

# 腸内微生物による腸管外免疫の制御機構

筑波大学 医学医療系 免疫学教室

金 倫基

## 緒言

ヒトの腸管にはヒトの腸管には 1000 種、100 兆個以上の微生物が絶妙なバランスを維持しながら共生し、ビタミン類・単鎖脂肪酸などの栄養供給や、腸管免疫系の発達・恒常性維持に重要な役割を果たしていることが知られている。さらに近年、この腸内の常在微生物が腸管だけでなく、腸管外免疫系の調節因子としての役割を担っている可能性が示唆されている。例えば、腸内細菌の全くない無菌マウスにおいて、気道炎症が悪化すること (1)、また、マウス糖尿病モデルを用いた研究から、腸内細菌のバランス異常が糖尿病の悪化にも関与すること (2)、経口的に接種された腸管由来のプロバイオティクスが全身性の抗腫瘍免疫を活性化すること (3) なども報告されている。しかしながら、腸内微生物が腸管外免疫を調節するメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。

本研究では腸内環境、特に腸内微生物バランスが崩れることにより、炎症性疾患の病態変化が引き起こされるのかを検証し、そのメカニズム解明に迫る。我々は、経口抗生剤を投与することによってマクロファージの機能が変化することで papain による気道炎症が増悪することを見出した。さらにこの経口抗生剤による気道炎症の増悪とマクロファージの機能変化に、腸管カンジダの異常増殖が関与することを見出した。

## 方法・結果および考察

### 1. 経口抗生剤投与マウスにおいて肺炎症が増悪する。

経口抗生剤 (クリンダマイシン、セフォペラゾン) を投与し、腸内環境を攪乱させたマウス (Abx) に、気道炎症モデルで用いられている papain を連続曝露させた。その結果、Abx マウスにおいて、気管支洗浄液 (BAL) 中の総細胞数、好酸球数、マクロファージ数が対照マウスと比べ有意に増加し (図 1A、B)、肺組織の炎症が増悪していた (図 1C)。

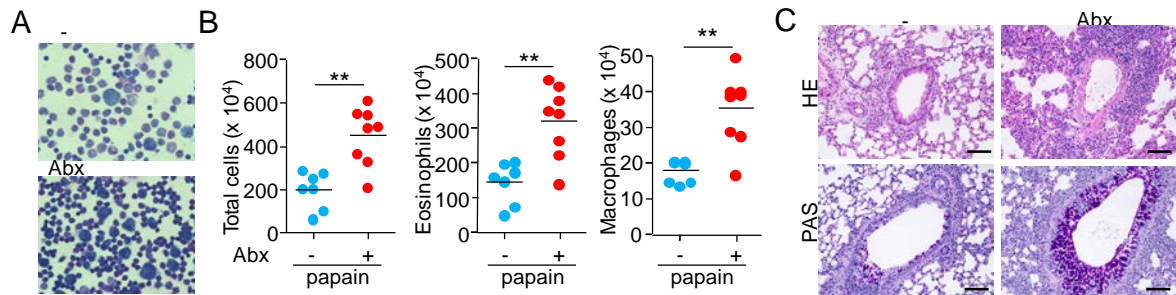


図 1. 経口抗生剤投与マウスにおいて papain による気道炎症が増悪する。

対照群 (control)、抗生剤投与群 (Abx) に papain (150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を 3 日に 1 度、計 5 回投与した。

(A) 気管支肺洗浄液中のサイトスピンによる細胞観察。

(B) 気管支肺洗浄液中の総細胞数。

(C) 肺組織の H&E 染色および PAS 染色像。

\*\* :  $p < 0.01$ 。

### 2. 経口抗生剤投与はマクロファージの機能を変化させる。

経口抗生剤投与によって気道炎症が増悪することが観察されたが、獲得免疫系の機能しない Rag-1 欠損マウスにおいても papain 誘導性の気道炎症増悪が見られた (図 2A)。ことから、経口抗生剤投与により自然免疫応答が変化している可能性が示唆された。無処置マウスの BAL 中の細胞のほとんどが肺胞マクロファージであることから、肺胞マクロファージの関与を考えた。クロドロネートリポソーム ( $\text{Cl}_2\text{MBP}$ ) を用いて肺胞マクロファージを除去すると、papain 誘導性の気道炎症が抑制されたが、対照群と経口抗生剤投与群において有意な差は認められなくなった (図 2B)。さらに、対

照マウスまたは経口抗生剤投与マウスから肺胞マクロファージを分離し、Naive マウスに移入後、papain 誘導性の気道炎症を比較した結果、経口抗生剤投与マウス由来の肺胞マクロファージ移入群で増悪した (図 2C)。以上の結果から、経口抗生剤の投与によって肺胞マクロファージの機能が変化し、気道炎症増悪に繋がったと考えられた。そこで肺胞マクロファージの極性を検討したところ、経口抗生剤投与マウス由来の肺胞マクロファージにおいて、アレルギー応答に関与する M2 マクロファージマーカー (*arg1*, *chi3l3*, *retla*) の発現上昇が観察された (図 2D)。

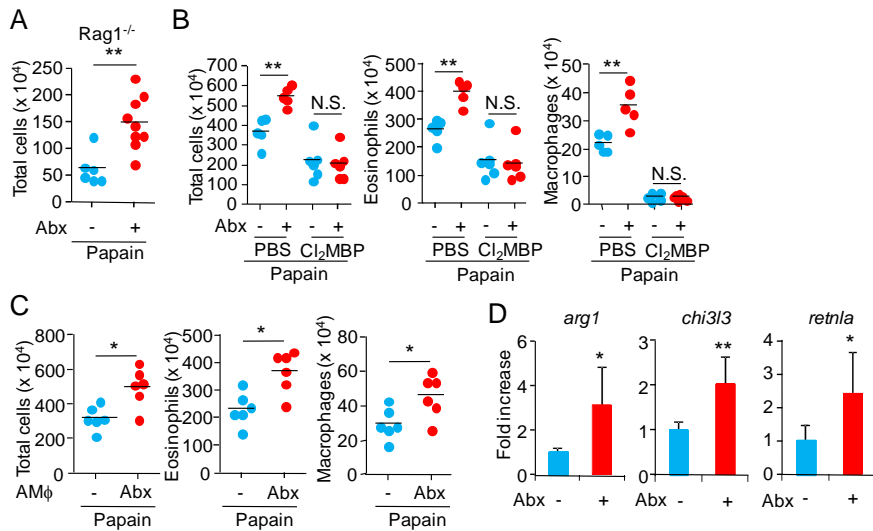


図 2. 経口抗生剤投与はマクロファージの機能を変化させる。(A) Rag1<sup>-/-</sup>マウスにおける対照群 (control)、抗生剤投与群 (Abx) に papain (150 μg/mL) を 3 日に 1 度、計 5 回投与した。最終投与 1 日後に気管支肺洗浄液中の総細胞数をカウントした。(B) Cl<sub>2</sub>MBP 投与によるマクロファージ除去後の papain 気道炎症を対照群 (control)、抗生剤投与群 (Abx) で比較 (気管支肺洗浄液中の総細胞数、好酸球数、マクロファージ数)。

(C) 対照群 (control)、抗生剤投与群 (Abx) から肺胞マクロファージを分離し、Naive マウスに移入後、papain (150 μg/mL) を 3 日に 1 度、計 5 回投与した。最終投与 1 日後に気管支肺洗浄液中の総細胞数、好酸球数、マクロファージ数をカウントした。(D) Control 群、抗生剤投与群 (Abx) の肺胞マクロファージにおける M2 マーカー (*arg1*, *chi3l3*, *retla*) の発現。  
\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, N.S. : 有意差なし。

### 3. 経口抗生剤によるマクロファージの極性変化および気道炎症の増悪には腸内真菌の異常増殖が関与する。

抗生物質の投与は、腸管内真菌の異常増殖を引き起こすことが知られている。そこで、経口抗生剤投与マウスの糞便中の真菌数を算定した。その結果、経口抗生剤投与により、腸管内で真菌が異常増殖することが観察された (図 3A)。この経口抗生剤投与マウスに抗真菌剤である 5-FC を経口投与すると、真菌の増殖が抑制された (図 3A)。この真菌はシーケンスの結果、カンジダ (*Candida parapsilosis*) であることがわかった。前述のように経口抗生剤投与マウス由来の肺胞マクロファージでは対照マウス由来のそれと比較して M2 マーカーの発現上昇が見られたが、5-FC 投与により阻止された (図 3B)。さらに、経口抗生剤投与マウスにおける papain 誘導性の気道炎症増悪が 5-FC 投与によって抑制された (図 3C)。以上の結果から、経口抗生剤によるマクロファージの極性変化および気道炎症の増悪には腸内真菌の異常増殖が関与することが示唆された。

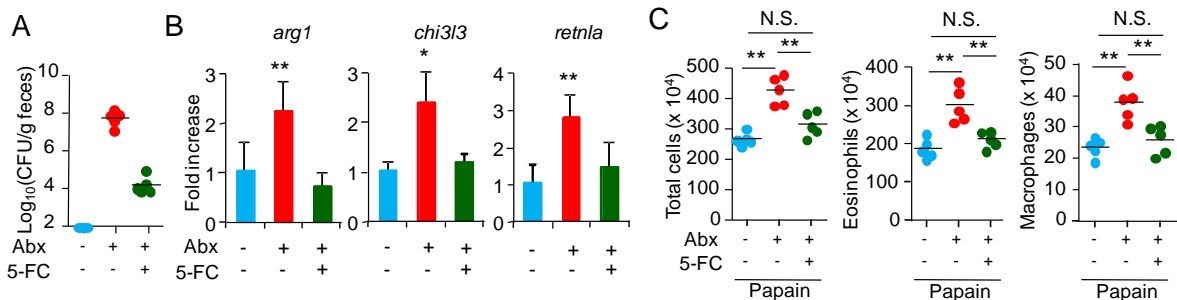


図 3. 経口抗生剤による気道炎症の増悪には腸管カンジダの異常増殖が関与する。

(A) 対照群 (control)、抗生剤投与群 (Abx)、抗生剤+抗真菌剤 5-FC 投与群 (Abx+5-FC) の糞便中真菌数。

(B) Control 群、抗生剤投与群 (Abx)、Abx+5-FC 投与群の肺胞マクロファージにおける M2 マーカー (*arg1, chi3l3, retmla*) の発現。 \* : p<0.05, \*\* : p<0.01。

(C) papain 投与後の control、Abx、Abx+5-FC 群の気管支肺洗浄液中の総細胞数、好中球数、マクロファージ数。

\*\* : p<0.01、N.S. : 有意差なし。

#### 4.腸内真菌がマクロファージの極性変化や気道炎症を増悪させるメカニズムの解明。

カンジダはβ-グルカン、キチン、マンナン、核酸など自然免疫受容体を活性化する成分を有する(4)。また、アルコールやプロスタグランジンなどの炎症性物質を産生することも知られている(5,6)。そこで、カンジダ細胞壁の主成分である、β-グルカン、マンナンの血中濃度を測定した。しかしながら、血中β-グルカン、マンナン濃度はいずれも検出限界値であった(データ不記載)。次に血中プロスタグランジン E<sub>2</sub> の濃度を対照群と経口抗生剤投与マウスと比較した。その結果、経口抗生剤投与マウスにおいて血中プロスタグランジン E<sub>2</sub> 濃度が対照群と比べ有意に上昇していた(図4)。さらに、5-FC 投与により経口抗生剤投与マウスにおける血中プロスタグランジン E<sub>2</sub> 濃度の上昇が抑制された(図4)。現在はプロスタグランジン E<sub>2</sub> が肺胞マクロファージの極性を変化させ、気道炎症を増悪させるのに必要かどうかを検討中である。

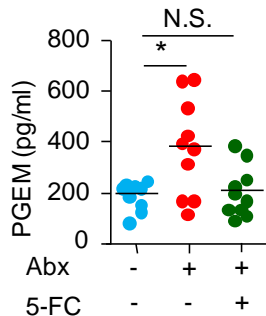


図4. 経口抗生剤投与後の腸管カンジダの異常増殖により、血中プロスタグランジン E<sub>2</sub> の濃度が上昇する。

対照群 (control)、抗生剤投与群(2週間投与)、抗生剤+抗真菌剤 5-FC 投与群(2週間投与)の血中プロスタグランジン E<sub>2</sub> 濃度 (図4)。

腸内カンジダの異常増殖は抗生剤投与によってだけでなく、糖分・炭水化物中心の食事接種などによっても引き起こされるため(7)、炎症性疾患患者が腸内カンジダの影響を潜在的に受けている可能性も十分に考えられた。

#### 参考文献

- (1) Herbst T, Sichelstiel A, Schär C, Yadava K, Bürki K, Cahenzli J, McCoy K, Marsland BJ, Harris NL. Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization. *Am J Respir Crit Care Med.* 184(2):198-205.2011
- (2) Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, Hu C, Wong FS, Szot GL, Bluestone JA, Gordon JI, Chervonsky AV. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature.* 455(7216):1109-13.2008
- (3) Iannitti T, Palmieri B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clin Nutr.* 29(6):701-25.2010
- (4) Romani, L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 11, 275-288.2011
- (5) Santelmann, H., and Howard, J.M. Yeast metabolic products, yeast antigens and yeasts as possible triggers for irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17, 21-26.2005
- (6) Noverr, M.C., Phare, S.M., Toews, G.B., Coffey, M.J., and Huffnagle, G.B. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. *Infect Immun.* 69, 2957-2963.2001
- (7) S. L. Vargas, C. C. Patrick, G. D. Ayers, W. T. Hughes. Modulating effect of dietary carbohydrate supplementation on *Candida albicans* colonization and invasion in a neutropenic mouse model. *Infect Immun* 61, 619-626. 1993

#### 発表論文

**Kim YG**, Udayanga KG, Totsuka N, Weinberg JB, Núñez G, Shibuya A. Gut dysbiosis promotes M2 macrophage polarization and allergic airway inflammation via fungi-induced PGE<sub>2</sub>. *Cell Host & Microbe.* 15;1:95-102 (2014)