

研究終了報告書

「組織内共生細菌叢－免疫－神経連関の実態解明」

研究期間：2019年10月～2022年3月

研究者：柴田 納央子

1. 研究のねらい

人体最大の免疫臓器である腸管は、粘膜免疫システム・腸管神経叢と呼ばれるユニークな免疫系・神経系システムを協調的に発達させ、多様な病原微生物に対する生体防御と、食餌性抗原や常在細菌に対する寛容を同時に成立させることで、腸管恒常性を維持している。無菌マウスを用いた研究から、粘膜免疫システム・腸管神経叢の発達・制御には、サイトカインなどの生体内分子だけではなく常在細菌からの刺激が必要であることが知られている。申請者は、腸管リンパ組織の代表格であるパイエル板内部の共生細菌叢を解析し、マウス、サル、ヒトのパイエル板内部に、日和見細菌群の一種であるアルカリゲネス菌が定常的に共生し、その共生は腸管関連リンパ組織内部に限局していることや、アルカリゲネス菌が定常的にパイエル板内の樹状細胞内部に共生し、樹状細胞を介したIgA抗体産生の促進に寄与することを示してきた。一方で、パイエル板を解剖学的な視点から捉え、管腔内抗原の取り込み専門細胞であり、腸管上皮に点在するM細胞と、その直下には抗原取り込み・提示細胞である樹状細胞が集積し、T細胞領域、B細胞領域と、腸管神経叢における神経細胞群の局在性が厳密に制御されており、腸管の恒常性維持においては、各細胞群の局在性維持が必須である。

それにもかかわらず、パイエル板内位置情報を保持した、宿主免疫系・神経系と、腸管組織内共生細菌叢との連関に着目した研究は未だ行われていない。また宿主免疫系の機能不全等によりアルカリゲネス菌との共生関係が破綻すると、アルカリゲネス菌が抹消組織へ拡散し全身性炎症を誘起するが、その共生破綻機序は明らかでない。そこで本研究課題では、ラマン分光分析技術を用いたラマン顕微鏡観察や、マイクロ流体デバイスを用いた解析により、細菌叢や宿主細胞群に含まれる多種成分の分子構造を非標識・非破壊で検出・識別し、細菌叢－免疫－神経の連関や、腸管恒常性維持機構との関連を明らかにする。本研究課題を発展させることで、将来的には組織内共生細菌群の生理学的存在意義とメカニズムに立脚した、腸管関連免疫疾患の新規予防法・治療法開発を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究課題では、腸管組織内に最優勢で共生するアルカリゲネス菌を組織内共生細菌のモデル細菌として、アルカリゲネス菌を主に取り込む樹状細胞を起点とした解析を、下記3つの観点から進めた。**【①アルカリゲネス菌の共生破綻機序の解明】**、**【②アルカリゲネス菌による、樹状細胞分化や腸管神経叢形成制御機構の解明】** **【③腸管免疫系・神経系と関連する細菌叢および、生理活性分子の同定】**

【①アルカリゲネス菌の共生破綻機序の解明】

腸管組織内共生細菌であるアルカリゲネス菌の形態変化に伴う共生破綻機序について、



共焦点ラマン顕微鏡および、免疫学的・分子生物学的解析を行った。その結果、アルカリゲネス菌が形態変化に伴い菌体外へシクロム c を放出し、宿主樹状細胞内において、ミトコンドリアからのシクロム c 放出や、それに起因したアポトーシスを誘導することが明らかになった。本研究内容については 2020 年度、日本農芸化学会において学会発表しており、現在論文投稿準備中である。

【②アルカリゲネス菌による、樹状細胞分化や腸管神経叢形成制御機構の解明】

アルカリゲネス菌による、腸管免疫系・神経系制御を担う生理活性分子の同定については、アルカリゲネス菌が放出する膜小胞に着目し、共焦点ラマン顕微鏡やガスクロマトグラフィー質量分析法を用いた解析を推進した。その結果、アルカリゲネス菌が DNA 損傷により誘導される SOS response や、菌密度の上昇に伴い誘導される Quorum sensing により膜小胞を放出することや、膜小胞内部に高濃度の短鎖脂肪酸や、核酸を封入していることが明らかになった。さらに、SOS response または Quorum sensing により誘導された膜小胞内容物には組成に差異が認められることを見出している。今後、腸管組織内部におけるアルカリゲネス菌の膜小胞放出経路やその内容物同定、またマイクロ流体デバイスを用いた膜小胞内核酸配列の解析を進めることで、アルカリゲネス菌による宿主腸管免疫系・神経系制御機構の解明を目指す。本研究内容については 2021 年度、日本農芸化学会において学会発表し、現在論文執筆中である。

【③腸管免疫系・神経系と連関する細菌叢および、生理活性分子の同定】

腸管局所毎の細菌叢の同定については、腸管における主要な免疫誘導組織であるパイエル板に着目し、免疫細胞群の集積するドーム領域・T 細胞領域・B 細胞領域と、腸管神経叢に着目した解析を進めた。その結果、パイエル板切片を用いた in situ hybridization 法による解析から、免疫細胞群集積領域だけでなく、腸管神経叢近傍においてもアルカリゲネス菌をはじめとした細菌叢が検出された。

(2) 詳細

【①アルカリゲネス菌の共生破綻機序の解明】

アルカリゲネス菌の共生破綻機序については、宿主免疫系の機能不全が、腸内細菌叢の多様性や菌種構成の異常を引き起こすことや、*Proteus mirabilis* を始めとした日和見細菌が、菌密度の増加に伴い形態変化し、病原性を発揮することが知られている。そこで、アルカリゲネス菌の共生破綻機序については、菌密度の増加とそれに伴う性状変化に着目した解析を推進した。その結果、アルカリゲネス菌が菌密度増加に伴い桿状からフィラメント状へ形態変化することや、形態変化に伴い、アルカリゲネス菌がシクロム c を菌体内に蓄積し、その一部を菌体外へ放出することが明らかになった。シクロム c は通常、動物細胞のミトコンドリア内において、呼吸鎖の電子供与体として機能しているが、ミトコンドリアからシクロム c が細胞質へ漏出すると、アポトーシス促進因子として作用することが知られている。これらの報告と一致し、樹状細胞に形態変化後のアルカリゲネス菌を感染させることで、形態変化前と比較し、樹状細胞の細胞質におけるシクロム c が増加することや、それと連動してアポトーシスが高率に誘導されることが明らかになった。実際にアルカリゲネス菌由来のシクロム c が細胞質内に存在することで、樹状細胞のアポトーシスが誘導されるか検討した結果、アルカリゲネス菌由来のシクロム c をトランスフェクションした樹状細胞において、フィラ

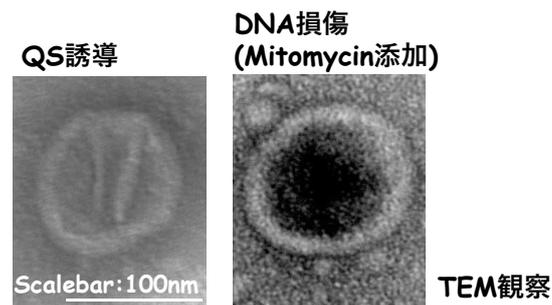
メント状のアルカリゲネス菌を感染させた際と同様に、高率でアポトーシスが誘導されることが明らかになった。アルカリゲネス菌は主に樹状細胞内に共生することから、一連の樹状細胞のアポトーシス誘導は、結果的にはアルカリゲネス菌の共生破綻を引き起こすと考えられる。以上の解析結果から、宿主免疫系の機能不全に伴うアルカリゲネス菌の共生破綻機序として、アルカリゲネス菌の形態変化と、シトクロム c の放出、また、それに起因した樹状細胞のアポトーシス誘導機構の存在が明らかになった。本研究内容については 2020 年度、日本農芸化学会において学会発表しており、現在論文投稿準備中である。

【②アルカリゲネス菌による、樹状細胞分化や腸管神経叢形成制御機構の解明】

アルカリゲネス菌による腸管免疫系・神経系制御を担う生理活性分子の同定については、アルカリゲネス菌が放出する膜小胞に着目し、共焦点ラマン顕微鏡やガスクロマトグラフィー質量分析法による解析を推進した。膜小胞は細菌間情報伝達ツールとして知られているが、*Pseudomonas aeruginosa* を始めとした病原性細菌では、溶血性ホスホリパーゼやエステラーゼを始めとした病原性因子を膜小胞内に包み込み、標的細胞へ輸送することが知られている。また細菌からの MV 放出経路としては主に、DNA 損傷により引き起こされる SOS response や、菌密度の上昇に伴い誘導される Quorum sensing(QS)が知られている。

そこでまず、アルカリゲネス菌の膜小胞放出の有無に着目した電子顕微鏡による解析を行った。その結果、マイトマイシン c 添加による SOS response や、QS を誘導した結果、アルカリゲネス菌が SOS response、QS どちらの経路からも膜小胞を放出することが判明した(図 1)

(図1) アルカリゲネス菌はQuorum Sensing(QS)及びDNA損傷により膜小胞を放出する



そこで次に、誘導経路に基づき膜小胞を回収し、それぞれの膜小胞内容物に着目し解析を行った。これまでの先行研究から、病原性細菌がエステラーゼを始めとした病原性因子を膜小胞内に封入することや、腸内細菌による腸管恒常性の維持に腸内細菌の代謝産物である短鎖脂肪酸が関わるということが報告されている。そこでアルカリゲネス菌の膜小胞に含まれるエステラーゼ活性及び短鎖脂肪酸に着目し、共焦点ラマン顕微鏡やガスクロマトグラフィー質量分析法を用いた解析を行った結果、アルカリゲネス菌から産生される膜小胞内にエステラーゼ活性や酪酸、乳酸をはじめとした短鎖脂肪酸が高濃度で封入されていることが明らかになった。短鎖脂肪酸は、腸内細菌の代表的な生理活性分子として知られているが、それらが膜小胞内部に封入されていることを報告した例はこれまでにない。以上の解析結果から、アルカリゲネス菌由来生理活性分子が、膜小胞を介して宿主へ輸送される可能性が考えられた。現在、アルカリゲネス菌由来膜小胞の樹状細胞培養系への添加実験や、膜小胞内の核酸配列に着目した解析を、マイクロ流体デバイスを用いて進めている。今後、実際の腸管組織内部でのアルカリゲネス菌による MV 内容物や、その生理学的機能に着目した

解析を進めることで、腸管組織内共生細菌叢—免疫—神経連関の実態解明を目指す。

【③腸管免疫系・神経系と関連する細菌叢および、生理活性分子の同定】

腸管局所毎の細菌叢の同定については、腸管における主要な免疫誘導組織であるパイエル板に着目し、免疫細胞群の集積するドーム領域・T細胞領域・B細胞領域と、腸管神経叢に着目した解析を進めた。その結果、パイエル板切片を用いた in situ hybridization 法による解析から、免疫細胞群集積領域だけでなく、腸管神経叢近傍においてもアルカリゲネス菌をはじめとした細菌叢が検出された。今後両領域における細菌叢の同定や生理学的機能について、共焦点ラマン顕微鏡、マイクロ流体デバイス等による解析を推進する。

3. 今後の展開

本研究課題から、宿主免疫系の機能不全に伴うアルカリゲネス菌の共生破綻機序として、アルカリゲネス菌の形態変化と、シトクロム c の放出、また、それに起因した樹状細胞のアポトーシス誘導機構が存在すること、また、アルカリゲネス菌由来生理活性分子が、膜小胞を介して宿主へ輸送される可能性が示された。

膜小胞は、内部に核酸やタンパク質を含むことで、同種・異種細菌間の情報伝達に寄与することが知られており、緑膿菌を始めとした病原性細菌においては、膜小胞内部に溶血性ホスホリパーゼなどの病原性因子を封入し、宿主細胞への接着・効率的な輸送に利用することが報告されている。一方で、腸内細菌が産生する膜小胞の内容物や、その機能については全く解明されていないと言っても過言ではない。また、細菌由来の膜小胞は、ドラッグデリバリーシステムへの応用も期待されており、腸内細菌由来の膜小胞に関する基礎的知見が、同システムの安全な開発へつなげると考えられる。

4. 自己評価

本研究課題では、組織内共生細菌であるアルカリゲネス菌に着目した研究を推進することで、これまで明らかにされてこなかった、アルカリゲネス菌による宿主樹状細胞のアポトーシス誘導機構や、短鎖脂肪酸をはじめとした菌体由来生理活性分子の輸送体としての膜小胞という新概念を提唱することができた。これらの研究成果は、申請者がこれまでに取得してきた免疫学的・分子生物学的解析手法に、ラマン分光法や多変量解析、マイクロ流体デバイスなどの先端解析技術を取り入れることで、効果的に推進することができたと考えられる。また、腸内細菌叢や腸内細菌由来の短鎖脂肪酸を始めとした代謝産物異常が、関節リウマチの発症や自閉症、神経系の発達や機能に影響することが報告されているおり、本研究から得られた成果は、腸管組織内共生細菌による宿主免疫制御に関する新規知見をもたらす学術的な貢献のみならず、国民の健康増進にも貢献する研究へと発展する可能性があると考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件



(2)特許出願:なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1)腸管組織内共生細菌由来のシトクロム c による宿主樹状細胞のアポトーシス誘導機構

Cytochrome c released from intra-tissue opportunistic bacteria induce apoptosis of host dendritic cells 日本農芸化学会 2021 年 3 月、柴田納央子、國澤純、安藤正弘、細川正人、堀井俊平、細見晃司、竹山春子、清野宏

2)Induction of apoptosis in host cells associated with morphological changes of intratissue symbiotic bacteria, Naoko Shibata, Tokyo 2020 UCSD-IMUST International Joint Research Symposium 2020 年 2 月 14 日

3)「Morphological changes of intra-tissue opportunistic bacteria, Alcaligenes, are accompanied by cytochrome c accumulation and induce host cell apoptosis. Naoko Shibata, Rising Stars in Cutting Edge Immunology Research 2020 年 1 月 27 日

著作物

1) 腸内細菌と炎症性腸疾患、柴田納央子、清野宏、Pharma Medica 38 2020 年 12 月

2)Lymphoid Tissue-Resident Alcaligenes Establish an Intracellular Symbiotic Environment by Creating a Unique Energy Shift in Dendritic Cells,

Koji Hosomi, Naoko Shibata, Atsushi Shimoyama, Tomoya Uto, Takahiro Nagatake, Yoko Tojima, Tomomi Nishino, Haruko Takeyama, Koichi Fukase, Hiroshi Kiyono, Jun Kunisawa, Frontiers in Microbiology 11 2020 年 9 月 24 日