

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14977

研究課題名（和文）哺乳-離乳期の適切な粘膜免疫応答の発達が、将来の疾患感受性に与える影響の解析

研究課題名（英文）The effect of proper development of mucosal immune system during the infancy on the disease susceptibility in the future

研究代表者

中村 有孝（Nakamura, Yutaka）

和歌山県立医科大学・薬学部・助教

研究者番号：60824456

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、乳児期における粘膜免疫系の発達と将来の疾患感受性の影響について、母乳に含まれる因子に着目して解析を実施した。パイエル板に存在し、腸管腔の抗原を取り込む上皮細胞であるM細胞は乳幼児期に少ない。しかし、OPGという遺伝子を欠損する母マウスが野生型マウスを哺育した場合、成熟M細胞の密度が高くなることが明らかとなった。またこうしたM細胞の増加は乳幼児のパイエル板における免疫細胞の成熟を早めることを示唆する結果が得られた。さらに、このマウスは大腸炎に対して抵抗性を示した。これらの結果は、母乳中のOPGが乳幼児期の粘膜免疫系の発達に寄与し、将来的な疾患感受性に影響を与えることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳幼児期においてM細胞が減少していることは、最近の研究で報告されている。しかし、そのメカニズムは不明であった。本研究ではこうした乳幼児期におけるM細胞の抑制に母乳由来の因子が関与していることを明らかにした。さらに、こうしたM細胞の成熟は、粘膜免疫の発達と将来的な疾患感受性に影響を与えることを示した。近年、出生前後や乳児期の因子が将来的な健康に影響を与えていることが着目されている。本研究で明らかにした母乳由来因子の役割は、乳幼児期及び子供の長期的な健康維持に貢献すると期待できる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the relationship between the development of mucosal immune systems during infancy and the susceptibility in adults, mainly focusing on the breastmilk-derived factor. During infancy, the number of microfold (M) cells, specialized epithelial cells for antigen uptake from the mucosal lumen, is lower than in adult mice. However, we found that breastfeeding from OPG-deficient mice increased the number of M cells in the WT pups. We further observed that these mice showed maturation of immune cells in Peyer's patch, represented by the increases of several cell types. Finally, these mice were more resistant to colitis. Our results suggest that breastmilk-derived OPG contributes to the development of mucosal immune systems during infancy, subsequently altering disease susceptibility in the future.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：乳児期 乳児免疫 DOHaD M細胞 粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

腸管は食物と共に体内に取り込まれる抗原や腸内細菌など多くの物質に晒される。胎児期や乳幼児期など、発達早期におけるある種の環境因子(腸内細菌、栄養状態など)への曝露は、宿主の将来的な疾患感受性に影響を与えることが分かってきた。しかし、発達早期においてこれらの環境因子が粘膜免疫系の誘導機構にどのような影響を与えるのか、またその将来的な疾患感受性への影響については不明なことが多い。腸管最大の粘膜誘導組織であるパイエル板の上皮層に存在する M 細胞は、腸管管腔から抗原を取り込む機能を有し、獲得免疫の確立とパイエル板の成熟に重要な細胞である。この M 細胞は哺乳期には少なく、離乳期に急激に増加する。本研究では、哺乳期における M 細胞分化抑制の分子機構を解明し、離乳期における M 細胞の急激な増加がパイエル板の免疫誘導機構に与える影響を解析することによって、発達早期における粘膜免疫の全体像および将来の疾患感受性への影響を明らかにする。

2. 研究の目的

発達早期(胎児期～乳児期)は、遺伝子発現が目まぐるしく変化するため、細胞・組織機能の発達に重要な時期である。近年、発達早期における環境因子(腸内細菌、栄養状態など)への曝露が将来の疾患感受性に影響を与える DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease)学説が提唱された。例えば、飢饉によって発生した低栄養状態を胎児期に経験した人は肥満になりやすくなった、という例がよく知られている。また近年、離乳期における一過性の炎症性サイトカイン産生増加“**Weaning reaction** (離乳応答)”が、将来的に大腸炎、癌、アレルギーなど炎症性疾患に対する抵抗性を増加させることが明らかとなった。この離乳応答は、母乳中の上皮成長因子(EGF)によって哺乳期間中は抑制されているが、離乳期における腸内細菌の急激な増加に伴って増えた腸内細菌代謝物によって誘導される(図 1)。離乳期における抗生物質投与によるこれらの代謝物の低下は、後に投与をやめたとしても大腸炎に対する抵抗性を低下させた。この報告は、離乳期に適切な腸内環境の変化が起こらなかった場合、将来の疾患感受性に影響を与えることを示唆している。

腸管における免疫応答には小腸パイエル板など腸管関連リンパ組織が主要な役割を果たす。また近年、腸管の免疫応答は、腸管局所の炎症性疾患のみならず、自己免疫疾患や精神疾患などの全身性疾患とも関連するという報告がなされている。しかし、哺乳-離乳期におけるパイエル板の発達と将来的な疾患感受性との関係は不明である。そこで、本研究では、哺乳-離乳期におけるパイエル板の発達過程を解明し、哺乳-離乳期のパイエル板における粘膜免疫の確立が、将来の疾患感受性に影響を与えるか明らかにする。

申請者は、これまでの研究の過程で腸管管腔からパイエル板への抗原供給に関与する上皮細胞である Microfold(M)細胞の分化が哺乳期においては抑制され、離乳期に増加することを見出した。M 細胞による抗原取り込みは、パイエル板の発達に対しても重要な役割を果たしているため、哺乳-離乳期における M 細胞動態は、粘膜免疫システムの発達や離乳応答に対しても大きく寄与していることが予想される。

申請者の予備検討では、M 細胞分化を誘導する分子である RANKL(Receptor Activator of NF- κ B Ligand)の発現量は、成熟マウスと哺乳期マウスで差がなかった。つまり、発達早期においては正常な細胞分化誘導機構が存在するにも関わらず、その分化は抑制されていることが示唆された。そこで本研究では、母乳中の成分が M 細胞の分化を制御するという新しい仮説を提示し、哺乳-離乳期における M 細胞分化を制御する分子基盤を明らかにする。また離乳期における正常な M 細胞分化が離乳応答および免疫応答、あるいは将来的な疾患感受性への影響を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

成熟マウスにおいて OPG は M 細胞より分泌され、RANKL に結合することでシグナルを阻害し、周囲の細胞が M 細胞に分化するのを抑制する。上述のように哺乳期において M 細胞は観察されないが、OPG は母乳中に大量に含まれている。従って、母乳中 OPG が乳幼児の M 細胞分化抑制に関与する可能性は高い。

本研究では、M 細胞分化抑制因子である OPG を欠損するマウス(OPG KO マウス)の母親に野生型マウスの子供を哺育させ、野生型マウスの母親に哺育させた場合と比較する(図 1)。

乳児期(2 週齢)における解析は以下の項目を実施した。

(1) 胃内容物・血清中の OPG 濃度

1-2 週齢マウスの胃内容物を PBS に入れ、遠心後の上清を回収した。この胃内容物と血清中に含まれる OPG を ELISA 法にて検出した。

(2) M 細胞の数

1-2 週齢マウスのパイエル板を採取し、EDTA にて処理後、実体顕微鏡下で上皮層を剥離した。固定後、成熟 M 細胞のマーカーである GP2 と必須転写因子である Spi-B について、免疫染色を実施した。細胞のカウントには Fiji を用いた。また、母乳中の OPG は exosome に存在するという報告があるので、人母乳由来 exosome を OPG 欠損マウスが哺育したマウスに経口投与し、M 細胞の分化に対する影響を解析した。

(3) パイエル板、腸管膜リンパ節における免疫細胞の構成

1-2 週齢マウスのパイエル板を採取し、フローサイトメーターにて各種免疫細胞の解析を実施した。

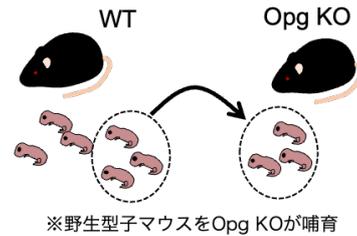
また腸内細菌叢の違いが、こうした形質を生み出している可能性が考えられた。したがって、2 週齢および 6 週齢において、小腸内容物を回収し、16S 解析にて腸内細菌叢の構成を解析した。

さらに、子供の頃に変化した免疫系が成熟後に残っているか解析するため、IgA 陽性細胞について CDR3 領域のレパトア解析を実施した。また IgA が結合している細菌の割合をフローサイトメトリー法にて解析した。

母乳中における OPG の欠損が子供の将来的な疾患感受性に影響するか解析するため、これらのマウスを飼育し、8-10 週齢時における DSS 誘導性大腸炎（潰瘍性大腸炎モデル）および OVA 誘導性食物アレルギーモデルに対する感受性を解析した。

4. 研究成果

母乳中の OPG が乳児の M 細胞分化に影響するか検討するため、出生後すぐに野生型マウスと OPG 欠損マウスの子供を半分入れ替えて飼育した（図 1）。1 週齢において、胃内容物および血清中の OPG 濃度を ELISA 法で確認したところ、OPG 欠損マウスが哺育した野生型子マウスでは、胃内容物および血清中の OPG 濃度が低下していた。また、野生型マウスが哺育した OPG 欠損子マウスの胃内容物では OPG 濃度が増加していた。つまり、母乳中の OPG は子供の体内に吸収され、血液循環にはいることが示唆された。



また 2 週齢においてパイエル板 FAE の M 細胞を確認したところ、

OPG 欠損母マウスが哺育した野生型子マウスにおいて、成熟 M 細胞のマーカである GP2 を発現する細胞の密度が成熟マウスと遜色ない程度まで上昇した。一方で、OPG 欠損子マウスにおいては、野生型母マウスが哺育した場合に GP2 と未成熟 M 細胞マーカである Spi-B の比 (GP2/Spi-B) が、OPG 欠損母マウスが哺育した場合に比べて低下した。これらの結果は乳児の M 細胞成熟が母乳中 OPG によって抑制されていることを示唆している。また、過去の研究では、ヒト母乳において OPG が細胞外小胞の中に含まれることが示されていた。そこで、OPG 欠損マウスが哺育した野生型マウスにヒト母乳由来エクソソームを経口投与すると、GP2 陽性 M 細胞の増加がキャンセルされた。この結果は、乳児における M 細胞分化制御に母乳エクソソーム中の OPG が関与することを示唆している。

ここで M 細胞の分化制御が腸管免疫系の発達に与える影響について検討するため、子マウスのパイエル板、腸管膜リンパ節、脾臓について免疫細胞の構成をフローサイトメトリー法により解析した。すると OPG 欠損母マウスによって哺育された子マウスのパイエル板では IgA 陽性 B 細胞の割合の増加が認められた。一方で、T 細胞依存的に活性化された B 細胞である胚中心 B 細胞はほとんど検出されなかった。これらの結果は T 細胞非依存的な IgA クラススイッチが、OPG 欠損マウスが哺育した場合に促進されることを推測させた。T 細胞においては、OPG 欠損マウスが乳母である場合、Th1、Th17 細胞の増加傾向および Th2 細胞の減少傾向が認められた。これらの変化は抗原の取り込みが増加することによって細菌由来の刺激が多くなることで生じる変化であることが推測される。

さらにこれらのマウスが成熟した後に回腸の IgA CDR3 配列レパートリー（レパトア）について解析したところ、OPG 欠損マウスが哺育した場合には、その多様性が増加傾向にあることが分かった。回腸の IgA 陽性細胞は、乳児期に誘導された細胞が長期に生存していることが示唆されており、乳幼児期における M 細胞の増加は、このレパトアの多様性増加に寄与していることが推測される。

各子マウスについて 16S による腸内菌叢を比較したところ、OPG 欠損マウスが哺育した野生型子マウスでは α 多様性の低下が認められた。しかしながら、細菌構成について有意な変化はなかった。

これらの乳幼児期の変化が、成熟後の疾患感受性に影響をあたえるか解析するため、マウスに病態モデルを適応した。すると、OPG 欠損マウスが哺育した野生型マウスは、DSS 大腸炎に対して抵抗性を示し、体重減少の緩和、糞便スコアの低下が認められた。一方、卵白アルブミンを用いて食物アレルギー感受性の検討を実施したが、症状や抗体産生において有意な差は認められなかった。食物アレルギーモデルでは対照群でスコアが上昇するなどの問題が起きており、プロトコルの見直しを検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishihara Narumi, Nakamura Yutaka, Yakabe Kyosuke, Komiyama Seiga, Fujimura Yumiko, Kaisho Tsuneyasu, Kimura Shunsuke, Hase Koji	4. 巻 3
2. 論文標題 Spi-B alleviates food allergy by securing mucosal barrier and immune tolerance in the intestine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Allergy	6. 最初と最後の頁 996657
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/falgy.2022.996657	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 Nakamura Yutaka, Fuse Yozen, Komiyama Seiga, Nagatake Takahiro, Kunisawa Jun, Hase Koji	4. 巻 13
2. 論文標題 Dietary iodine attenuates allergic rhinitis by inducing ferroptosis in activated B cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-32552-1	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yutaka Nakamura, Koji Hase
2. 発表標題 Dietary iodine surpasses allergic rhinitis by suppressing B cell response
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学薬学部生化学講座
<http://square.umin.ac.jp/keio-dbc/>

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