

論文の内容の要旨

論文題目 腸内細菌と腸管免疫系の形成

氏名 今岡 明美

ヒトや動物の腸管内には数百種以上の細菌が存在しており、互いに共生あるいは拮抗しながら腸内フローラを形成している。腸管には病原菌や外来抗原に対する第一線のバリアーとして、全身系あるいは末梢系の免疫機構とは異なる特性を持った腸管粘膜免疫系が発達している。無菌マウスに常在性腸内フローラを定着させる（通常化する）と、腸管粘膜での生体防御に大きな役割を果たしている腸上皮間リンパ球（IEL）の増加や細胞傷害活性の獲得、IgA 産生の増強が示され、小腸上皮細胞では T 細胞への抗原提示に必要な MHC（主要組織適合抗原）クラス II 分子が誘導されるなど、腸内フローラの定着は腸管粘膜免疫系の重要な機能の分化発達に関与していることが示されている。本研究では、多種の細菌により構成される腸内フローラの中のどのような細菌が、どのような機構で腸管免疫系の分化発達に作用しているのかを解析した。マウスをモデルとして、小腸を中心に IEL の数、構成および機能、IgA 産生、上皮細胞の MHC クラス II 分子の発現を指標とし、①腸内フローラは直接的に腸管免疫系に作用するのか、②腸内フローラの中のどのような細菌種が免疫系の活性化に重要であるのか、また細菌のどのような因子が関与しているのか、③腸内フローラの定着効果に宿主特異性はあるのかに注目して解析した。

1. 腸内フローラの定着と小腸上皮間リンパ球（IEL）の増殖動態

無菌マウスの通常化に伴う IEL の増殖に関与する機構を明らかにするために、IEL の増

殖動態をブロモデオキシウリジン (BrdU) の標識実験によって解析した。無菌マウスでは10日間の連続標識により、TCR $\gamma\delta$ 陽性 IEL ($\gamma\delta$ IEL) の約30%、TCR $\alpha\beta$ 陽性 IEL ($\alpha\beta$ IEL) の約15%が BrdU 陽性になった。一方、通常マウスでは $\alpha\beta$ IEL の約60%、 $\gamma\delta$ IEL の約40%が BrdU 陽性となった。胸腺依存性 CD8 $\alpha\beta$ ⁺ IEL と胸腺非依存性 CD8 $\alpha\beta$ ⁻ IEL の標識率に差は認められなかった。また、通常化マウスでは1日後に20~25%の IEL が標識され、その後も BrdU 標識率は直線的に増加して10日目には $\alpha\beta$ IEL の約75%、 $\gamma\delta$ IEL の約67%が BrdU 陽性であった。通常化過程では大部分の IEL が速やかに増殖サイクルに入ることが示された。BrdU 標識開始後、BrdU 陽性 IEL の出現までのタイムラグが認められず、BrdU 標識率は直線的に増加することから、IEL はその存在部位である腸上皮間コンパートメントの近傍で分裂増殖している可能性が高いと考えられた。この結果から、腸内フローラの定着に対して、腸管免疫系が局所で速やかに応答していることが強く示唆された。

2. 小腸および大腸常在性腸内細菌の腸管免疫系に与える影響

2. 1 小腸免疫系を活性化する腸内フローラ成分の分画と宿主特異性

無菌マウスに種々の動物のフローラおよびそれらのクロロホルム耐性(有孢子菌)フローラを定着させた人工菌叢マウスを作製して、腸内フローラの中のどのような細菌種が小腸免疫系の活性化に重要な役割を果たしているのかを解析した。通常化マウスで見られる IEL 数の増加、IEL の細胞傷害活性および上皮細胞の MHC クラス II 分子の発現の誘導が、ヒトフローラを定着させたマウスでは認められなかった。マウスのクロロホルム耐性フローラを定着させた群では、通常化マウスと同様に IEL の増加と細胞傷害活性の獲得、上皮細胞の MHC クラス II 分子の発現が認められたが、培養可能なマウスクロロホルム耐性菌を定着させた群では同様の変化は見られなかった。ラットおよびヒトのクロロホルム耐性フローラの定着により、IEL や MHC クラス II 分子の変化は観察されなかった。これらの結果から、マウス小腸免疫系の活性化にはマウス固有の、*in vitro* での培養が困難である有孢子菌の定着が深く関与していると考えられた。

2. 2 セグメント細菌の定着と小腸免疫系の正常化

マウス小腸免疫系の活性化をもたらす細菌として、上記の条件に合致し、マウス回腸部に定着しているセグメント細菌 (segmented filamentous bacteria ; SFB) の定着効果に注目した。無菌マウスに SFB を定着させることにより小腸 IEL の増加、細胞傷害活性の獲

得、小腸上皮細胞の MHC クラス II 分子の発現、IgA 産生の増大が認められた。この結果から、多種の腸内細菌の中の SFB という 1 種類の細菌の定着により、小腸免疫系が活性化されることが示された。SFB の作用機構は不明であるが、SFB の上皮細胞への接着が何らかのシグナルトランスダクションを誘起して上皮細胞の形質が変化し、次いでこの分化した上皮細胞が IEL の増殖や活性化、IgA 産生の増加などをもたらすという機構が推定される。無菌、SFB 単独定着および通常化マウスの $\alpha\beta$ IEL のレパートアを比較すると、 $V\beta$ の使用頻度に大きな差は認められなかった。したがって、SFB は抗原として TCR に認識されているのではなく、IL-7、IL-15 などの IEL の増殖因子の産生を促進し、IEL 全体の増殖を誘導している可能性が考えられた。

2. 3 セグメント細菌の宿主特異性

SFB は種々の動物の消化管において形態的観察からその存在が認められているが、*in vitro* での培養が困難であるために生化学的性状が明らかではない。そこで、F344 ラット、カニクイザルおよび BALB/c マウスの SFB の 16S rDNA 塩基配列を決定し、既に報告されている SE マウス、WU ラットおよびニワトリ由来の配列と比較すると、これら 6 種の SFB は既知の細菌とは独立した菌属に分類されることが示された。また、同種の宿主に由来する SFB の塩基配列の相同性は非常に高いので同一の種に分類されるが、異種の宿主に由来する SFB の相同性は低く、異種の細菌に分類されると考えられた。これは、SFB の宿主への定着性に対応した結果であった。腸内フローラの定着と小腸免疫系の正常化に関する宿主特異性は、動物種に特徴的なフローラ構成によるものではなく、SFB の宿主特異性によるところが大きいと考えられる。SFB の 16S rDNA 塩基配列をもとに系統分類を行うと、基本的には宿主動物の系統に一致した系統樹が作製されることから、宿主は SFB の生育に適した環境を提供し、SFB は宿主形質の正常化をもたらし、両者は相互に作用しながら共に進化してきたと推定された。

2. 4 小腸および大腸常在性細菌の腸管免疫系への作用

小腸と大腸のフローラがそれぞれの部位の免疫系の活性化にどのように影響しているかを明らかにするために、小腸常在菌として SFB を、大腸常在菌として clostridia を選択し、それぞれの単独定着マウスおよび両者の混合定着マウスを作製して、その形質を解析した。常在性腸内細菌の定着効果は小腸と大腸では明らかな違いが認められ、主に通常環

境下での腸内細菌の定着部位に対応して免疫系に影響を及ぼしていると考えられた。免疫系を活性化する因子としては小腸では上皮細胞への細菌の接着、大腸では細菌の代謝産物が有力な候補と言えるであろう。また小腸 IEL の CD8 α β 、CD8 α α の比率を指標とすると、小腸常在菌である SFB の小腸への作用を大腸常在菌である clostridia が補完していると考えられた。SFB と clostridia の定着によって小腸および大腸の免疫系はほぼ通常マウスと同等に活性化されていたことから、マウスにおいては 'SFB+clostridia' が免疫系を活性化する最小限のフローラ構成であると考えられた。SFB、clostridia とともに有孢子菌であり、2.1 で述べたクロロホルム耐性フローラの構成が単純化されたといえる。このフローラ構成は腸内フローラの腸管免疫系への作用機構を明らかにするうえで重要な基盤となると考えられる。

3. ヒト消化管モデルマウスの作製

これまでにノトバイオートマウスの解析で明らかになった腸内細菌の定着効果と宿主特異性に基づき、'SFB+clostridia' 定着マウスの clostridia をヒトフローラに置き換えたマウス (HF-SFB マウス) を新規ヒトフローラマウスとして作製した。このマウスの小腸および大腸の免疫系の形質は通常マウスとほぼ同じであった。HF マウスの小腸免疫系の形質が無菌マウスと同様であることを考慮すると、HF-SFB マウスは腸管免疫系が正常化されている点で、より有用なヒト消化管モデルマウスであると考えられた。また、腸管免疫系の正常化に関する clostridia の定着効果はヒトフローラの定着効果に置き換えることが可能であり、大腸免疫系の活性化に関与する細菌の宿主特異性は弱いことが示唆された。HF-SFB マウスではヒト腸内フローラと正常状態の生体の応答との両面の解析が可能であることから、プロ/プレバイオティクスのように腸内フローラの改善を介して宿主に影響を与える物質の効果検証に有用なモデルシステムになり得ると考えられた。

以上のように、腸内フローラの中でマウスの腸管免疫系の活性化に密接に関与する最小限の構成を明らかにし、その作用機構について考察した。腸管免疫系の正常化に関与する腸内細菌の作用機構は現時点では推測の域を出ないが、今後は、この最小フローラ構成を基盤とし、腸管粘膜免疫系の誘導・制御機構の研究の進展と相俟って、腸内フローラと宿主との関係がさらに解明されていくものと期待される。