

論文の内容の要旨

論文題目 腸管上皮 M 細胞による免疫恒常性維持機構の解明
氏名 中村 有孝

【背景】

腸管は体内臓器でありながら、その管腔内には多くの微生物が共生している。近年、こうした共生微生物やその代謝物と宿主の免疫系には緊密な相互作用があることが明らかとなってきた。一方で、主に発展途上国で大きな衛生的問題となっている大腸菌症、コレラ、赤痢などは腸管を介してヒトに感染する。また、先進国においては、自己免疫疾患に分類される炎症性腸疾患(IBD)の罹患数が急速に増加している。IBD の原因としては、諸説あるが腸内細菌に対する異常な免疫反応であるという説が有力である。つまり、粘膜感染症や IBD などの胃腸疾患は世界共通の健康問題であり、この解決は医学研究の重要な使命であると言える。

本研究では、腸内細菌などの管腔微生物(抗原)を体内に取り込む機能を有する上皮細胞である M 細胞が、病原体の腸管感染において宿主の免疫恒常性に果たす役割を解明した。M 細胞は小腸のパイエル板など腸管関連リンパ組織(GALT: gut-associated lymphoid tissue)の上皮層に存在し、管腔微生物を直下の樹状細胞などの抗原提示細胞に受け渡している。この機構は、強固なバリア機能によって管腔と体内が隔てられている腸管の粘膜固有層において宿主に強力な獲得免疫を誘導するために重要であると考えられている。しかしながら、こうした M 細胞を介した獲得免疫誘導が、粘膜感染症に対してどのような役割を有しているか詳細は不明であった。

【結果】

本研究において、M 細胞の機能的成熟に必須の転写因子である Spi-B を欠損したマウス(*Spib*^{-/-}マウス)は、リンパ濾胞の縮小や胚中心 B 細胞の減少など、GALT の機能低下を推測させる所見を示した。また、*Spib*^{-/-}マウスでは粘膜型抗体である IgA へのクラススイッチや記憶 T 細胞が減少していた。つまり、M 細胞による抗原取り込みは、GALT の成熟を促し、粘膜における免疫応答に影響を与えていることが示された。

M 細胞の粘膜免疫応答に対する影響を調べるため、*Spib*^{-/-}マウスをヒト腸管病原性大腸菌(EPEC: Enteropathogenic *Escherichia coli*)のマウスモデルである *Citrobacter rodentium* に感染させ、感染に対する応答を野生型マウスと比較した。*Spib*^{-/-}マウスは、*C. rodentium* 感染に対して体重減少や慢性的な下痢便を示すなど、高感受性であった。さらに、組織所

見などから *C. rodentium* に感染した *Spib*^{-/-}マウスは慢性的な大腸炎や腸内細菌の全身移行を呈した。この結果は、*Spib*^{-/-}マウスにおける成熟 M 細胞の消失により、腸管の免疫恒常性が攪乱され、粘膜のバリア機能が低下することによって *C. rodentium* 感染に対する感受性が増加したと推測させた。ところで、Spi-B は M 細胞だけでなく、形質細胞様樹状細胞や B 細胞など骨髄系細胞にも発現することが報告されている。従って、これら骨髄系細胞における Spi-B の欠損が *C. rodentium* 感染での *Spib*^{-/-}マウスの感受性増加に関与している可能性が考えられた。そこで、骨髄キメラマウスを作成し、感染実験を実施したところ、骨髄系細胞における Spi-B の欠損は、*C. rodentium* 感染に対する感受性増加に関与しなかった。つまり、非骨髄系細胞である M 細胞の成熟が Spi-B の欠損によって阻害されたことが、*C. rodentium* 感染に対する感受性を増加させた原因であると示唆された。

続いて、M 細胞と感染性腸炎の増悪がどのように関連するか明らかにするために、*C. rodentium* 感染時における *Spib*^{-/-}マウスの獲得免疫応答を調べた。まず GALT において主に誘導され、腸管管腔内に分泌される分泌型 IgA (SIgA) を調べると、感染 16 日目の *Spib*^{-/-}マウス糞便からは *C. rodentium* 特異的 SIgA が検出されなかった。一方、同時期の野生型マウス糞便からは *C. rodentium* 特異的 SIgA が検出された。この結果は、*C. rodentium* が M 細胞によって取り込まれ、獲得免疫応答を誘導することを示している。続いて、*C. rodentium* 排除に必須であると報告のある血清中の特異的 IgG を検出した。しかし、感染 16 日目における特異的 IgG は両群の血清中で増加していた。つまり、*C. rodentium* 特異的 SIgA が GALT において M 細胞依存的に誘導される一方で、病原体排除に必要とされる特異的 IgG は、M 細胞による抗原取り込み非依存的に誘導されることを示している。

次に、*Spib*^{-/-}マウスの大腸における細胞性免疫を検証した。重篤な下痢症状を呈する感染 16 日目の *Spib*^{-/-}マウスの大腸粘膜固有層では、慢性的な大腸炎を反映して、特に Th1 細胞が増加していた。一方で、樹状細胞及び抗原との共培養により、抗原特異的な Th 細胞を検出すると、健常時の *Spib*^{-/-}マウス大腸では、腸内細菌の抗原に反応し、それぞれ IFN- γ や IL-17A を産生する抗原特異的 Th1 細胞及び Th17 細胞の減少が認められた。これらの結果から、感染した *Spib*^{-/-}マウスの大腸では、Th 細胞の総数が増加するものの *C. rodentium* 特異的な Th1 及び Th17 細胞が減少していると予想した。しかし、感染 16 日目の大腸において *C. rodentium* 特異的 Th 細胞は *Spib*^{-/-}マウスにおいて増加していた。一方で、GALT の1つである回腸パイエル板では、野生型マウスで *C. rodentium* 特異的 Th 細胞が誘導されていたのに対し、*Spib*^{-/-}マウスではほとんど誘導されていなかった。つまり、*Spib*^{-/-}マウスにおいては、免疫誘導組織において特異的 Th 細胞が誘導されなかった一方で免疫実効組織においてはその細胞数が増加していた。これらの結果より、感染 16 日目の *Spib*^{-/-}マウス大腸に分布する *C. rodentium* 特異的 Th 細胞は、GALT 非依存的に誘導されたことが推測された。ここで *C. rodentium* に感染した *Spib*^{-/-}マウスでは、感染 7 日目から

細菌の全身移行が促進していた。このことより、*Spib*^{-/-}マウスでは、感染初期に体内移行する細菌が増加することにより、粘膜固有層や全身組織において特異的な免疫誘導が促進された結果、感染後期の*C. rodentium* 特異的 Th 細胞が増加したと推測された。実際に、感染 16 日目の脾臓における *C. rodentium* 特異的 Th 細胞は、野生型マウスに比較して *Spib*^{-/-}マウスで有意に増加していた。つまり、*C. rodentium* 感染末期に認められる Th 細胞の増加や炎症の増悪は、細菌の体内移行によって脾臓などでも免疫誘導が起こった二次的な結果であると示された。

そこで、*C. rodentium* 感染初期において細菌の体内移行が促進されるメカニズムの解明を試みた。感染 7 日目の大腸では *C. rodentium* 特異的 Th 細胞は検出されなかったため、病原体に対して特異的な Th 細胞がこの現象に関与する可能性は低い。そこで、健常時に *Spib*^{-/-}マウスで減少が認められた腸内細菌特異的な Th 細胞を *C. rodentium* 感染期間中に検出した。野生型マウスに比較して *Spib*^{-/-}マウスの大腸では、感染前から感染 12 日目まで腸内細菌特異的 Th1 細胞が減少していた。この結果より、感染前において M 細胞依存的に確立された腸内細菌特異的 Th 細胞が、*C. rodentium* 感染の感受性に関与している、という仮説を立てた。この仮説を検証するため、野生型及び *Spib*^{-/-}マウスのパイエル板、盲腸、大腸から CD4 陽性細胞を回収し、成熟した B 細胞及び T 細胞が存在しない *Rag1*^{-/-}マウスに養子免疫移植した。つまり、このマウスは野生型あるいは *Spib*^{-/-}マウスの腸管に分布していた Th 細胞のみを有する。*C. rodentium* 感染において、*Spib*^{-/-}の腸管 CD4 陽性細胞を移植したマウスでは、野生型のものを移植したマウスよりも重篤な大腸炎、脾臓の腫大を示し、このマウスはドナーマウスの表現型を完全に再現した。これらの結果は、感染前の腸内細菌特異的 Th 細胞の M 細胞依存的な確立が、*C. rodentium* 感染時における炎症増悪を防ぐために重要であることを示唆している。

最後に、これらの腸内細菌特異的 Th 細胞が、どのようなメカニズムで細菌の体内移行を抑制しているかを検証した。*C. rodentium* が感染したマウスでは、Th 細胞由来の IFN- γ により、上皮細胞の入れ替わり(ターンオーバー)が加速し、接着した *C. rodentium* を排除することで組織の恒常性を維持することが知られている。そこで、増殖している細胞を標識する EdU を腹腔内に投与し、非感染時及び感染時における *Spib*^{-/-}マウスの上皮ターンオーバーを評価した。野生型マウスに比較して *Spib*^{-/-}マウスでは、細菌の体内移行が促進する感染 5 日目から 7 日目において上皮ターンオーバーが遅延していた。この遅延は非感染時には認められなかったため、*C. rodentium* 感染応答性である。

【考察】

本研究の結果より、腸管の粘膜免疫系について、以下の機構が明らかとなった。

M 細胞による抗原取り込みは、GALT を成熟させることにより、恒常的に腸内細菌特異的 Th 細胞を誘導している。これらの腸内細菌特異的 Th 細胞は、大腸の粘膜固有層に供給され、*C. rodentium* 感染などによって上皮バリアが破壊されると、それに伴って侵入してきた腸内細菌を即座に認識する。活性化した粘膜固有層の Th 細胞は、IFN- γ などのサイトカインを産生することで上皮ターンオーバーなどの粘膜バリア機能を強化することで細菌の体内侵入を抑制している。

この免疫機構は、多くの腸内細菌が常在する腸管粘膜において、非常に合理的なシステムと言える。新規の病原体に対して獲得免疫を誘導する場合、1-2 週間程度の時間を要する。しかし、腸内細菌に対する獲得免疫が誘導されていれば、上皮バリア破綻の原因に関わらず、破綻によって侵入してきた腸内細菌に対して強力な獲得免疫を即座に発動する事ができる。

本研究は、粘膜感染症に対する宿主防御機構の一部を解明した。また、本研究の成果は経口ルートで粘膜に免疫を誘導する粘膜ワクチンの利用において、分泌型抗体産生だけでなく、細胞性免疫による組織恒常性維持効果をもたらす可能性を示している。本研究成果を発展させることにより、粘膜感染症や胃腸疾患に対する新しい治療、予防戦略が確立できると考えられる。