

学位論文題名

分泌型 IgA (S-IgA) によりコートされた
腸内細菌プロファイルと S-IgA が腸内細菌を
コートすることの免疫学的意義の解明

学位論文内容の要旨

S-IgA は哺乳動物の腸管腔内に分泌される主要な免疫グロブリンである。S-IgA の主な機能として病原性細菌やウイルスに対する防御的機能が広く知られているが、常在性の腸内細菌に対する S-IgA の機能研究は少ない。

哺乳動物の腸管内には 500 種 100 兆個の腸内細菌が存在している。病原性細菌を認識する宿主のレセプターである Toll like receptor (TLR) は病原微生物の LPS、フラジェリンおよびペプチドグリカンといった菌体成分を介して炎症応答を誘導する。常在性腸内細菌はこれらの菌体成分を発現しているにもかかわらず、宿主の炎症応答を誘導することなく宿主と共生している。さらに、病原微生物の排除機能を持つ S-IgA が多量に (腸内細菌数の約 10^7 倍) 腸管内に分泌されているにもかかわらず、安定した腸内細菌叢が維持されている。これらの矛盾から、近年、S-IgA が腸内細菌に対して排除的機能以外の働きをしている可能性が提起されている。

健常成人の糞便中に存在する細菌はすべてではなくその一部 (約 45%) が S-IgA により覆われた (コートされた) 状態で存在している。また、糞便中の S-IgA によりコートされた腸内細菌の割合 (S-IgA コート率) は炎症性腸疾患患者で上昇し、体重が減少することによって下降することが報告されている。これらの報告から S-IgA による腸内細菌のコートは腸管粘膜免疫及び宿主の代謝系に影響を与えていることが考えられる。しかし、S-IgA による腸内細菌のコートに関する研究は様々な生理状態において S-IgA コート率を測定するという研究に限定されており、S-IgA にコートされた腸内細菌 (S-IgA コート細菌) に関する基礎的な情報は皆無である。そこで第 2 章から第 5 章ではまず S-IgA コート細菌に関する基礎的な情報を収集した。さらに、S-IgA による腸内細菌のコートの生体的意義を解明すべく、第 6 章において S-IgA が腸内細菌の増殖に与えている影響を、第 7 章において S-IgA による腸内細菌のコートが宿主の免疫系に与えている影響をそれぞれ検討した。

第 2 章：様々な動物種における S-IgA コート細菌の消化管内分布

これまで、S-IgA コート細菌の存在はヒトおよびマウスでしか報告されていない。そこで本章では様々な動物種における S-IgA コート細菌の消化管内分布を検討すべく、マウス (2 社のブリーダーより購入した Balb/c および C57BL/6 マウス)、ブタおよびウシの各消化管部位の S-IgA コート率を測定した。その結果、S-IgA コート率は消化管部位間、動物種間さらにはブリーダー

一の異なるマウス間で異なっていた。また、この S-IgA コート率の違いは単純に消化管内に存在する free-IgA (細菌に結合せず遊離している IgA) 量に依存していなかった。

第3章：ヒト及びマウスの糞便中細菌をコートしている IgA 量の定量

膨大な量の S-IgA が恒常的に腸管内に分泌されているにも関わらず、全てではなく一部の腸内細菌のみが S-IgA にコートされている。この矛盾をもたらしている原因として二つの可能性が考えられる。一つは、1 個の腸内細菌をコートしている IgA 量が多量であるために腸管内に産生されている IgA 量では全腸内細菌をコートするために不十分である可能性であり、もう一つは腸内細菌特異的な IgA が選択的に腸内細菌をコートしている可能性である。これらの可能性を検証するために、第3章では腸内細菌をコートしている IgA 量の定量法を確立し、ヒトおよびマウスの糞便細菌をコートしている IgA 量を定量した。その結果、ヒトおよびマウスの糞便細菌をコートしている IgA 量は糞便中に分泌されている free-IgA 量の 5% 以下であった。この結果は十分量の IgA が腸管内に存在しているにも関わらず一部の腸内細菌 (ヒト: $29 \pm 7\%$ 、マウス: $26 \pm 3\%$) のみがコートされていることを示している。このことから S-IgA は腸内細菌を細菌群選択的にコートしている可能性が示唆された。

第4章：腸管内に存在する S-IgA コート細菌の細菌叢構成の検索方法の検討

S-IgA が腸内細菌を細菌群選択的にコートしている可能性を検討すべく、本章では S-IgA がコートしている細菌群の検索方法を確立し、ヒトおよびマウスの糞便中 S-IgA コート細菌の細菌叢構成を検討した。その結果、*Enterobacteriaceae* がその他の細菌群と比較して S-IgA にコートされやすく、*Bacteroides/Prevotella* グループおよび *Lactobacillus/Enterococcus* グループが S-IgA にコートされにくいことがわかった。この結果は第3章で示唆された常在性腸内細菌が S-IgA により選択的にコートされている可能性を強く支持するものであると考えられる。

第5章：小腸に存在する S-IgA コート細菌の性状

本章では第4章において確立した S-IgA コート細菌の免疫染色法を用いて、第2章で他の消化管部位よりも有意に高い S-IgA コート率を示したマウス小腸内容物中の S-IgA コート細菌を視覚的に確認した。その結果、マウス小腸内容物中のほとんどの細菌は S-IgA-粘液複合体に覆われた状態で存在していた。この現象の意義は不明であるが、第2章で確認されたマウス小腸内容物中の S-IgA コート率の高さと関係していると考えられる。

第6章：IgA が腸内細菌の増殖能に与える影響

S-IgA 欠損マウスにおいて腸内細菌が過剰に増殖することから S-IgA が腸内細菌の増殖能に影響を与えている可能性が考えられるが、腸管内に分泌された IgA と細菌を共培養し、細菌の増殖能に与える影響を評価した報告はない。そこで、本章ではマウス小腸の初代培養により得た IgA を用いて IgA が細菌の増殖能に与えている影響を検討した。その結果、マウスの消化管より単離した *E. coli* および *L. reuteri* だけでなく、マウスの消化管内に存在しない *E. coli* の増殖も促進した。また、*E. coli* は *L. reuteri* よりも IgA によって増殖がより促進されていたことから IgA による細菌増殖促進効果は細菌種によって異なっていることが示唆された。

第7章：S-IgA による腸内細菌のコートが宿主の炎症応答に与える影響

IgA には炎症の抑制作用があることが報告されているが、IgA による細菌のコートが炎症抑制作用に寄与しているかは検討されたことがない。そこで本章では *in vitro* で IgA コート細菌を

作製 (*in vitro* コート細菌) し、*in vitro* コート細菌をヒト結腸上皮細胞モデルである Caco-2 細胞と共培養することにより、IgA による細菌のコートが上皮細胞の炎症応答にどのような影響を与えているかを検討した。その結果、腸内細菌が IgA にコートされることにより炎症サイトカインである IL-1 β および IL-8 の発現が有意に抑制された。この結果から IgA は腸内細菌の炎症誘導性の菌体成分をコートすることにより腸内細菌に対する腸管上皮細胞の炎症応答を抑制している可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 博
副 査 教 授 浅 野 行 蔵
副 査 特任教授 矢 島 高 二 (創成研究機構)
副 査 准教授 石 塚 敏
副 査 講 師 井 上 亮 (京都府立大学大学院)

学位論文題名

分泌型 IgA (S-IgA) によりコートされた 腸内細菌プロファイルと S-IgA が腸内細菌を コートすることの免疫学的意義の解明

本論文は、93 頁からなる和論文であり、図 16 と表 4 を含み、参考論文 5 編が添えられている。

S-IgA は哺乳動物の腸管腔内に分泌される主要な免疫グロブリンである。S-IgA の主な機能として病原性細菌やウイルスに対する防御的機能が広く知られているが、常在性の腸内細菌に対する S-IgA の機能研究は少ない。

病原微生物の排除機能を持つ S-IgA が多量に腸管内に分泌されているにもかかわらず、1000 種 100 兆個もの腸内細菌が宿主と共生している。この矛盾から、S-IgA が腸内細菌に対して排除的機能以外の働きをしている可能性が提起されている。

健常成人の糞便中に存在する細菌はすべてではなくその一部が S-IgA により覆われた (コートされた) 状態で存在している。S-IgA コート細菌の存在はヒトおよびマウスでしか報告されておらず、S-IgA が細菌種特異的あるいは非特異的に腸内細菌に結合しているかは不明である。そこで本研究ではまず S-IgA コート細菌に関する基礎的な情報を収集した。

糞便中の S-IgA コート率 (S-IgA によりコートされた腸内細菌の割合) は体重の減少に伴う菌叢構成の大幅な変化によって下降し、炎症性腸疾患患者の糞便で上昇することが報告されている。この報告から S-IgA による腸内細菌のコートは腸内細菌叢構成及び腸管粘膜免疫に影響を与えていることが考えられる。しかし、S-IgA による腸内細菌のコートが腸内細菌側および宿主免疫系に与えている影響は不明である。これを検討すべく、IgA が腸内細菌の増殖に与えている影響および IgA による腸内細菌のコートが宿主上皮細胞の炎症応答に与えている影響をそれぞれ検討している。

1. S-IgA コート細菌に関する基礎的な情報の収集

これまで、S-IgA コート細菌の存在はヒトおよびマウスでしか報告されていない。そこで本章では様々な動物種における S-IgA コート細菌の消化管内分布を検討すべく、マウス（2社のブリーダーより購入した Balb/c および C57BL/6 マウス）、ブタおよびウシの各消化管部位の S-IgA コート率を測定している。その結果、S-IgA コート率は消化管部位間、動物種間さらにはブリーダーの異なるマウス間で異なっていた。また、この S-IgA コート率の違いは単純に消化管内に存在する free-IgA（細菌に結合せず遊離している IgA）量に依存していなかった。消化管部位間、動物種間、またはマウスブリーダー間で腸内細菌叢構成が異なることが報告されていることから、S-IgA コート率は腸内細菌叢構成依存的に決定されている、つまり、S-IgA は腸内細菌を細菌群選択的にコートしている可能性を示した。次に、S-IgA がコートしている腸内細菌の細菌グループの検索方法を確立し、ヒトおよびマウスの糞便中 S-IgA コート細菌の細菌叢構成が検討された。その結果、*Enterobacteriaceae* がその他の細菌群と比較して S-IgA にコートされやすく、*Bacteroides/Prevotella* グループおよび *Lactobacillus/Enterococcus* グループが S-IgA にコートされにくいことがわかった。この結果からも常在性腸内細菌が S-IgA により選択的にコートされている可能性を示した。

2. 腸管内 IgA が腸内細菌の増殖能に与える影響

S-IgA 欠損マウスにおいて腸内細菌が過剰に増殖することから S-IgA が腸内細菌の増殖能に影響を与えている可能性が考えられるが、腸管内に分泌された IgA と細菌を共培養し、細菌の増殖能に与える影響を評価した報告はない。そこで、本章ではマウス小腸の初代培養により得た IgA を用いて IgA が細菌の増殖能に与えている影響が検討された。その結果、マウスの消化管より単離した *E. coli* および *L. reuteri* だけでなく、マウスの消化管内に存在しない *E. coli* の増殖は阻害されず、むしろ増殖を促進する傾向が見られた。この結果から、腸管内に産生された IgA は常在菌の増殖に影響を与えていない可能性が示された。

3. IgA による腸内細菌のコートが宿主の炎症応答に与える影響

IgA には炎症の抑制作用があることが報告されているが、IgA による細菌のコートが炎症抑制作用に寄与しているかは検討されたことがない。そこで本章では *in vitro* で IgA コート細菌を作製（*in vitro* コート細菌）し、*in vitro* コート細菌をヒト結腸上皮細胞モデルである Caco-2 細胞と共培養することにより、IgA による細菌のコートが上皮細胞の炎症応答にどのような影響を与えているかが検討された。その結果、腸内細菌が IgA にコートされることにより炎症サイトカインである IL-1 β および IL-8 の発現が有意に抑制された。この結果から IgA は腸内細菌の炎症誘導性の菌体成分をコートすることにより腸内細菌に対する腸管上皮細胞の炎症応答を抑制している可能性が示された。

よって、審査員一同は、鶴田剛司が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。