

NewsLetter Vol.21 No.3

奨励賞受賞 | 第56回日本消化器免疫学会総会 (2019年8月1日, 2日 メルパルク京都)

周産期母体への抗菌薬曝露により子に生じる腸管 dysbiosis, 免疫発達異常, 炎症性腸疾患リスクの上昇

三好 潤^{1,2} Vanessa Leone² 三好 佐和子^{2,3} Sonny T.M. Lee²
A. Murat Eren² 久松 理一¹ Eugene B. Chang²

¹杏林大学医学部 消化器内科学 / ²Department of Medicine, The University of Chicago / ³杏林大学医学部 総合医療学

背景：炎症性腸疾患 (IBD) の病態生理はいまだ解明されていないが、遺伝的背景に加え、生活習慣や衛生環境等の環境因子の変化により腸管微生物叢 (microbiota) のバランスが崩れ (dysbiosis), 宿主-微生物の相互関係が乱れることで、宿主の免疫異常, IBD 発症に至ることが示唆されている。近年の疫学研究において、周産期、小児期の抗菌薬投与と IBD 発症リスク上昇の関連が報告されている。しかし、早期抗菌薬曝露, 腸管 dysbiosis, IBD リスク増加についての直接的な因果関係や機序はいまだ解明されていない。ヒトの腸管 microbiota は個人差が大きく、またさまざまな交絡因子が存在するため、microbiome 研究において動物モデルを用いた解析が大いに役立つ。我々は、周産期抗菌薬使用と児の IBD 発症リスク上昇という疫学的知見を模倣するマウスモデルを確立し、周産期に抗生剤へ曝露した母体から産まれた仔の dysbiosis, 免疫機構の発達, および腸炎発症リスクについて検討するために本研究を行った。

方法：IL-10 ノックアウト (IL10KO) マウスは *Helicobacter hepaticus* により腸炎を発症することが知られている。この交絡因子を除くため、本研究では *H. hepaticus* 非存在 SPF 環境を用いた。IL10KO 母マウスの個体差が腸炎発症に影響を与える可能性を考慮し、同一マウスの第1出産仔を抗菌薬非投与 (NT) 群 (メス17匹, オス23匹), 第2出産仔 (メス16匹, オス26匹) をセフォペラゾン投与 (CPZ) 群とした (図1A)。CPZ 群では母マウスに対して妊娠14日目から仔の生後3週齢 (授乳期) まで CPZ を飲水中に溶解して経口投与した。仔は3週齢で weaning され直接的な CPZ の摂取はないことを確認した (図1B)。CPZ 投与群と非投与 (NT) 群の仔マウスを23週齢まで追跡して自然腸炎発症リスクおよびデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性腸炎に対する感受性を比較した。自然発症腸炎リスクは腸炎による死亡率と観察期間終了時点の糞便中 lipocalin (LCN)-2 値により評価した。さらに児の経時的な腸内微生物叢の構成・機能の変化および免疫発達についても検討した。腸内微生物叢の解析にはマウス糞便から抽出した DNA サンプルを用いた。まず 16S rRNA 遺伝子シーケンシングにより母マウスの weaning 時および仔の3, 7, 11週齢の細菌構成を解析した。そしてメタゲノムショット

ガンシーケンシングを用いて仔の代表例の3, 7, 11週齢の微生物構成 (細菌のみならず真菌, ウイルスを含む) および微生物叢機能を検討した。さらに免疫学的解析として3週齢時点の腸管膜リンパ節における CD4⁺ T細胞分画および大腸粘膜におけるサイトカイン mRNA 発現を評価した。

結果：CPZ 群の仔マウスは NT 群と比較し、腸炎による死亡率が高く、特に雄マウスで有意差を認めた。23週齢時点で生存していたマウスにおいても CPZ 群では糞便中 LCN-2 が NT 群よりも有意に高値であった。以上より CPZ 群では NT 群に比して自然腸炎リスクが高いと考えられた。また CPZ 群では NT 群よりも DSS 誘発性腸炎に対する感受性が高いことが示された (図2A-C)。16S rRNA 遺伝子シーケンシングにより、母マウスへの周産期 CPZ 投与は母体の dysbiosis を生じ、この dysbiosis が仔に垂直伝播することが明らかになった。さらに、仔マウス糞便 DNA サンプルの経時的解析により、仔に生じた dysbiosis は長期間持続することが明らかとなった (図2D)。メタゲノムショットガンシーケンシング解析では、CPZ 群において、腸内細菌種の構成のみならず、microbiota 全体としての機能も変化していた。腸管膜リンパ節および大腸粘膜を用いた免疫学的解析では、3週齢時点で CPZ 群仔マウスは NT 群よりも炎症性の免疫状態となっていることが示された (図2E)。さらに無菌 IL10KO マウスに NT 群、CPZ 群の母マウスの糞便 microbiota をそれぞれ移

植し、繁殖させたと、CPZ 群糞便レシビエントから産まれた仔マウスは、対照群に比べて上記と同様の炎症性の免疫状態となっていた。

考察：我々は、IL10KO マウスを用いて母体に対する周産期抗菌薬曝露により仔の腸炎発症リスクが高まるマウスモデルを初めて確立した。本研究により、周産期 CPZ 投与により母マウスに生じた dysbiosis に出生後早期から曝露することが、仔マウスにおける長期間の dysbiosis, 免疫発達異常, および腸炎発症リスク上昇につながることを示された。本研究結果は、遺伝的背景を持つ子において母親の周産期の dysbiosis が IBD 発症リスク因子となる可能性および出生後早期に適切な microbiota を獲得することが宿主の生涯にわたる健康に重要である可能性を示唆していると考えられる。

第56回日本消化器免疫学会総会において、学術奨励賞をいただきましたことに心より御礼申し上げます。シカゴ大学にて microbiome 研究を行う機会をいただいた北里大学北里研究所病院炎症性腸疾患先進治療センター日比紀文センター長、本研究をご指導いただいたシカゴ大学 Eugene B. Chang 教授、杏林大学久松理一教授をはじめ、関係各位にあらためて感謝申し上げます。今回の受賞を励みに、より一層の研究に努めてまいります。今後とも、ご指導、ご鞭撻のほどよろしくお願い申し上げます。(三好 潤)

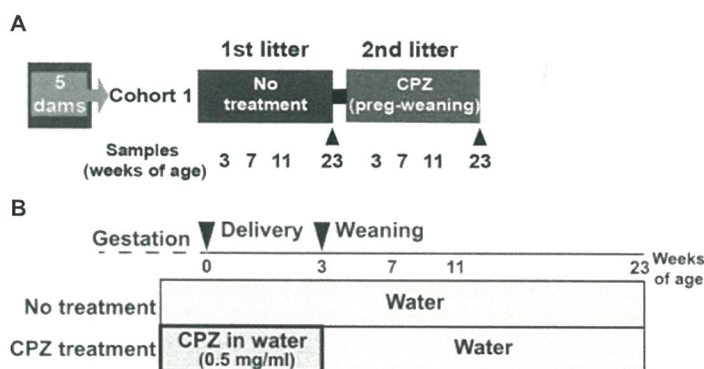


図1 IL-10 ノックアウトマウスを用いた周産期抗菌薬曝露 IBD モデルの検討
CPZ: セフォペラゾン

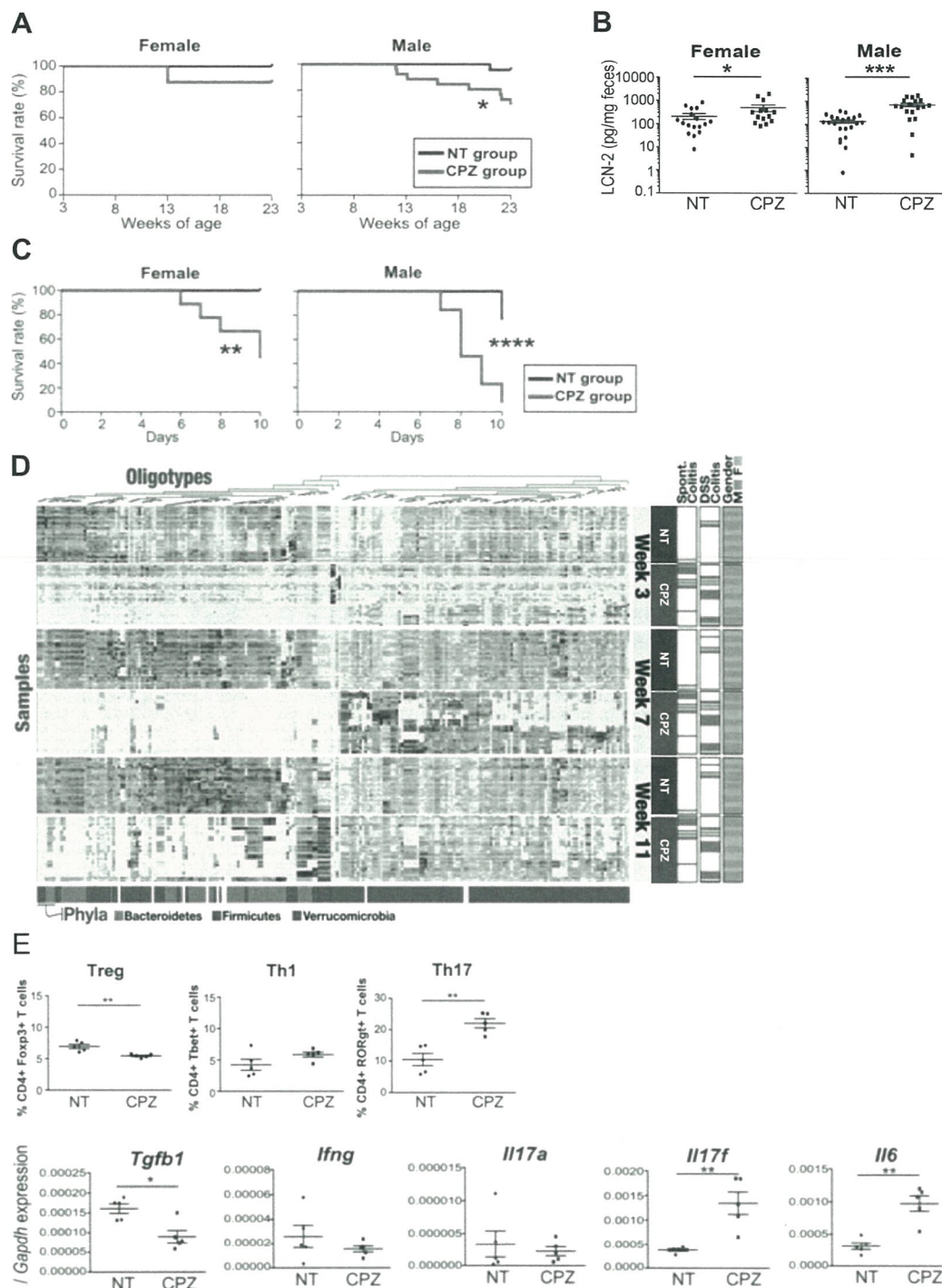


図2 母体の周産期 CPZ 曝露により仔に腸炎症リスク上昇, 腸管 dysbiosis, 免疫発達異常を生じる

奨励賞受賞 | 第56回日本消化器免疫学会総会 (2019年8月1日, 2日 メルパルク京都)

ヒト腸内ウイルス叢解析とそのデータベース構築

藤本 康介^{1,2} 植松 智^{1,2}

¹大阪市立大学大学院医学研究科 ゲノム免疫学 / ²東京大学医科学研究所 国際粘膜ワクチン開発研究センター 自然免疫制御分野

背景：次世代シーケンサーを用いたゲノム解析の進歩によって、炎症性腸疾患（クローン病や潰瘍性大腸炎）をはじめとしたさまざまな疾患の腸内細菌叢解析が行われた。特に腸内細菌叢の乱れ（dysbiosis）は、腸管に関連する疾患だけでなく、関節リウマチなどの自己免疫疾患、肥満や糖尿病などの代謝性疾患、動脈硬化などの循環器疾患、パー

キンソン病などの神経疾患などにも大きな影響を与えていることは、近年の非常に重要なトピックとなっている。そのため、腸内細菌をターゲットとした疾患制御法の開発が求められている。例えば、*Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* 起因性腸炎のように、健康な人の腸内細菌を移植する糞便移植療法が奏功する疾患もあるが、dysbiosis の原因菌に

対する特異的な治療法は乏しい。腸管内には細菌だけでなく、真菌やウイルスなどの微生物も常在している。しかし、それらのゲノム抽出法やデータ解析を含めた解析法の確立が不十分であり、未だその全貌が明らかとなっていない。さらに、ウイルスは細菌（16S rRNA）や真菌（18S rRNA や ITS (Internal transcribed spacer)）のようなターゲットシー

クエンスでの同定ができず、全ゲノム解析が必要となるため、膨大なデータ解析技術が必要である。腸管内に存在しているウイルスの大部分は、私たちに感染するウイルスではなく、宿主である腸内細菌に感染するバクテリオファージ（ファージ）であるため、dysbiosisの制御には腸内ウイルス叢の解析が非常に重要であると考え、ヒトに常在している腸内常在ウイルス叢の同定を試みた。

方法：100名を超える日本人の糞便から細菌DNA（沈殿画分）およびウイルスDNA（上清画分）を同一糞便から酵素法を用いて抽出した。抽出したDNAからライブラリーを作成し、次世代シーケンサー（IlluminaのHiSeqやMiSeq）を用いて全ゲノムシーケンスを行った。得られた膨大なシーケンスデータを東京大学医科学研究所のスーパーコンピュータ（Shirokane 3および4）を用いて、細菌種およびウイルス（主にファージ）種の分類や、宿主（細菌）と寄生体（ファージ）の感染関係を検索した。

結果：既存のデータベースが不十分であり、腸内ウイルスのシーケンスリードはわずか0.1%程度しか相同性解析ができない。また、腸内ウイルス叢解析に特化した解析ツールは存在しない。そのため、シーケンスリードをアセンブリしてコンティグを作成し、それらのオーバーラッピングフレーム（ORF）を特定することでウイルスの分類を行った。まずシーケンスリードをアセンブリするためのアセンブラーの比較を、世界的に代表的なアセンブラーであるSPAdes、

MetaSPAdes、IDBA-UD、MEGAHITの4つを用いて行った。これらのうち、より長いコンティグを作成できるだけでなく、エラーが最も少なかったMetaSPAdesを組み込んだ独自の腸内ウイルス解析パイプラインを構築した。これまで腸管内常在ウイルスは、1本鎖DNAウイルスのMicroviridaeや2本鎖DNAウイルスのCaudovirales（Shiphoviridae、Myoviridae、Podoviridae）と報告されてきたが、2014年に初めて同定された2本鎖DNAウイルスのcrAssphage（p-crAssphage）や近年相次いで報告のある2本鎖DNAウイルスのcrAss-like phageも腸内常在ウイルスとして数多く同定された。また、Shiphoviridae、Myoviridae、Podoviridaeのタンパクを混在して持っているCaudoviralesや、Microviridaeの主要な構造タンパクであるCapsid protein Fを有しながらCaudoviralesのタンパクも保有するような新規腸内ウイルスを複数同定した。健康者の腸内ウイルスをクラスタリングすると、細菌叢は正常パターンであっても、腸内ウイルス叢には非常に多様性があり、Microviridae-dominantなグループ、Caudovirales-dominantなグループ、crAss-like phage-dominantなグループに分かれることが明らかとなった。さらに、prophageやCRISPR配列を基盤とした宿主細菌とウイルスの感染関係を検出したが、非常に複雑で特徴的であった。これまで宿主（細菌）と寄生体（ファージ）の感染関係は特異的で基本的には1対1対応と考えられていたが、1つのファージが異なる細菌種に感染することも明らかとなった。

結論：これまで腸内ウイルス叢解析は全ゲノム解析が必要で、かつ非常に膨大なデータ解析を必要とすることもありほとんど解析が進んでこなかった。しかし、腸内細菌と同じように莫大な数の腸内ウイルスが存在しており、さらに腸内細菌を宿主としていることから腸管恒常性を理解する上で無視できない存在であると考えられる。また、同一サンプルから細菌叢およびウイルス叢の全ゲノム解析を行うことで、宿主（細菌）と寄生体（ファージ）の感染関係を同定できることは非常に重要と考える。今後さまざまな疾患に対して腸内ウイルス叢解析を進めることでファージを用いたファージ療法によるdysbiosisの制御も可能となるかもしれない。引き続き大規模な腸内ウイルス叢解析を進めることで、新たな治療ターゲットの創出につなげたい。

この度は第56回日本消化器免疫学会総会におきまして奨励賞をいただき、大変光栄に思っております。審査員の先生方に深く御礼申し上げます。また奨励賞受賞にあたり、日頃から手厚くご指導を頂いておりました植松智先生をはじめ、いつもサポートしてくださる大阪市立大学および東京大学医科学研究所の研究室スタッフにも大変感謝しております。今回の受賞を励みに、本発表に関連する研究プロジェクトをさらに発展できるよう精進して参りたいと思います。引き続きご指導のほどよろしくお願い致します。（藤本康介）

参加報告 | 19th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI2019) (2019年7月16日~20日 ブリスベン オーストラリア)

ICMI 2019 報告書

山田 大貴



参加の感想：初参加のため例年との違い等に関しては分からないのですが、今回はオーストラリアのブリスベンにあるConvention & Exhibition Centreでの開催でした。口演と毎日に代わるポスター発表が中心で、消化器関連も含め粘膜免疫全般の様々な発表がありました。抄録集の配布や配信等がなく、大学院1年目の私にとっては難しい内容も多々ありましたが、乳児の壊死性腸炎をモデルとしたマウス実験の報告やMAIT cellsに関する最新の知見等、興味深い発表が数多くありました。私自身のポスター発表の際には、論文を引用させていただいた研究チームの先生方が声をかけて下さり、お互いの研究内容に関してディスカッションする事が出来、今後の研究に関するヒントが得られたように思いました。免疫学の知識を深めつつ、次回以降も参加して粘膜免疫に関する最新の知見を学ばせていただきたいと思います。

発表演題：回盲部領域と炎症性腸疾患（IBD）の関連性に関してはいくつかの既報があり、クローン病で特に回盲部病変がみられる事や、虫垂切除により潰瘍性大腸炎発症のリスクが下がる事などが報告されている。

また、ヒトの虫垂にはリンパ組織があるが、マウスにもそれに該当する組織が盲腸のリンパ濾胞として存在している事が知られており、dextran sulfate sodium (DSS) で腸炎を誘発したマウスモデルにおいて、虫垂切除をしたマウスでは腸炎の重症度が低下する事も報告されている。

数多の既報から回盲部領域がIBDの病態と関わりがある事が示唆されるが、そのメカニズムに関しては未だに明らかになっていない。

そこで我々はマウス腸炎モデルを用いて回盲部領域の免疫応答の解析を行う事とした。

マウス腸炎モデルはTh2 優位の潰瘍性大腸炎モデルであるオキサゾロン誘発腸炎モデルを用いた。前感染として3%オキサゾロンと100%エタノールを皮膚に塗り込み、1週間後に1%オキサゾロンと50%エタノールを注腸して腸炎を誘発し、5日後にマウスを安楽死させて解析を行った。するとオキサゾロン腸炎マウスでは大腸炎に加え、回盲部領域に潰瘍形成を認めた。また、粘膜固有層リンパ球においてIFN- γ やIL-4、IL-17といった炎症性サイトカインの発現が有意に亢進していた。

回盲部領域に潰瘍を認めた事から、我々は盲腸リンパ濾胞の免疫応答が腸炎の病態に関わっているのではないかと仮説をたて、次にオキサゾロン腸炎を誘発する前に虫垂切除を行ったマウスを用いた解析を行った。

すると、事前に虫垂切除を行ったマウスでは病理学的に腸炎の重症度が低下している事が確認できた。また、これらのマウスでは炎症性サイトカインの産生も減少していた。

これらの結果から、盲腸リンパ濾胞の免疫応答が腸炎の病態に関わっている可能性が示唆された。

次に、我々は盲腸リンパ濾胞内の特定の細胞腫がこの腸炎モデルにおいて炎症を惹起しているのではないかと考え、マクロファージや樹状細胞などのように盲腸リンパ濾胞内に存在している様々な細胞腫に対して、その働きの解析を行った。解析を進めていく過程で我々はB細胞に注目し、成熟B細胞を欠くマウスモデルである μ MTマウスに対してオキサゾロン腸炎を誘発して解析を行った。

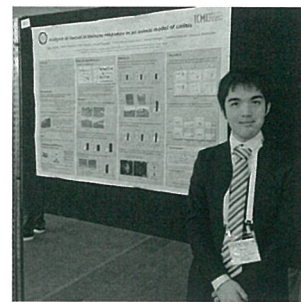
その結果、 μ MTマウスでは回盲部領域の潰瘍だけでなく、病理学的な腸炎の重症度もコントロール群より減弱していた。また、 μ MTマウスでは腸炎誘発時のIL-4とIL-17の産生も抑制されていた。これらの結果から、オキサゾロン誘発腸炎モデルにおいて、腸炎の発症に盲腸リンパ濾胞内のB細胞サブセットが重要な役割を果たしている事が推測された。

盲腸リンパ濾胞内B細胞の免疫応答を動的にとらえるため、我々はB細胞特異的にYC3.60を発現させたトランスジェニックマウスを用いて、生体内イメージングシステムを活用する事とした。YC3.60は蛍光共鳴エネルギー移動技術（Fluorescence Resonance Energy Transfer technology）に対応したカルシウムイオンのバイオセンサーである。カルシウム濃度の低い細胞内ではシアン色変異体のみの蛍光がみられるが、細胞内のカルシウム濃度が上昇するにつれてシアン色変異体だけでなく、黄色変異体の蛍光もみられるようになっていく。そのため、シア

ン色変異体に対する黄色変異体の蛍光割合が細胞内カルシウム濃度の変動を反映するとされ、細胞活性化の一種のマーカーとなりうるとされている。

このシステムを用いて、オキサゾロンを注腸したマウスとコントロールとしてエタノールを注腸したマウスの2群に対して、翌日に盲腸リンパ濾胞内のB細胞のカルシウムシグナリングの解析を行った。すると、エタノールを注腸した群ではB細胞内のカルシウム濃度の上昇がほとんど観察されなかったのに対して、オキサゾロンを注腸したマウスでは多くのB細胞でカルシウム濃度の上昇が観察された。オキサゾロンを注腸したマウスにおいて盲腸リンパ濾胞内B細胞の表面に発現する免疫グロブリンのクラスに関しても解析をしたが、コントロール群と有意

差を認めなかった。そのため、今回の実験系では特定の免疫グロブリンを持つB細胞サブセットが特異的に活性化している可能性は低いと考えられた。一方で、CD80/86等のB細胞活動性マーカーに関しては、盲腸リンパ濾胞内B細胞で有意に発現が亢進している事が確認出来、盲腸リンパ濾胞内B細胞の活性化を裏付ける結果となった。この結果から、オキサゾロン腸炎を誘発したマウスに関して、誘発の翌日の時点で盲腸リンパ濾胞内B細胞がすでに活性化している事が示唆された。これはB細胞が担う免疫応答としては極めて速い反応であり、今までに明らかになっていない免疫応答の経路が関わっている可能性も否定できない。よって、同メカニズムの解明が炎症性腸疾患の病態解明の一助となりうる可能性もある。



以上より、マウス盲腸リンパ濾胞内B細胞の活性化は腸炎の初期段階における獲得免疫系の誘導に関わっている可能性があり、そのメカニズムを解析する事は炎症性腸疾患の病態を解明する一助となりうると考えられた。

International Congress of Mucosal Immunology 2019 参加報告

大坪 加奈



2019年7月16日～20日の日程でInternational Congress of Mucosal Immunology 2019がブリスベン（オーストラリア）で開催され、参加して参りました。ブリスベンにはシドニー、メルボルンに次ぐ第3の都市であり、高層ビル街や歴史ある建築物の他、郊外は自然溢れ、観光地としても有名なゴールドコーストやローンパイン・コアラサンクチュアリーへも至近な立地です。今回訪れたのは7月、南半球のオーストラリアは冬でしたが、年間を通して晴れが多く「サンシャインステート」とも呼ばれるブリスベンでは天候にも恵まれ、日中は気温が20℃まで上昇するなど温暖で過ごしやすき気候の中での学会参加となりました。ICMIは腸管免疫の研究に従事する免疫学、病理学、微生物学などのエキスパートが世界中から参加する権威ある学会で、最先端の研究について学ぶことができる非常に魅力的な学会です。

今回の私の発表は、詳細は後述致しますが、ポリユビキチンイメージングを用いた腸管上皮の細胞死とオートファジーに関するもので、ポスター発表の機会を頂き、参加いたしました。会場はブリスベンの中心部であるCBDからほど近い、Brisbane Convention & Exhibition Centreの1フロアで開催され、ポスターは3日間の日程に分けられて行われました。

私は会期初日に発表をさせて頂き、著名な先生方のセッションや口頭発表を聴講した後、ポスター発表の機会を得ることができました。口頭発表は、私の日常従事する消化器内科分野（潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患）の他、腸管免疫に関連してmicrobiotaや1型糖尿病、COPD、新生児壊死性腸炎（NEC）、寄生虫に関連したものなど多岐に渡っており、それぞれが初学者にも分かりやすく、また興味をそそる内容で発表されており、多くの知見や情報、研究方法への参考となる内容を聞くことができ、非常

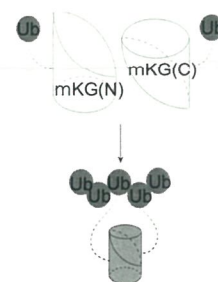
に有意義でした。また、ポスターの中にはコアラの腸管免疫などオーストラリアならではの感じる発表もあったことが印象に残っております。残念ながら私のポスター発表日は、同じ研究分野を主としている方は少ない印象でしたが、英語でのディスカッションや他の研究者の方へ質問をする機会を得たことは大いに刺激となり、今後のモチベーションへと繋がったと感じております。

最後になりますが、学会参加および発表にあたり派遣頂きました日本消化器免疫学会の皆様、また今回寄稿の機会を頂きました編集部の方に厚く御礼を申し上げます。



【題名】新規ポリユビキチンイメージングシステムによる腸管上皮細胞の細胞死とオートファジーシグナルのクロストークの解明
【目的】炎症性腸疾患（IBD）は、遺伝的背景に起因する宿主の腸内微生物に対する不適切な炎症反応が一因となっている可能性が示唆されている。その不適切な応答の一つとして腸上皮細胞におけるプログラムされた細胞死、カスパーゼ非依存型であるネクロプトーシスの関与が考えられている。我々はネクロプトーシスシグナルにおける重要な分子であるReceptor-interacting kinase 3（RIP3/RIPK3）のユビキチン化がネクロプトーシスを調節することを報告してきた。また、一方でIBDに関与していると考えられているオートファジーとネクロプトーシスとの相互作用は以前より指摘されているが、シグナル伝達のクロストークについてはほとんど解明されていない。我々は、ユビキチン化がクロストークにおいて重要な役割を果たしていると考えたが、残念ながら鎖特異的にユビキチン鎖形成を可視化する方法がなかった。そこでポリユビキチン鎖形成を視覚化するために、蛍光蛋白質再構成法（bimolecular fluorescence complementation, BiFC）を用いたポリユビキチン鎖イメージング、PolyUb-FCアッセイを開発した。PolyUb-FCアッセイは、モノユビキチンでは非蛍光性であるのに対し、ポリユビキチン鎖形成されると抗体を使用せずに生細胞で直接可視化できるという利点があるため、本アッセイを用いて

細胞死とオートファジーシグナルのクロストークについて解析を行った。



reconstituting mKG fluorescence

【結果】まず、PolyUb-FCの蛍光がユビキチン鎖特異的であることを明らかにするためユビキチン抗体を用いた検証を行った。PolyUb-FCのpunctaは、ユビキチン抗体を使用した免疫染色によるpunctaと共局在した。そこでPolyUb-FCアッセイを用いて細胞死とオートファジーシグナル関連タンパク質のクロストークを調べることとした。ネクロプトーシス刺激であるTNF + zVADは、腸管上皮細胞においてオートファジーのマーカーであるMicrotubule-associated protein light chain 3（LC3）punctaを増加させることが明らかとなった。このことからネクロプトーシス刺激によりオートファジーが変化している可能性が示唆された。さらにネクロプトーシス刺激がRIPK3とPolyUb-FCの共局在化を誘導し、次にPolyUb-FCがオートファジーアダプタータンパクであるSQSTM1/p62と局在することを明らかにした。またPolyUb-FC punctaはLC3と共局在し、この共局在はSQSTM1/p62欠損により減少することを示した。これらのことから、ネクロプトーシス刺激によりオートファジーが変化する可能性と共に、PolyUb-FCがネクロプトーシスにおけるポリユビキチン鎖の生成を経時的に解析するための有用なツールであることが判明した。このツールを用いてオートファジーの関与を明らかにしていくことでIBDの研究における新しい知見を得ることができると考えられた。

