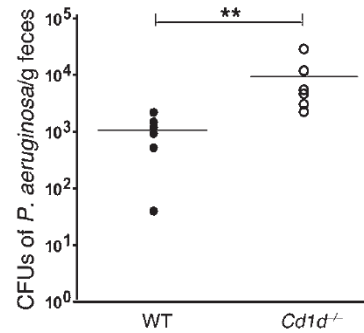


図 2. CD1d 欠損マウスおよび野生型マウスにおける緑膿菌の経口接種後の便中菌数の比較

(3) Germ-free 条件下における腸管への菌の定着性

SPF 条件下のマウスにおいては、常在菌による影響で腸管内の菌数の変化を明確に検討することは困難であるため、CD1d 欠損マウスを Germ-free 化し、野生型マウスと比較する形で、菌の定着性を比較した。

さらに菌種による定着性が異なる可能性があるため、代表的な菌種として大腸菌、黄色ブドウ球菌、*Lactobacillus gasseri* について検討を行った。

a. 大腸菌の定着性

Germ-free の CD1d 欠損マウスおよび野生型マウスに経口的に大腸菌を接種し、経時的に便中の菌数を検討した結果、野生型マウスは 24 時間後に検出可能になり、72 時間後にピークに達するのに対し、CD1d 欠損マウスは 6 時間後には検出可能な状態となり、12 時間後にはすでにピークに達していた (図 3)。

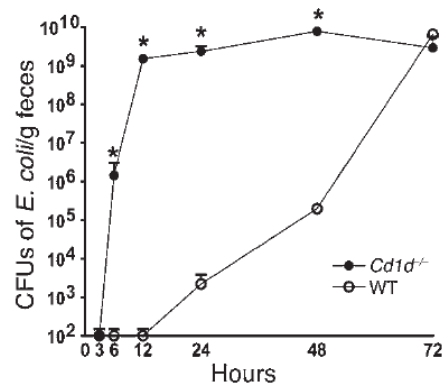


図 3. Germ-free 条件下のマウスにおける大腸菌の腸管への定着性

b. 黄色ブドウ菌の定着性

上記と同じ方法で黄色ブドウ球菌を経口的に接種し、経時的に便中の菌数を検討した。野生型マウスは 24 時間後に検出可能になり、

48 時間後にピークに達するのに対し、CD1d 欠損マウスは 6 時間後には検出可能な状態となり、24 時間後にはすでにピークに達していた (図 4)。

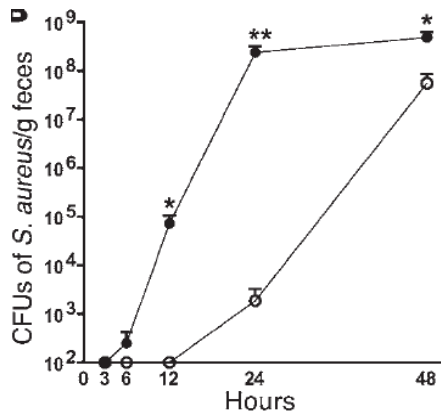


図 4. Germ-free 条件下のマウスにおける黄色ブドウ菌の腸管への定着性

c. *L. gasseri* の定着性

上記と同じ方法で *L. gasseri* を経口的に接種し、経時的に便中の菌数を検討した。野生型マウスは 24 時間後に検出可能になり、48 時間後にピークに達した。CD1d 欠損マウスも同じ傾向が認められたが 24 時間後および 48 時間後の菌数は野生型マウスを上回っていた (図 5)。

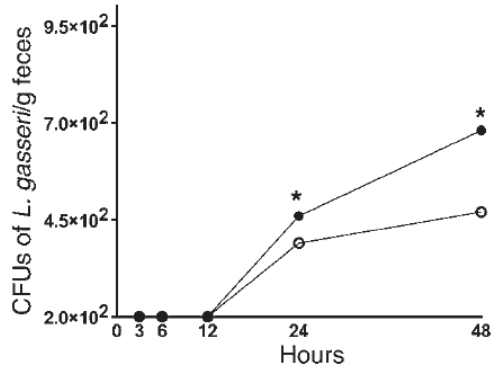


図 5. Germ-free 条件下のマウスにおける *L. gasseri* の腸管への定着性

(4) バクテリアル・トランスロケーションへの影響

Germ-free の CD1d 欠損マウスおよび野生型マウスに経口的に大腸菌を接種し、4 日後に肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節、および血液を採取して培養し菌数を検討した結果、野生型マウスからはいずれも菌は検出できなかったが、CD1d 欠損マウスの腸間膜リンパ節からは有意に菌が検出され、バクテリアル・トランスロケーションが CD1d 欠損マウスで起きていることが確認された (表 1)。

	Liver	Spleen	MLNs	Blood
CD1d ^{-/-}	ND	ND	1,125 ± 750 ^A	ND
WT	ND	ND	ND	ND

表 1. Germ-free 条件下のマウスにおける大腸菌の腸管からのバクテリアル・トランスロケーション

(5) NKT 細胞活性化の影響

NKT 細胞を活性化する α-ガラクトシルセラミド (αGal) およびコントロールとして活性化作用を有しない α-マンノシルセラミド (αMan) および PBS を投与し、腸管内の菌数を検討した。

a. 緑膿菌

緑膿菌を経口的に接種 15 日後の時点において、αGal 投与マウスは有意に低い腸管内の菌数を示した (図 6)。

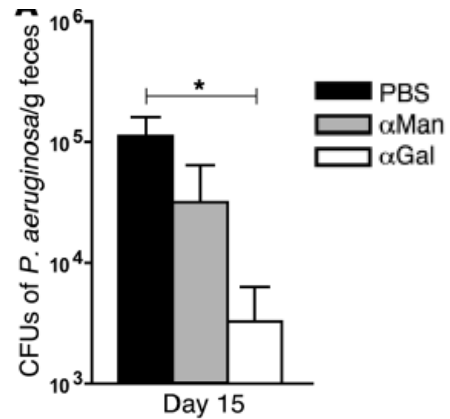


図 6. NKT 細胞活性化マウスへの緑膿菌の定着性

b. 大腸菌

大腸菌を経口的に接種 15 および 24 日後のいずれの時点においても、αGal 投与マウスは有意に低い腸管内の菌数を示した (図 7)。

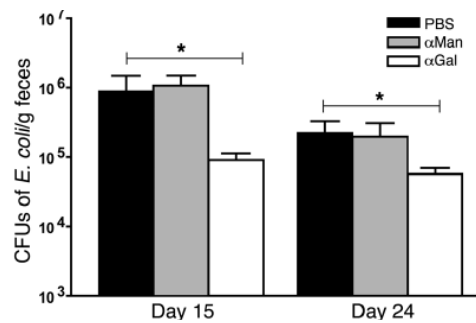


図 7. NKT 細胞活性化マウスへの大腸菌の定着性

(6) パネート細胞のライソザイムの産生性 CD1d 欠損マウスおよび野生型マウスの腸管上皮の病理組織像において、パネート細胞のライソザイムの産生性の低下が認められた (図 8)。

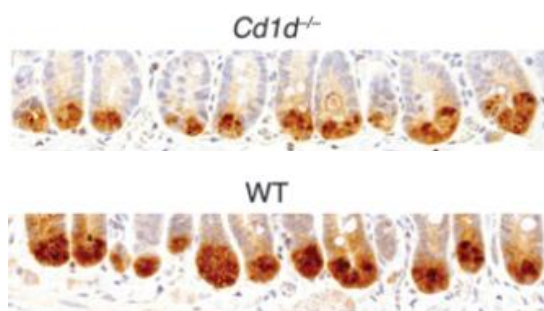


図 8. CD1d 欠損マウスおよび野生型マウスの腸管上皮におけるライソザイム産生性

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Nieuwenhuis EE*, Matsumoto T*, Lindenbergh D, Willemsen R, Kaser A, Simons-Oosterhuis Y, Brugman S, Yamaguchi K, Ishikawa H, Aiba Y, Koga Y, Samsom JN, Oshima K, Kikuchi M, Escher JC, Hattori M, Onderdonk AB, Blumberg RS. Cd1d-dependent regulation of bacterial colonization in the intestine of mice. J Clin Invest. 2009 May;119(5):1241-50. (*:equally contributed) doi:10.1172/JCI36509

[学会発表] (計 4 件)

1. 松本哲哉. 難治性感染症とその要因 -免疫不全、バイオフィルムとの関連- (教

育研修講演). 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸. 2010. 4.23

2. 松本哲哉. ホスト因子を考慮した治療法 (シンポジウム). 第 58 回日本化学療法学会総会. 長崎. 2010. 6.3

3. 松本哲哉. MRSA を中心とするグラム陽性球菌感染症. 第 109 回日本内科学会講演会 (シンポジウム) 京都. 2012. 4.15

4. 松本哲哉. 多剤耐性菌をめぐる最近の話題. 第 86 回日本感染症学会総会学術講演会 (イブニングセミナー) 長崎. 2012. 4.25

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tokyo-med.ac.jp/microbiology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本哲哉 (MATSUMOTO TETSUYA)

東京医科大学・微生物学講座・教授

研究者番号: 10256688

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし