

<平成 30 年度助成>

腸内細菌が産生するビタミンが宿主の 免疫系制御に与える影響の解析

細野 朗

(日本大学 生物資源科学部 食品生命学科)

目 的

腸内に共生する腸内細菌は腸内環境の恒常性維持はもちろんのこと、消化吸収や免疫系を通して宿主の生体応答に強く関与している。特に免疫系については、腸管関連リンパ組織の形成や感染防御反応、および炎症制御に関わる免疫防御反応に対して、腸内細菌の存在が極めて重要な役割を担っている。また、腸内細菌の中にはビタミン類の合成の役割を担っているものがあり、腸内環境だけでなく宿主の生理作用に寄与していることが知られている。本研究は、これら腸内細菌が産生するビタミン類に注目し、特に、リボフラビン (VB2)、パントテン酸、ピリドキシン (VB6)、ビオチン、葉酸、シアノコバラミン (VB12)、フィロキノロン (VK1)、メナキノロン (VK2) について、これらのビタミンが腸管免疫系細胞応答に与える影響を解析することを目的に実施した。これまでに食品成分が免疫性細胞応答に与える影響に注目した報告はあるが、腸内細菌が産生するビタミンに注目した免疫修飾作用についてはその詳細な報告がないことから、本研究が腸内細菌の新たな機能性を明らかにする上でもその重要性は高いと考えられる。そこで、腸管免疫系の代表的な粘膜免疫応答である免疫グロブリン (IgA) 産生は粘膜における感染防御応答に重要な役割を担っており、まず、上記の腸内細菌が産生に関与しているビタミンのうち、どのビタミンが腸管免疫系の IgA 産生に作用するのかを *ex vivo* での細胞応答に与える影響について解析を行った。さらに、無菌マウスにおける腸内細菌環境を制御した条件でのビタミンの免疫修飾作用についても明らかにすることをめざした。すなわ

ち、本研究では腸管免疫系細胞と上記のビタミンを共培養した際の IgA 抗体産生に与える影響を検討し、さらに B 細胞の IgA クラススイッチを誘導する細胞条件下におけるビタミン添加における影響を調べた。その上で、無菌マウスにおいては腸内に共生する腸内細菌が存在しないことから、腸内細菌が産生するビタミンの影響を排除した上でビタミン欠乏状態を食餌条件で制御することによって、真性のビタミン欠乏モデルマウスを作出し、ビタミン欠乏による腸管免疫系応答に与える影響の解析をめざした。

方 法

1) 腸管関連リンパ組織の細胞とビタミンとの共培養による IgA 産生応答について

8 ~ 10 週齢の雌性の BALB/c マウスから採取したパイエル板 (PP)、盲腸リンパ節 (CeP)、結腸リンパ節 (CoP) の細胞懸濁液を RPMI 1640 培地にて調製し、各細胞にマウス腸内細菌由来の *Bacteroides acidifaciens* type A43 の加熱死菌体 (BA) (0, 10 µg/mL)、および水溶性ビタミン (リボフラビン、パントテン酸、ピリドキシン、ビオチン、葉酸、シアノコバラミン)、脂溶性ビタミン (フィロキノロン、メナキノロン) をそれぞれの添加条件 (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 2500 nM) で 1 週間共培養した。その後、培養上清を回収し、培養上清中の総 IgA 量を ELISA により定量した。

2) ナイーブ B 細胞の IgA クラススイッチに対するビタミン添加による影響の検討

BALB/c マウスから脾臓を採取して脾臓細胞懸濁

液を調製した。そして、得られた脾臓細胞懸濁液を mouse B cell isolation カクテルと抗 CD43 抗体、抗 IgA 抗体を用いて磁気ビーズによるネガティブセレクションで単離し、ナイーブ B 細胞として調製した。得られた細胞画分に TLR4 リガンドとして LPS (*E. coli* 由来) 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、および 0 もしくは 1 μM のビオチンをそれぞれ添加して、さらに、TGF- β (2 ng/mL)、IL-4 (3 ng/mL)、IL-5 (3 ng/mL) をそれぞれ添加して 48 well (2.5 \times 10⁶ cells/well) プレートで 5 日間の培養を行い、細胞を回収した。ナイーブ B 細胞において IgM から IgA クラススイッチが起こる際には、Activation induced cytidine deaminase (AID) という酵素および I μ C α 分子が誘導される特徴があることから、それぞれの培養条件での回収した細胞より総 RNA を抽出し、cDNA を合成後、AID mRNA、および I μ C α mRNA の発現を real-time PCR で解析した。なお、添加するビタミンのうちビオチンの影響を検討するために、ビオチンフリーの培地として Eagle's MEM、ビオチンフリーの血清 (streptavidin agarose resin 処理済ウシ胎仔血清) を用いた培養系で解析した。

3) 無菌マウスを用いた真性のビオチン欠乏による腸管免疫系応答に及ぼす影響の解析 (現在継続して実施中)

8-12 週齢の無菌 BALB/c マウス、通常 BALB/c マウスに対してビオチン含有食またはビオチン欠乏食 (AIN-93) を 8 週間給餌した飼育を行っている。今後、脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板、結腸リンパ節を採取し、各リンパ節を除去した小腸および結腸組織も採取する。脾臓および各リンパ節は定法に従って細胞懸濁液を調製し、フローサイトメトリーによる T 細胞フェノタイプの解析 (CD4, CD69, CD44, CD45RB, Foxp3, PD-1, CXCR5 など) および IgA 産生を誘導する刺激として BA 加熱死菌体と共培養し、培養上清中の総 IgA 産生量を測定する。さらに、パイエル板除去後の小腸組織、および結腸リンパ節除去後の結腸組織をホモジナイズして腸管組織粘液中の総 IgA 量を定量する。

結 果

1) 腸管関連リンパ組織の細胞とビタミンとの共培養による IgA 産生応答について

PP 細胞においては、BA 菌体無添加条件でビオチン、パントテン酸が同ビタミンの無添加時よりも IgA 産生量が高まる傾向がみられた。BA 添加条件においては、ビオチン、パントテン酸、葉酸とのそれぞれの共培養条件では同ビタミンの添加によって総 IgA 産生は増加する傾向がみられた。しかし、いずれも独立した実験を十分に繰り返し行ってもバラツキが大きく、検討したビタミンの添加による有意な影響は認められなかった (図 1)。また、大腸部位の腸管関連リンパ組織である CeP、CoP 細胞においては、PP 細胞において比較的作用がみられたビオチン、パントテン酸の二種を添加し測定したが、相対値で数値を出した場合でも顕著な上昇が見られず、PP と比較して大腸部位の CeP および CoP 細胞のビタミンによる修飾作用は影響が少ないと考えられた。

2) ナイーブ B 細胞の IgA クラススイッチに対するビタミン添加による影響の検討

脾臓細胞から IgM を高発現しているナイーブ B 細胞を調製し、この細胞培養系に微生物菌体成分で刺激することにより、IgM から IgA へのクラススイッチを誘導する実験を行った。このとき、ビオチン添加濃度を 0 または 1 μM で添加した際に IgA のクラススイッチによって誘導される AID および I μ C α の mRNA 発現に注目したトランスクリプトーム解析を行った。それぞれの遺伝子発現は *Hprt* 遺伝子の発現を測定してその相対値として示した。その結果、ビオチンの添加によって IgA クラススイッチの誘導によってみられる I μ C α の mRNA 発現が高まる可能性がみられた (図 2)。

3) 無菌マウスを用いた真性のビオチン欠乏による腸管免疫系応答に及ぼす影響の解析

BALB/c マウスの無菌マウスおよび SPF マウスを

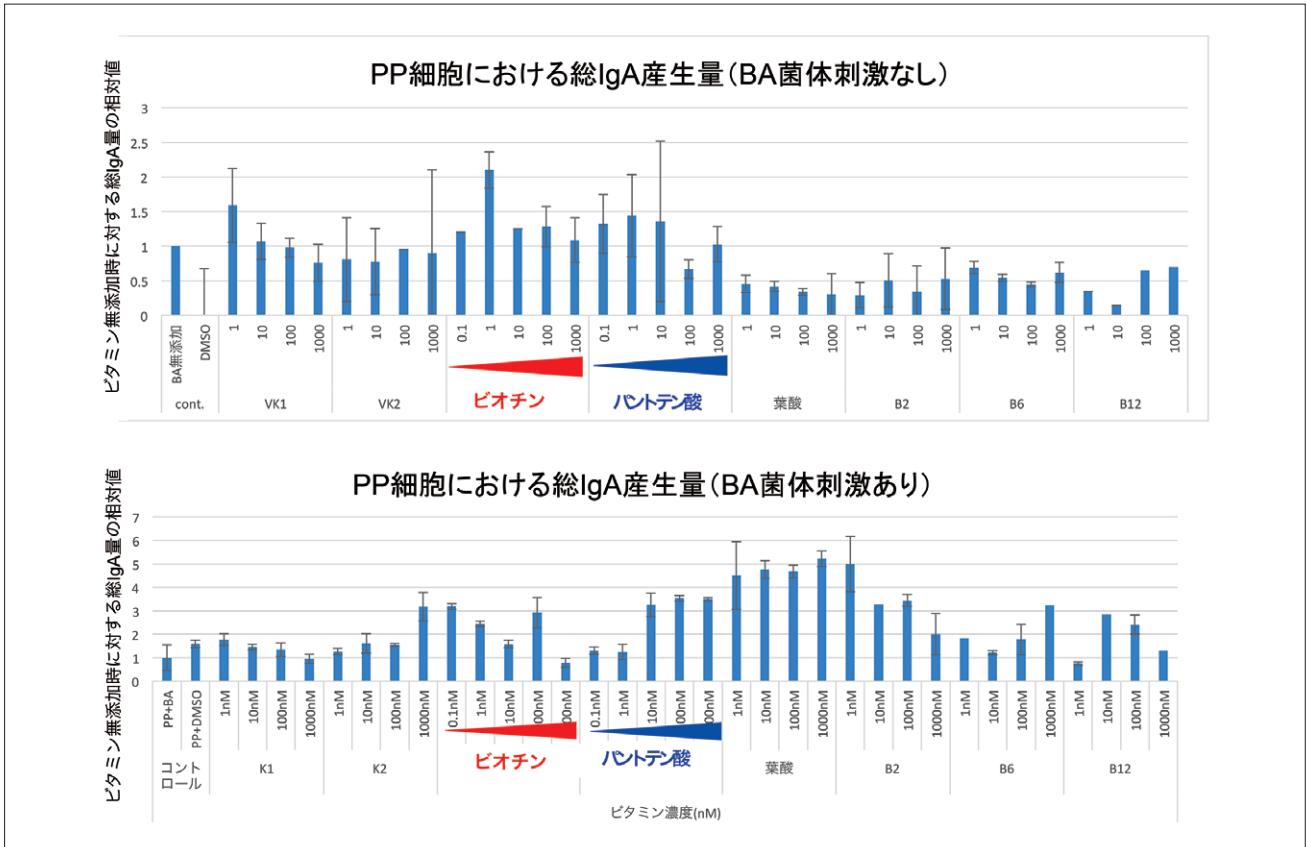


図1 PP細胞培養系にビタミンを添加した際のIgA産生応答に与える影響

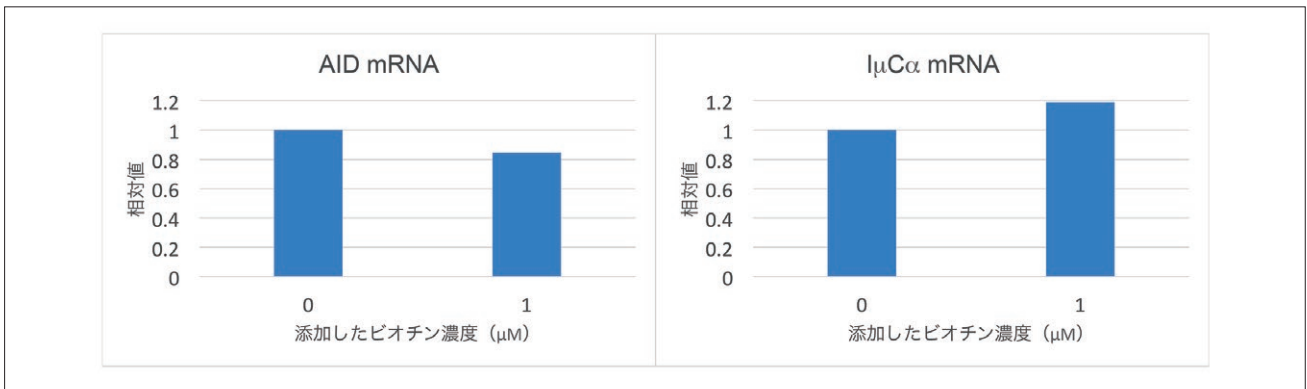


図2 ナイーブB細胞に対して菌体刺激でIgA産生誘導を行ったときのIgAクラススイッチに関連した分子のmRNA発現への影響

それぞれ無菌アイソレーターおよび通常の飼育環境下においてビオチン欠乏食 (AIN-93)、およびビオチン含有標準食 (AIN-93) にて飼育中であり、腸内細菌を制御した真性のビオチン欠乏条件における免疫系への影響を継続して検討中である。

考察

本研究で実施した腸管免疫系細胞の培養IgA産生応答の評価系における各種ビタミン添加実験においては、総IgA産生応答に与える影響は限定的で、ビオチンやパントテン酸がIgA産生を誘導する可能性があるかもしれないが、ビタミンがこの細胞応答に顕著に与える影響をうまく評価することができなかった。その理由として、RPMI 1640培地にはある

程度のビタミンが存在しており、IgA 産生応答に作用するビタミン濃度の閾値が低い可能性が考えられた。そのため、上記の実験において比較的細胞応答が高い傾向がみられたビオチンに注目し、培地中のビオチン濃度を下げた条件で検討を行う必要があると考えられた。実際に、培養実験に使用する培地中のビオチン濃度をアビジン処理して低下させることによって、ビオチンの添加による細胞応答への影響は IL-6 産生などにおいて変化することが確認されており、解析条件におけるビオチン濃度は大きな影響を与えていることが明らかとなった。今後、*ex vivo* 実験においても厳密なビオチン濃度を管理すること、さらに *in vivo* 実験においては腸内細菌が産生するビオチン濃度も考慮した真性のビオチン欠乏条件での解析が、本研究目的を達成するためには重要なポイントとなる。

なお、本研究で得られる知見は、免疫系が未発達な乳幼児および免疫系の機能低下によるリスクを抱える生物個体に対し、免疫調節作用を有するプロバイオティクスなどの機能性食品の開発に対して、抗感染作用に重要な IgA 産生を制御する生体応答を誘導するためのプロバイオティクス等の機能性開発にとって有用な情報となることが期待される。そして、この知見をもとに、機能性食品分子による免疫調節作用を介した応用性を検討し、腸共生系を標的とした機能性食品の設計をめざしてまいりたい。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

Analysis of the effects of vitamins produced by intestinal commensal bacteria on regulation of the host immune system

Akira HOSONO

*Department of Food Bioscience and Biotechnology, College of Bioresource Sciences,
Nihon University*

In the immune system, the commensal bacteria in the intestine play an extremely important role in the development of gut-associated lymphoid tissue, defense against infection, and immunoregulation of inflammation. This study focuses on the vitamins produced by these commensal bacteria, particularly riboflavin, pantothenic acid, pyridoxine, biotin, folic acid, cyanocobalamin, phylloquinone, and menaquinone. The purpose of this study was to analyze the effects of these vitamins on the intestinal immune system.

Among the vitamins produced by intestinal bacteria, which of these act on IgA production in the intestinal immune system was analyzed with respect to the effects on *ex vivo* cellular responses. Upon co-culture with a vitamin and Peyer's patch cells from the small intestine, biotin and pantothenic acid tended to result in higher IgA production, relative to cells without stimulation by the vitamin. However, even when independent experiments were repeated sufficiently, no significant effect on IgA production was observed due to addition of the vitamins. Naive B cells displaying high expression levels of IgM were prepared from spleen cells, and the resulting culture system was stimulated with microbial components to induce class switching from IgM to IgA. As a result, it was found that the expression of $I\mu C\alpha$ mRNA, which was observed via the induction of an IgA class switch, might be increased by the addition of biotin. Furthermore, in current work, germ-free mice or SPF mice are ingesting a biotin-deficient diet or biotin-containing standard diet, respectively. We are currently investigating the effects on the immune system under the condition of a biotin deficiency, which regulates immune responses *in vivo*.