

博士論文番号：1681004

腸管 IgA 抗体による腸内細菌制御機序の解明

岡井 晋作

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 応用免疫学講座

(新藏 礼子 教授)

平成 29 年 2 月 14 日提出

目次

序論	3
材料と方法	6
結果	15
考察	21
謝辞	24
参考文献	25
図表	30

序論

生体にとって腸管粘膜面は、常に多種多様な常在腸内細菌、ウイルス、化学物質、食物などの腸管内異物に晒された状態になっている。常在腸内細菌は、腸管内で腸内細菌叢を形成している。この腸内細菌叢は、腸上皮細胞などから粘膜面を介して、生体に対して様々な機能を果たしていることが明らかになってきており、常在腸内細菌が存在しないと腸管免疫系が正常に発達しないことも明らかになってきている [1-3]。腸管粘膜組織表面は、常在腸内細菌、病原性微生物、アレルゲンなどの抗原の生体内への侵入経路の1つである。これらの抗原に対する認識と応答を腸管免疫系が担っている。

健康な状態では通常、常在腸内細菌と宿主は良好な共生関係を築いている。しかし、共生関係が崩れると、腸管免疫系が過剰に刺激されることにより炎症性腸疾患、大腸がん、アレルギー、喘息、肥満等といった多くの疾患が誘発される [4]。つまり、腸管免疫系は病原体などを排除するだけでなく、免疫系全体の恒常性の維持に重要な役割を担っている [5-10]。腸管免疫系の中で主要な要素の一つが IgA 抗体である [11]。腸管由来の IgA 抗体はパイエル板、腸間膜リンパ節、孤立リンパ濾胞などの免疫反応が行われる組織内で T 細胞依存的に産生されるだけでなく、腸管粘膜固有層に散在する抗体産生細胞によっても産生される。腸管由来の IgA 抗体の1つの機能は、病原体を排除することである。腸管粘膜固有層から腸管腔に分泌された IgA 抗体は腸管腔内の病原菌や毒素と結合し中和する。あるいは、IgA 抗体が粘膜固有層内で病原菌と結合することで体外に排出する。腸管由来の IgA 抗体の機能で特徴的なことは、全身免疫系の抗体反応とは異なり、炎症反応を起こさずに病原菌に対する防御を行うことである [12-14]。もう1つの IgA 抗体の機能は、常在腸内細菌と宿主との共生関係の維持である。腸管由来の IgA 抗体は病原菌だけではなく常在腸内細菌も認識してそれらと結合し、常在腸内細菌が粘膜固有層内に過剰に侵入しないように防いでいる。IgA 抗体は、単に腸管腔内に分泌されるだけでなく、腸管粘膜上皮細胞上のムチン層で維持され、常在腸内細菌の腸管粘膜上皮細胞への接触、侵入を防いでいると考えられている [15, 16]。

腸管腔に分泌される IgA 抗体は、J 鎖により 2 つの 1 量体 IgA 抗体が 2 量体を形成した上に、分泌成分(Secretory Component : SC)が結合することで形成されている。まず粘膜固有層内の IgA 産生細胞が、IgA 抗体の 2 量体を産生し分泌する。産生された 2 量体 IgA 抗体は、腸上皮細胞の基底膜側表面にあ

る polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) と結合する。続いてエンドサイトーシスによって、腸上皮細胞内に取り込まれ、頂端側細胞表面に運ばれる。pIgR の細胞膜外領域が SC としてプロテアーゼによって切り出される。この時 SC が IgA 抗体と結合した形で分泌される。これを分泌型 IgA 抗体と呼ぶ。

これまで、腸管 IgA 抗体は 2 種類あるといわれている。1 つは、IgA 抗体遺伝子に突然変異が起きておらず多種類の常在腸内細菌に対して弱い結合力を示す IgA 抗体、もう 1 つは突然変異が起き特定の抗原に対して強い結合力を示す IgA 抗体である [17]。しかし、腸管 IgA 抗体が常在腸内細菌の何を認識しているのか、また細菌に結合することでどのような作用を及ぼすかについて、詳細なメカニズムは解明されていなかった。

最近、腸管 IgA 抗体が結合する常在腸内細菌は腸炎を誘発する細菌であるという報告があった [18]。この報告では、腸内細菌叢の異常が認められたマウスやヒトの腸内細菌を IgA 抗体結合菌と非結合菌に分離し、それぞれの細菌群の構成が明らかに異なることを 16S rRNA 遺伝子の網羅的解析により示した。次に、これら腸管 IgA 抗体結合細菌と腸管 IgA 抗体非結合細菌を無菌マウスにそれぞれ移入を行った。移入を行ったマウスに腸炎を誘導すると、腸管 IgA 抗体結合細菌を移入したマウスが腸管 IgA 抗体非結合細菌移入マウスに比べて重篤な腸炎を発症した。この結果より、腸管 IgA 抗体結合細菌は腸炎を誘発する細菌であるとの報告では結論付けている。この報告 [18] の結果では、腸管 IgA 抗体が結合する常在腸内細菌が宿主にとって好ましくない細菌であることは明らかになったが、腸管 IgA 抗体が常在腸内細菌に対して結合することで常在腸内細菌に対してどのような作用があるのか、また個別の腸管 IgA 抗体が常在腸内細菌の何を認識して結合しているのか、明らかではなかった。

様々な抗原から生体を守るために、B 細胞の抗体遺伝子では体細胞突然変異とクラススイッチが起きている。体細胞突然変異は、抗体遺伝子の可変領域部分に変異を入れることによって抗体遺伝子を多様化して、抗原に対して高親和性を示す抗体を産生する機構である。クラススイッチは、抗体の可変領域は変化させず定常領域の構造を変化させ、IgM 抗体から IgG、IgA、IgE 抗体に変化させる機構で、抗体のエフェクター機能を変化させる。これら 2 つの機構が組み合わさることにより、多様な抗原結合部位を有する多種類の抗体が産生されている。抗体の体細胞突然変異とクラススイッチには、ともに抗体遺伝子編集酵素 Activation-induced cytidine deaminase (AID) タンパク質が

必要である [19]。AID タンパク質の N 末端側が体細胞突然変異に関与しており、C 末端側がクラススイッチに関与していることが知られている [20, 21]。

AID^{-/-}マウスでは腸管内に IgA 抗体が全く存在しないために常在腸内細菌を制御できず、異常増殖した常在腸内細菌の刺激でリンパ増殖性疾患が起きている [22]。AID の変異体(G23S)をノックインした AID^{G23S} マウスでは、抗体のクラススイッチは正常に起きるが抗体の体細胞突然変異が特異的に障害されている [23]。AID^{G23S} マウスの腸管内では IgA 抗体は十分量産生されるが、細菌に対して強く結合する IgA 抗体が腸管内で産生されないために、常在腸内細菌の異常増殖が起こりリンパ増殖性疾患を発症する [23]。AID^{-/-}マウスのように腸管内に IgA 抗体が全く存在しなければ常在腸内細菌を制御することはできないが、AID^{G23S} マウスのように腸管内に IgA 抗体が存在しても細菌に対して強く結合する IgA 抗体が存在しなければ常在腸内細菌を制御することはできない、と考えられる。このような腸内細菌叢の乱れで起きている病態の治療には、野生型マウス由来の多種類の常在腸内細菌に対して強い結合力を持つ IgA 抗体を経口投与で腸管内に補充することで、腸内細菌叢の乱れを改善できるのではないかと考えた。免疫を行っていない野生型マウスであっても、常に常在腸内細菌によりマウスの腸管 B 細胞は刺激を受けており、常在腸内細菌に対する腸管 IgA 抗体が野生型マウス腸管に存在していると考えた。

本研究では、多種類の腸内細菌に対して反応性を示しかつ強い結合力を示す IgA 抗体を野生型マウスから分離した。腸内細菌叢の乱れの結果起きる刺激でリンパ増殖性疾患が起きているマウス(AID^{G23S}、AID^{-/-})や Dextran sulfate sodium (DSS)誘導性腸炎モデルマウス、および T 細胞移入腸炎モデルマウスに分離した IgA 抗体の経口投与を行い症状が改善されるか、また腸内細菌叢がどのように変化しているかを検討した。また腸管 IgA 抗体が常在腸内細菌に結合することで細菌に対してどのような作用があるのかを明らかにした [24]。

材料と方法

1. マウス

長浜バイオ大学、ヤクルト中央研究所、理化学研究所および奈良先端科学技術大学院大学の動物実験計画書に従って行った。使用したマウスは、記載がない場合はすべて BALB/c バックグラウンドマウスを使用した。週齢は 8-21 週齢のマウスを使用した。

2. 小腸粘膜固有層細胞の分離

野生型 C57BL/6 マウスを安楽死させた後、開腹し小腸全長を摘出した。摘出した小腸から結合組織とパイエル板を取り除いた後、小腸を縦切開し、小腸内容物を PBS で洗浄した。次に、1 mM EDTA を含む PBS 50 ml が満たされている 100 ml ビーカーに洗浄した小腸を 1 cm 程度の長さに切断して加えた。37°C で 20 分間振盪した後、ストレイナーに小腸断片を集め、EDTA を含む PBS を破棄した。50 ml チューブに小腸断片を加え 20 ml の PBS を加え 10 秒間激しく振盪した後、再びストレイナーに小腸断片を集め、PBS を破棄した。この作業を 2 回繰り返して、小腸組織から小腸上皮細胞のみを取り除いた。次に、100 ml ビーカーに 37°C に温めた消化酵素液(500 ml RPMI 1640、10 ml FCS(最終濃度 2%)、200 μ l の 2-メルカプトエタノール(最終濃度 55 μ M)、0.5 g のコラゲナーゼ、5 ml のジスパーゼ(最終濃度 1 U/ml)にて調整)を 50 ml 加え、小腸組織をさらに細かく切り加え、37°C で 60 分間振盪した。その後 100 ml ビーカーを 10 分間静置し、小腸組織を沈めた後、上清を新しい 50 ml チューブに移した。この消化酵素液を用いた消化工程を 2 回繰り返した。消化液を 1,500 rpm、4°C、5 分間遠心し、上清を破棄した。沈殿物として得られた粘膜固有層細胞を 1 ml の 2% FCS を含む RPMI 1640 に懸濁した。懸濁液をフィルターに通し組織片を取り除き、氷上に保存した。2 回目の消化工程の反応を行った上清についても同様の作業を行い 1 回目の細胞懸濁液と 2 回目の細胞懸濁液を合わせ、小腸粘膜固有層細胞とした。

3. IgA 抗体産生ハイブリドーマの作製とクローニング

小腸粘膜固有細胞とマウスミエローマ細胞である NS1 細胞を融合してハイブリドーマの作製を行った。細胞融合は ClonaCell[®] – HY Hybridoma Cloning Kit (STEMCELL Technologies) に従い、kit の試薬と手順に従って行った。得られたハイブリドーマを ClonaCell[®] – HY Hybridoma Cloning Kit (STEMCELL Technologies) に従ってメチルセルロース含有培地で増殖させ、クローニングを行った。その後、クローニングしたハイブリドーマから上清を分離し、上清

中に含まれる抗体を ELISA 法で測定し、上清中に含まれる抗体が IgA 抗体であること、また上清中に含まれる抗体の抗体価を測定し、IgA 抗体産生ハイブリドーマとして分離した。ELISA で使用した抗体はプレートへのコーティングに Anti-goat-mouse IgA (Southern Biotech) を 2 $\mu\text{g/ml}$ 、検出用に Alkaline Phosphatase (ALP)-conjugated anti-goat mouse IgA (Southern Biotech) を 0.5 $\mu\text{g/ml}$ で使用した。コントロール IgA 抗体として Mouse IgAk (Immunology Consultants Laboratory) を使用した。測定は、TriStar² LB942 (BERTHOLD TECHNOLOGIES) を使用し、OD_{405 nm} を測定した。

各クローンの細胞から Isogen II (Nippon Gene Co., Ltd.) を使用し RNA を抽出した。抽出した RNA を鋳型にして cDNA を合成し、抗体の V_H 領域に対する 7 種類のプライマー(MH1-7)と C_α領域特異的プライマー(IgA R)を用いて RT-PCR を行った。プライマーの塩基配列は表 1 に示した。増幅された VDJ 領域 PCR 産物を直接シーケンスし、各クローンの VDJ usage と突然変異の数を解析した。

プライマー名	塩基配列 (5' -3')
MH1	SARGTNMAGCTGSAGTC
MH2	SARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG
MH3	CAGGTTACTCTGAAAGWTSTG
MH4	GAGGTCCARCTGCAACARTC
MH5	CAGGTCCAACACTVCAGCARCC
MH6	GAGGTGAASSTGGTGGAAATC
MH7	GATGTGAACTTGGAAGTGTC
IgA R	GATGGTGGGATTTCTCGCAGAC

表 1. 各プライマーの塩基配列

表中の塩基配列において、S は G または C、R は A または G、N は A、C、G または T、W は A または T、V は G、C または A を表す。

4. ハイブリドーマ由来の IgA 抗体の調製と精製

ハイブリドーマ細胞を高濃度細胞培養装置内で GIT 培地(大日本製薬)を用いて培養した。ハイブリドーマ培養液を 0.22 μm フィルターでろ過を行い、硫酸沈殿により抗体を濃縮した。硫酸沈殿により得られた溶液を PD-10 カラム(GE Healthcare)に通してバッファーを PBS に置換した。続いて方法 3. と同様の ELISA 法により IgA 抗体価を測定した。上記のように得られた硫酸沈殿抗体(W27)を SHMT-P1-BSA ペプチド(RQEEHIELIASENYTSRVMQC-BSA)

(SIGMA-ALDRICH)を結合した HiTrap カラム(GE Healthcare)を使用しアフィニティ精製を行った。

5. マウス常在腸内細菌の分離

SPF 環境下で飼育中の野生型マウスの糞便を PBS に懸濁後、Blood agar (Fluka Analytical)プレートに塗り広げ、48-72 時間 37°Cで好気および嫌気培養を行った。プレート上のコロニーから直接 16S rRNA 遺伝子の PCR を行った。使用したプライマーは表 2 に示した。PCR 産物のシーケンス解析から各コロニーの細菌種を同定した。この方法により、6 種類のマウス常在腸内細菌をクローニングした。さらに ATCC から 8 種類の細菌を購入し、合計 14 種類の細菌を準備した。

プライマー名	塩基配列 (5' -3')
27F	GGAGRRTTTGATYHTGGYTCAG
1492 R	GGGBTACCTTGTTACGACTT

表 2. 各プライマーの塩基配列

表中の塩基配列において、R は A または G、Y は C または T、H は A、C または T、B は G、C または T を表す。

6. 各腸内細菌に対するハイブリドーマ IgA 抗体の特異性の解析

方法 5.で準備した、各腸内細菌を好気または嫌気培養を行い、遠心分離により集めた。各細菌の培養条件は表 3 に示した。0.05 M Na₂CO₃ バッファーに細菌を懸濁し、ELISA プレートにコーティングした。1% BSA 添加 PBS によるブロッキング後に、各ハイブリドーマ由来の IgA 抗体(1.4 µg/ml)を加え、各細菌に対する IgA 抗体の結合の有無を測定した。結合の有無は、方法 3.と同様の検出抗体を用いる ELISA 法により測定した。測定した OD_{405 nm} の値が 0.3 以上の場合を結合ありと判定した。

7. 各腸内細菌に対するハイブリドーマ IgA 抗体の結合力の解析

各腸内細菌を好気または嫌気培養を行い、遠心分離により集めた。各細菌の培養条件は表 3 に示した。0.05 M Na₂CO₃ バッファーに細菌を懸濁し、ELISA プレートにコーティングした。1% BSA 添加 PBS によるブロッキング後に、ハイブリドーマの中で抗体を比較的高産生する 4 種類の IgA 抗体(W27、W34、W43、W2)を選択し、抗体濃度に依存した細菌への結合力を ELISA 法で比較した。ELISA 法は方法 6.と検出同様の方法により測定した。

Bacterial species	Culture medium	Culture condition
<i>Escherichia coli</i>	LB broth	Aerobic
<i>Staphylococcus lentus</i>	LB broth	Aerobic
<i>Enterococcus faecalis</i>	LB broth	Aerobic
<i>Pseudomonas fulva</i>	LB broth	Aerobic
<i>Lactobacillus murinus</i>	LB broth	Aerobic
<i>Enterohabdus mucosicola</i>	LB broth	Anaerobic
<i>Lactobacillus casei</i>	MRS broth	Aerobic
<i>Blautia coccoides</i>	GAM broth+1% Glucose	Anaerobic
<i>Megamonas hypermegale</i>	GAM broth+1% Glucose	Anaerobic
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	GAM broth+1% Glucose	Anaerobic
<i>Prevotella melaninogenica</i>	GAM broth+1% Glucose	Anaerobic
<i>Bacteroides vulgatus</i>	GAM broth+1% Glucose	Anaerobic
<i>Megamonas funiformis</i>	GAM broth+1% Glucose	Anaerobic
<i>Blautia producta</i>	GAM broth+1% Glucose	Anaerobic

表 3. 各細菌の培養条件

嫌気条件は 80% N₂、10% H₂、10% CO₂ の条件で培養。

8. ハイブリドーマ IgA 抗体が認識する抗原の同定

Escherichia coli K-12 株 (DH5 α)、*Escherichia coli*、*Pseudomonas fulva*、*Staphylococcus lentus*、*Lactobacillus casei*、*Blautia coccoides*、*Bifidobacterium bifidum* をそれぞれ至適条件で培養した。各細菌の培養条件は表 3 に示した。NS-1、293T 細胞をそれぞれ RPMI1640 および DMEM 培地で培養した。DH5 α 、*Escherichia coli*、*Pseudomonas fulva* の培養液を遠心分離し、1% NP-40 と proteinase-inhibitor cocktail (Nacalai) を含んだ PBS で懸濁した。*Staphylococcus lentus*、*Lactobacillus casei*、*Blautia coccoides*、*Bifidobacterium bifidum* の培養液は、遠心分離後 lysozme (0.2 mg/ml) (Wako)、1% NP-40 と proteinase-inhibitor cocktail (Nacalai) を含んだ PBS で懸濁した後、超音波破碎を行った。各細菌溶解液を 30 分氷上で反応した。その後、これらの細菌溶解液に SDS-buffer (SDS 終濃度 1%、2-ME 終濃度 300 mM) を加え熱変性を行った。NS-1、293T 細胞は、遠心分離し PBS で洗浄し SDS-buffer を加え熱変性を行った。SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜にタンパク質を転写した。ニトロセルロース膜を

blocking buffer (LI-COR)を用いてブロッキングを行った。ブロッキング後、ハイブリドーマ由来の IgA 抗体(2 $\mu\text{g/ml}$)を反応させた。結合した IgA 抗体を検出するために、goat anti-mouse IgA (Southern Biotech)とメンブレンを反応させた。その後 Odyssey scanner (LI-COR)で検出するためにメンブレンを IR800-conjugated anti-goat IgG (LI-COR)と反応させた。反応後 Odyssey scanner でシグナルを検出した。各ウェルにロードしたサンプルのタンパク質量の測定のために SDS-PAGE 泳動後のゲルを Coomassie brilliant blue (Nacalai)を使用し染色した。

DH5 α 溶解液に SDS-buffer を加え熱変性を行い、その後 DH5 α 溶解液の SDS の濃度を 0.2%、2-ME の濃度を 60 mM に調節した。次に DH5 α 溶解液に洗浄した ProteinG-Sepharose4 Fast Flow(GE Healthcare)を 100 μl 加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分転倒混和を行い、ProteinG-Sepharose に対する非特異的結合成分を遠心分離により除去した。非特異的結合成分を除去した DH5 α 溶解液に W27 IgA 抗体 5 μg 加え 30 分氷上で反応した。その後、goat anti-mouse IgA (Southern Biotech) 5 μg 加え 30 分氷上で反応後、ProteinG-Sepharose4 Fast Flow 30 μl 加え 4 $^{\circ}\text{C}$ で 15 時間転倒混和を行った。1% NP-40 を含んだ PBS で洗浄を 4 回を行い、ProteinG-Sepharose に SDS-Buffer を加え熱変性を行い免疫沈降サンプルを得た。得られた免疫沈降サンプルをアセトン沈殿し、2 次元電気泳動用の溶液に溶解した。1 次元目のゲルは Agar Gel (pH 3-8 ; ATTO)を使用した。2 次元目は SDS-PAGE を行った。電気泳動はサンプルを 2 組作成し行った。1 組はニトロセルロース膜にタンパク質を転写し、転写タンパク質を MemCodeTM Reversible Protein Stain Kit (Thermo Scientific)を用いて染色した。染色したニトロセルロース膜を除染し、W27 IgA 抗体(2 $\mu\text{g/ml}$)を反応させた。結合した IgA 抗体を検出するために、goat anti-mouse IgA とメンブレンを反応させた。その後 Odyssey scanner で検出するためにメンブレンを IR800-conjugated anti-goat IgG と反応させ、Odyssey scanner でシグナルを検出した。もう 1 組は、銀染色を行った。3 種類の結果を比較して W27 IgA 抗体が特異的に認識している標的タンパク質を特定しゲルから切り出した。切り出したゲルはトリプシン処理を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 15 時間行い、LCMS-IT-TOF (Shimadzu)を使用し解析を行った。アミノ酸配列の同定は Mascot search で行った。W27 IgA 抗体が認識する抗原の同定は、すべて共同研究者の臼井文人(D2)が行った。

9. 細菌増殖抑制試験

DH5 α と *Lactobacillus casei* をそれぞれ Brain heart infusion broth (Fluka Analytical)、Difco Lactobacilli MRS broth (BD)を使用し一晩 37 $^{\circ}\text{C}$ で培養した。培養液を遠心分離し、細菌を集菌後、PBS で 2 回洗浄を行った。PBS で細菌

を懸濁後、300-500 cells/5 μ l になるように PBS で希釈した。エッペンチューブに細菌希釈液 5 μ l 加え、さらに PBS、精製した W27 抗体または Mouse IgA κ 抗体 (Immunology Consultants Laboratory) を 25 μ l に加え、37°C 3 時間静置培養した。3 時間後、DH5 α には Brain heart infusion broth、*Lactobacillus casei* には Difco Lactobacilli MRS broth を 15 μ l 加え、DH5 α は 37°C 7 時間静置培養、*Lactobacillus casei* は 37°C 45 時間静置培養を行った。

SHMT 野生型大腸菌株 ME9062 と SHMT 欠損大腸菌株 JW2535[25] の 2 種類の細菌を LB broth を使用し一晩 37°C で培養した。培養液を遠心分離し細菌を集菌後、PBS で 2 回洗浄を行った。1% BSA および 20% normal rat serum (Wako) を含んだ PBS で細菌を懸濁した。8,000-12,000 cells/5 μ l になるように、1% BSA および 20% normal rat serum を含んだ PBS で希釈した。細菌液が入ったエッペンチューブに、PBS、精製した W27 抗体または Mouse IgA κ を 25 μ l 加え、37°C 3 時間静置培養した。3 時間後に LB broth を 15 μ l 加え、さらに 37°C 3 時間静置培養した。

培養が終わった細菌サンプル液に DNA lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS) 溶液 500 μ l を加え、0.1 mm ガラスビーズ (TOMY) が入った Bead Smash チューブ (TOMY) を使用して 3,500 rpm、60 秒間 Bead Smash で破碎した。Bead Smash 後、Proteinase K (Nacalai) を 5 μ l (終濃度 0.2 mg/ml) 加え一晩、55°C で静置した。フェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿を行った後、DNA は TE buffer に溶解した。抽出した DNA を使用し quantitative PCR を行った。使用した試薬は KAPA SYBR FAST qPCR Kit Optimized for LightCycler 480 (KAPABIOSYSTEMS) を使用した。DH5 α と *Lactobacillus casei* それぞれの 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーを使用した。プライマーの塩基配列は表 4 に示した。

プライマー名	塩基配列 (5' -3')
DH5a F	ACCTTCGGGCCTCTTGCC
DH5a R	TTCCTCCCCGCTGAAAGTAC
L.casei F	TGGCGCAAGCTATCGCTTTT
L.casei R	CGCCGACAACAGTTACTCT

表 4. 各プライマーの塩基配列

10. IgA 抗体経口投与によるマウス腸管での IgA 抗体の局在解析

AID^{-/-}マウス(IgA 欠損)に W27 IgA 抗体 1 mg を胃ゾンデで、経口投与を行った。4 時間後、マウスを解剖し小腸上部、中部、下部、大腸組織の内容物を

洗い、各腸組織を Optimum cutting temperature compound (Sakura) を使用し -80°C 凍結保存した。

11. W27 IgA 抗体結合腸内細菌叢解析

AID^{-/-}マウス 4 匹の小腸、大腸および盲腸の腸内容物をすべて回収し 50 ml の PBS で懸濁した。腸内細菌溶液の作成は Palm, N. W. らの論文[17]を参考にし、若干の変更加えた。細菌溶液を洗浄後、1% BSA および 20% normal rat serum を含んだ PBS を 100 μl を加え氷上で 20 分間静置した。その後、W27 IgA 抗体 100 μl を加え (終濃度 250 μg/ml) 氷上で 30 分間反応させた。その後 3 回洗浄を行った。2 次抗体として PE-conjugated anti-mouse IgA (eBioscience, clone mA-6E1) を加え氷上で 30 分間反応させた。洗浄後、Magnetic activated cell sorting (MACS) (Miltenyi Biotec) を使用し、W27 IgA 抗体が結合している細菌を濃縮した。使用したビーズは、anti-PE MACS beads (Miltenyi Biotec) を使用し、分離操作は MACS のキットの方法に従い行った。MACS 後、フローサイトメーター (FACS Aria, BD Bioscience) を使用し W27 IgA 抗体結合菌と非結合菌に分離した。(理化学研究所との共同研究)

W27 IgA 抗体結合菌と非結合菌の 16S rRNA 遺伝子解析は共同研究先の理化学研究所が行なった。細菌 DNA の抽出と精製は Morita, H. らの論文[26]に従い行った。16S rRNA 遺伝子の PCR プライマーは Kozich, J. J. らの論文[27]に従い行った。MiSeq (Illumina) を使用しシーケンスを行い、シーケンスデータの解析は、Mothur が提供している MiSeq SOP (http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP) に従い解析した。

12. AID^{G23S} マウスと AID^{-/-}マウスへの IgA 抗体経口投与と病態観察

ハイブリドーマ由来の IgA 抗体 (W27 および W2) を飲料水に 25 μg/ml の濃度になるように加え、AID^{G23S} マウスに 4 週間自由飲水させた。抗体溶液は週 1 回交換した。AID^{-/-}マウスには、精製した W27 抗体 30 μg を胃ゾンデにより週 2 回、4 週間経口投与を行った。いずれも 4 週間後に小腸パイエル板を摘出し、フローサイトメーター (BD Accuri C6, BD Bioscience) により胚中心 B 細胞数を計測した。抗体は、PE-Cy7-labelled anti-mouse/human CD45R (B220) (eBioscience)、Biotinylated peanut agglutinin (VECTOR laboratories)、Streptavidin APC (eBioscience)、Propidium iodide を使用した。

13. AID^{G23S} マウス腸内細菌 16S rRNA 遺伝子解析

方法 12. と同様に処置した AID^{G23S} マウスの糞便を使用した。腸内細菌由来 DNA は方法 9. と同様の方法で抽出した。16S rRNA 遺伝子の PCR に使用した

プライマーは表 5 に示した配列にタグ配列を付加して使用した。454 GS JUNIOR(Roche) を使用しシーケンスを行った。シーケンスデータの解析は最初に high-quality 454 reads を得るために、曖昧な塩基配列、350 以下または 650 以上の塩基長の配列、および 454 GS JUNIOR によって計算された Phred-like quality score の平均が 25 未満のものを含んでいる reads をすべて取り除いた。次に、forward and reverse プライマー配列の 3 つのミスマッチを許容する TagCleaner (version 0.12) を使用して除去した[28]。high-quality 454 reads のシーケンスクラスタリングは、identity が 97%以上および query と reference coverage が 80%以上の UCLUST (version 6.0.307) を使用して行った[29]。キメラ OTUs は the reference gold database (<http://drive5.com/uchime/gold.fa>) に対する UCHIME (version 6.0.307)の reference mode search と UCHIME de novo mode search の両方の方法で、キメラ OTUs を検出し除去した。high-quality 454 reads の系統アサインメントを RDP MultiClassifier (version 1.1) を用いて行った[30]。AID^{G23S} マウス腸内細菌 16S rRNA 遺伝子解析は共同研究先である国立遺伝学研究所黒川顕教授のグループが行った結果を記載した。

プライマー名	塩基配列 (5' -3')
338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
806 R	GGACTACCAGGGTATCTAAT

表 5. 各プライマーの塩基配列

14. マウス大腸組織免疫染色

方法 10 に記載した Optimum cutting temperature compound (Sakura)を使用し -80°Cに凍結保存されているマウス組織より、6 μm 厚の切片を作成した。組織切片を -20°Cアセトンで 5 分間固定し、ヘマトキシリンエオシン染色とアルシアンブルー染色を行った。組織免疫染色では、Rabbit anti-mouse IgA (Rockland Antibodies)、Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies)および DAPI を使用した。

15. マウス大腸粘膜固有層の抑制性 T 細胞の解析

マウスの大腸粘膜固有層細胞は、方法 2.小腸粘膜固有層細胞の分離と同様の方法で大腸より分離した。分離した大腸粘膜固有層細胞液からリンパ球を分離するために、大腸粘膜固有層細胞を 40% Percoll (GE Healthcare)溶液で懸濁し、80% Percoll 溶液にパスツールピペットで重層した。1,200 G、25°C、20 分間遠心後、2 種の Percoll 溶液の中間層をパスツールピペットで回収した。

PBS を加え、800 G、25°C、10 分間遠心分離し細胞を洗浄した。洗浄後 PBS 1 ml で懸濁し大腸のリンパ球とした。細胞内染色用の調整方法は、Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience)に従った。使用した抗体は、Fixable Viability Dye eFluor[®] 660 (eBioscience)、FITC-labelled anti mouse CD4 (eBioscience)、PE-Cy7-labelled anti mouse Foxp3 (eBioscience)を使用した。

16. Dextran sodium sulfate (DSS)腸炎モデルマウスに対する W27 IgA 抗体の効果解析

野生型マウスに 3.5% DSS (MP Biomedicals, $M_w = 36,000-50,000$)を自由飲水させた後、水または W27 を飲料水に 25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように加えた水を、自由飲水させた。このサイクルを 4 回行った。マウスの体重を経時的に測定した。マウス DSS 腸炎に対する W27 IgA 抗体の効果解析は、共同研究先であるヤクルト中央研究所が行った結果を記載した。

17. T 細胞移入腸炎モデルマウスに対する W27 IgA 抗体の効果解析

Rag1^{-/-}マウス(C57BL6)に野生型マウス(C57BL6)の CD4⁺ CD45RB^{high} T 細胞を移入した。移入後マウスの体重を経時的に測定した。移入後 3 週目に糞便を回収し腸内細菌叢を解析した。マウス T 細胞移入腸炎に対する W27 IgA 抗体の効果解析は、共同研究先である理化学研究所が行った結果を記載した。

結果

1. ハイブリドーマ IgA 抗体の重鎖 VDJ 領域の塩基配列の決定

小腸粘膜固有層の IgA 産生細胞から得られたハイブリドーマは、野生型マウス 3 匹から 37 クローンを得た。各クローンが独立クローンであることの確認のため、各クロンの抗体重鎖 VDJ 領域遺伝子の塩基配列を決定し、各ハイブリドーマの VDJ がどのようなセグメントから構成されているのかを解析し、独立性を検討した。その結果、野生型マウス由来のハイブリドーマとして 20 種類の独立クローンを獲得した(表 6) [24]。

2. ハイブリドーマ IgA 抗体の特異性と結合力の検討

各ハイブリドーマ IgA 抗体が腸内細菌に対して反応するかを ELISA 法で検討した(図 1) [24]。細菌への特異性については、野生型マウス由来ハイブリドーマ IgA 抗体のほとんどが複数の細菌に対して反応性を示した。これは従来から知られているように、腸管 IgA 抗体は多種類の細菌に対して反応する、という知見と一致する結果である[17]。細菌に対する反応性を検討した際には抗体濃度が 1.4 $\mu\text{g/ml}$ と低い濃度で行ったため、細菌に対する結合力を比較するために、IgA クローンの中で抗体を比較的高産生する 4 種類のハイブリドーマ IgA 抗体(W27、W34、W43、W2)を選択し、細菌に対する相対的な結合力を比較した(図 2) [24]。図 2 の結果から明らかなように、W27 IgA 抗体は多くの腸内細菌に対して最も強い結合力を示したが、興味深いことに *Lactobacillus casei* や *Bifidobacterium bifidum* のようなプロバイオティクスとして用いられているいわゆる善玉菌と呼ばれるような細菌に対しては弱く結合するかほとんど結合しないことが分かった。つまり W27 IgA 抗体は上記のような善玉菌には結合しないように細菌を選択的に識別する抗体であることが確認できた。

3. ハイブリドーマ IgA 抗体が認識する抗原解析

結果 2. で細菌との相対的な結合力が高く選択的に細菌を認識している W27 IgA 抗体が細菌のどのような分子を認識し、細菌を識別しているのかを検討した。DH5 α 、*Escherichia coli*、*Pseudomonas fulva*、*Staphylococcus lentus*、*Lactobacillus casei*、*Blautia coccoides*、*Bifidobacterium bifidum*、NS-1、293T 細胞に対する W27 IgA 抗体の反応を検討した。DH5 α 、*Escherichia coli*、*Pseudomonas fulva* に対して約 50 kDa の共通するバンドを認識した(図 3A) [24]。しかし、*Staphylococcus lentus*、*Lactobacillus casei*、*Blautia coccoides*、*Bifidobacterium bifidum*、NS-1、293T 細胞に対してはバンドを確認することが

できなかつた(図 3A) [24]。各サンプルのタンパク質が同等量ウェルにロードされているかを CBB 染色で確認した(図 3A) [24]。

W27 IgA 抗体は DH5 α 、*Escherichia coli*、*Pseudomonas fulva* に対して共通すると考えられる約 50 kDa のタンパク質を認識したため、DH5 α を使用してこのタンパク質を質量分析解析で同定したところ、Serine hydroxymethyltransferase(SHMT)であった。

次に W27 IgA 抗体が認識する DH5 α SHMT のエピトープを解析した。共同研究者の臼井文人による SHMT の N 末欠損変異体の結果から N 末を欠損すると W27 IgA 抗体が認識しないため、N 末が重要であると仮定した。細菌、ヒト、マウスの SHMT タンパク質の N 末のアミノ酸配列を比較したところすべての種において非常に保存された領域があることが確認された(図 3B) [24]。このアミノ酸配列の中に可変部となる 4 アミノ酸(大腸菌の SHMT では EEHI 配列)が存在した。W27 IgA 抗体が認識しない *Lactobacillus casei* では SHMT のエピトープ部分は EHNI であった。そこで *Lactobacillus casei* の SHMT の EHNI 配列を大腸菌の EEHI 配列に変更すると W27 IgA 抗体は認識した(図 3C) [24]。反対に大腸菌の SHMT の EEHI 配列を *Lactobacillus casei* の SHMT の EHNI 配列に変更することで W27 IgA 抗体は認識しなくなった(図 3C) [24]。W27 IgA 抗体のエピトープとして EEHI の 4 アミノ酸が重要であると考えられる。N 末部分に他にもエピトープとして重要なアミノ酸配列が存在するのか確認するために、図 3D [24]に示すように N 末側にペプチドを 3 種類作製した。W27 IgA 抗体がこれらのペプチドを認識するかを確認したところ、EEHI を含んでいる SHMT P1 ペプチドのみを認識した(図 3E) [24]。このことより W27 IgA 抗体は SHMT の EEHI 配列を特異的に認識することが重要であることが確認できた。W27 IgA 抗体が認識する抗原の同定は、すべて共同研究者の臼井文人(D2)が行った。

4. W27 IgA 抗体による細菌増殖抑制

W27 IgA 抗体が SHMT の EEHI 配列を持つ細菌に対して結合することは確認できたが、細菌に対して結合した後、細菌に対してどのような作用を及ぼすかは明らかになっていない。SHMT は核酸とアミノ酸代謝における重要な酵素であり、セリンおよびテトラヒドロ葉酸をグリシンおよび 5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸に可逆的に変換する働きがある。SHMT 欠損大腸菌株では細菌の増殖が遅いという報告がある[25]。従って、細菌に W27 IgA 抗体が結合することで細菌の増殖を抑えるのではないかと考えた。そこで DH5 α と *Lactobacillus casei* をそれぞれ W27 抗体と共培養して細菌数を計測したところ、W27 IgA 抗体が DH5 α の増殖を抗体濃度依存的に阻害することが確認で

きた(図 4A) [24]。一方、W27 IgA 抗体は *Lactobacillus casei* の増殖は阻害しなかった(図 4A) [24]。また、フローサイトメーターを用いて W27 IgA 抗体が細菌に結合しているのか確認したところ、DH5 α には結合しているが *Lactobacillus casei* には結合していないことも確認できた(図 4B) [24]。mIgA 抗体は細菌に対して全く結合しないアイソタイプコントロール抗体であり、増殖抑制効果も観察されなかった(図 4A、B) [24]。以上の結果から W27 IgA 抗体は細菌に結合することでその細菌の増殖を抑制する効果があると考えられた。

次に、W27 IgA 抗体が特異的に SHMT に結合することで細菌の増殖抑制効果を示すかどうかを確認するために、SHMT 野生型大腸菌株 ME9062 と SHMT 欠損大腸菌株 JW2535 を用いて同様に W27 IgA 抗体と共培養を行った。SHMT 野生型大腸菌株 ME9062 の増殖は阻害されたが、SHMT 欠損大腸菌株 JW2535 の増殖は阻害されないことが確認できた(図 5A) [24]。しかし SHMT 野生型大腸菌株 ME9062 と SHMT 欠損大腸菌株 JW2535 両方の細菌に対して W27 IgA 抗体が結合していた(図 5B) [24]。以上の結果を総合すると、W27 IgA 抗体の細菌に対する増殖抑制効果は、単純に細菌に対して結合するだけではなく、抗原である細菌の SHMT 分子に結合することが重要であると考えられる。

5. マウスへの IgA 抗体経口投与による腸管内での抗体の局在解析

抗体をマウスに経口投与する際に、マウスの消化酵素などで抗体が分解されないか、また腸内細菌が生育する腸へ到達するかどうかを確認した。W27 IgA 抗体 1 mg を胃ゾンデを使用して経口投与を行い、4 時間後の AID^{-/-}マウスの組織切片を使用した。IgA 抗体に対する蛍光免疫法による解析で、IgA 抗体が腸管全長に分布することを確認した(図 6) [24]。経口投与された IgA 抗体はマウスの腸管全長に届いていると考えられる。

6. W27 IgA 抗体結合腸内細菌解析

マウスに経口投与を行う前に、W27 IgA 抗体がマウスのどのような腸内細菌に対して結合するかを検討するため、W27 IgA 抗体の結合細菌と非結合細菌をセルソーターで分離し解析を行った(図 7) [24]。W27 IgA 抗体結合菌として *Lactobacillaceae* と *Prevotellaceae* などが濃縮された。この 2 種類の細菌種は、腸炎を引き起こす細菌と考えられている[17,31]。また、W27 IgA 抗体非結合菌として *Ruminococcaceae* と *Lachnospiraceae* などが濃縮された。この 2 種類の細菌種は抑制性 T 細胞を誘導することから宿主に対して利益をもたらす細菌と考えられている[32]。つまり W27 IgA 抗体は、腸炎を引き起こす細菌に対してよく結合していた。反対に宿主に対して利益をもたらす細菌に対

してはあまり結合しなかった。このことから W27 IgA 抗体は、宿主にとって良くない細菌に対して選択的に結合することで腸内細菌の制御を行っているのではないかと考えられる。図 2 の結果も合わせて考えると、W27 IgA 抗体をマウスに経口投与することでマウスの腸内細菌叢を改善できるのではないかと予見された。

7. W27 IgA 抗体経口投与前後のマウスの腸内細菌叢解析

W27 IgA 抗体をマウスに経口投与することで腸内細菌叢に変化が起きるかを検討した。腸内細菌叢が乱れている AID^{G23S} マウス[23]に W27 IgA 抗体を 4 週間継続して経口投与を行った。抗体投与前と投与 4 週間後の糞便を回収し腸内細菌叢解析を行った(図 8) [24]。図 8 の細菌種は腸内細菌叢全体に占める相対的割合が抗体投与前後に有意に変化した細菌種のみを記載した。抗体投与前に比べ投与後では、W27 IgA 抗体結合菌である *Lactobacillaceae* と *Prevotellaceae* の割合が減少し、W27 IgA 抗体非結合菌である *Ruminococcaceae* と *Lachnospiraceae* の割合が増加していた。つまり、腸炎を引き起こす細菌種である *Lactobacillaceae* と *Prevotellaceae* の割合が減少し、反対に抑制性 T 細胞を誘導する *Ruminococcaceae* と *Lachnospiraceae* の割合は増加した。W27 IgA 抗体をマウスに経口投与することで腸内細菌叢が改善される方向へ変化したと考えられる。

8. IgA 抗体経口投与によるパイエル板胚中心 B 細胞の変化

W27 IgA 抗体をマウスに経口投与することで、腸内細菌叢が改善される方向に変化したので、宿主の免疫系への過剰刺激も減少しているのではないかと予想した。そこで、常在腸内細菌の異常増殖が起こり、リンパ増殖性疾患を発症している AID^{G23S} マウスと AID^{-/-}マウスの小腸パイエル板胚中心 B 細胞の数を計測した。AID^{G23S} マウスでは、W27 IgA 抗体投与マウスの胚中心 B 細胞の数が野生型マウスと同程度まで低下していた(図 9A) [24]。しかし、細菌に対する結合力が低い W2 IgA 抗体(図 2 を参照)を経口投与したマウスでは、胚中心 B 細胞の数の変化を確認できなかった。このことより常在腸内細菌の過剰刺激を抑えるためには細菌に対して強く結合する IgA 抗体を経口投与する必要があると考えられた。AID^{-/-}マウスでも抗体を投与したマウスでは投与していないマウスと比べ、胚中心 B 細胞の数が有意に減少していた(図 9B) [24]。W27 IgA 抗体をマウスに経口投与することで腸内細菌叢が改善され、免疫系の過剰刺激も減少し、リンパ増殖性疾患を発症しているマウスの症状が改善したと考えられる。

9. マウス大腸の抑制性 T 細胞の解析

図 7 の結果から、W27 IgA 抗体を投与することで抑制性 T 細胞を誘導する *Ruminococcaceae* と *Lachnospiraceae* の細菌種が増加していた。そこで実際に、マウス大腸の抑制性 T 細胞が増加しているかを確認した。AID^{G23S} マウスと AID⁻マウスともに W27 IgA 抗体を経口投与することで抑制性 T 細胞が増加していた(図 10A, B) [24]。W27 IgA 抗体をマウスに経口投与することで、*Ruminococcaceae* と *Lachnospiraceae* の細菌種が増加したことにより大腸の抑制性 T 細胞が増加したと推察される。

10. IgA 抗体経口投与による大腸組織像の変化

AID^{G23S} マウスの大腸組織は野生型マウスの大腸に比べクリプトの損傷が確認された(図 11A) [24]。前項までの結果から、W27 IgA 抗体の AID^{G23S} マウスへの経口投与により腸内細菌叢が良好な方向へ変化し、かつリンパ増殖性疾患が改善したことから大腸組織も改善しているのではないかと考えた。大腸組織切片を解析すると、野生型マウスの大腸のクリプトの損傷はすべての個体で大腸全長の 5%以下であったが、AID^{G23S} マウスの大腸のクリプトの損傷は大腸全長の 30%以上のマウスが調べた個体の約 28%(28 匹中 8 匹)を占めた。W27 IgA 抗体を経口投与することで、AID^{G23S} マウスの大腸のクリプトの損傷はすべての個体(13 匹)で 5%以下まで改善された(図 11A, B) [24]。W27 IgA 抗体を経口投与することで腸内細菌の過剰刺激が抑えられ大腸組織の損傷が改善したと考えられる。

11. DSS 誘導性腸炎モデルでの IgA 抗体経口投与効果

リンパ増殖性疾患モデルマウスでは、W27 IgA 抗体を経口投与することで腸内細菌叢を改善し症状を改善することができた。次に一般的な腸炎疾患モデルでの W27 IgA 抗体の経口投与効果の確認を行った。W27 IgA 抗体を経口投与したマウスは、抗体非投与マウスに比べ、体重の減少が有意に抑制された(図 12A) [24]。同様に糞便の状態のスコアである、Disease activity index も減少していた(図 12B) [24] (Disease activity index の詳細は表 7 [33]に示した)。実験終了時(Day 55)の抗体非投与マウスと抗体投与マウスの個体間の腸内細菌叢を比較すると、抗体非投与マウスと抗体投与マウスで統計的に有意に異なっていた(図 12C) [24]。W27 IgA 抗体を経口投与することで腸内細菌叢が変化し、炎症の重篤度に差が生じ体重減少が抑制されたと考えられる。

12. T 細胞移入腸炎モデルマウスでの IgA 抗体経口投与効果

DSS 誘導性腸炎モデルと同様に一般的な腸炎疾患モデルである T 細胞移入

腸炎モデルについても検討を行った。W27 IgA 抗体を経口投与したマウスは、抗体非投与マウスに比べ、体重の減少が有意に抑制された(図 13A) [24]。直腸組織も W27 IgA 抗体を経口投与したマウスは、抗体非投与マウスに比べ損傷が見られなかった(図 13B) [24]。同様に組織の状態を表す Histological score も減少していた(図 13C) [24] (Histological score スコアの詳細は表 8 [34]に示した)。T 細胞移入後 3 週目における抗体非投与マウスと抗体投与マウスの個体間の腸内細菌叢を比較すると、抗体非投与マウスと抗体投与マウスで統計的に有意に異なっていた(図 13D) [24]。W27 IgA 抗体を経口投与することで腸内細菌叢が変化し、炎症が抑制され体重減少が抑制されたと考えられる。

考察

本研究では、野生型マウスの腸管には多種類の細菌に対して反応し強い結合力を持つ IgA 抗体が存在する仮定で実験を行った。実際に野生型マウスの腸管から多種類の常在腸内細菌に対して強い結合力を持つ IgA 抗体(W27)が分離できた。W27 IgA 抗体に特徴的なのが *Lactobacillus casei* や *Bifidobacterium bifidum* のようなプロバイオティクスとして利用されているいわゆる善玉菌と呼ばれるような細菌に対しては弱く結合するかほとんど結合しないことである。W27 IgA 抗体は細菌の SHMT と結合することで細菌の増殖を抑制している。常在腸内細菌に対して結合する IgA 抗体が腸管内に存在しないために常在腸内細菌が異常増殖し、腸内細菌叢の乱れが起きているマウスの腸炎の治療と腸内細菌叢の乱れの改善が W27 IgA 抗体を腸管内に補充することで改善した。これは腸管内で W27 IgA 抗体が腸内細菌に対して結合することで異常増殖していた腸内細菌の増殖を抑えることで、W27 IgA 抗体が結合していない細菌が増殖し、腸管内の腸内細菌の構成が変化することで腸内環境を改善していると考えられる。SHMT は腸内環境を制御するのに重要なカギとなるタンパク質の可能性がある。

今回の結果から多種類の細菌に対して強い結合力を持つ IgA 抗体(W27)を経口投与することで腸内細菌叢の乱れを改善でき腸炎の治療が出来ることを世界で初めて示した。また、腸管 IgA 抗体が常在腸内細菌に対して結合することで常在腸内細菌に対してどのような作用があるのか、また個別の腸管 IgA 抗体が常在腸内細菌の何を認識して結合しているのかを明らかにした。

従来の考え[17]では、腸管に 2 種類存在する IgA 抗体の 1 つは、特定の細菌(例えば病原菌)に対して強い結合力を示し、多種類の細菌に対して反応しない、つまり‘特異性が高く高親和性’と考えられており、もう一方は多種類の細菌(主に常在腸内細菌)に対して反応するが‘特異性が低く低親和性’と考えられてきた。しかし、今回の研究の結果、予想に反して‘多種類の細菌に対して反応し強い結合力’を示す W27 IgA 抗体が分離され、今まで明らかにされていなかった W27 IgA 抗体が腸内細菌のどのような分子を認識しているかも明らかにした。W27 IgA 抗体が認識している細菌の分子は SHMT という代謝酵素であった。先行文献で[35]、IgA 抗体はグラム陽性細菌表面の *carbohydrates* を介して非特異的な結合をしていると示されている。しかし、グラム陰性菌である大腸菌に対する IgA 抗体の結合は脱グリコシル化を行っても変わらないことが確認されており、大腸菌への非特異的な IgA 抗体結合

の機序は未だに不明である[36]。これは今回の結果と一致している。W27 IgA 抗体は SHMT を特異的に認識しているが、SHMT 野生型大腸菌株 ME9062 と SHMT 欠損大腸菌株 JW2535 の両方の細菌表面に結合することが確認できた。しかし、細菌の増殖を抑制したのは、SHMT 野生型大腸菌株 ME9062 のみであった。W27 IgA 抗体は SHMT に結合することで細菌の増殖を抑制したので、おそらく腸管内で選択的に結合する細菌の増殖を抑えていると考えられる。興味深いことに W27 IgA 抗体が認識する SHMT 分子の EEHI 配列を持つ細菌は、一般的に病原菌と呼ばれている細菌が多い[24]。SPF 環境で飼育されていた病原菌に曝されたことがないマウスから W27 IgA 抗体のような抗体が分離できた理由は不明であり今後の研究課題であると考ええる。また、SHMT をコードする glyA 遺伝子を持たない細菌種として *Bifidobacterium bifidum* BGN4 および *Faecalibacterium prausnitzii* L2-6 などがデータベース解析で発見できた。これらのような宿主に有益として知られている細菌には SHMT 分子自体が存在しないことも大変興味深い。これらのことより、今回分離した W27 IgA 抗体は宿主の腸管内防御と共生関係を維持するために合目的的に選択されたと考えられる。

今後の研究課題として1つ目は、なぜ腸管 IgA 抗体の抗原が SHMT のような代謝酵素であるのか、宿主の腸炎を惹起するいわゆる悪玉菌を選別する有効な手段としてエピトープ部分が SHMT の EEHI 配列であることを宿主はなぜ認識できるのかなどの課題を追及したい。また、一般的に SHMT 分子は細胞質内に存在するタンパク質であると考えられている。なぜ、W27 IgA 抗体が細菌の SHMT を認識することができるかを明らかにすることも重要である。先行文献[37-39]によれば大腸菌の SHMT はペリプラズムに存在することが明らかになっているので SHMT 分子の一部が表面に露出することで W27 IgA 抗体が結合できるのではないかと推察される。

2つ目の課題は、W27 IgA 抗体によるヒトの腸内細菌叢の改善効果を検討することである。そのために、無菌マウスにヒトの腸内細菌叢を移植し W27 IgA 抗体を経口投与することで腸内細菌叢に変化が起きるのかを確認したい。またヒトの腸内細菌叢を移植した無菌マウスからハイブリドーマ抗体を作製し、ヒトの腸内細菌の刺激で作られる IgA 抗体が W27 IgA 抗体と同様の分子 SHMT を認識しているかを確認していく。今回作製した W27 IgA 抗体がヒトの腸内細菌叢にも改善効果を持つことを確認し、W27 IgA 抗体を腸内細菌叢改善薬として炎症性腸疾患などの病気の経口医薬としたい。W27 IgA 抗体は抗生剤のようにすべての細菌を殺すのではなく、宿主にとって有益ではない

悪い細菌の増殖を抑え有益な細菌の増殖を助けることで宿主の腸内環境を良い方向へと動かすことができると考えられる。

最後に以前の報告[18]で、炎症性腸疾患の患者の糞便から IgA 結合菌のみを分離し無菌マウスに移入すると健常人の糞便由来の IgA 結合菌のみを分離し移入したマウスに比べて DSS 腸炎が重症化していた。このことから腸内細菌叢が乱れていると腸炎が重症化すると予想された。従って W27 IgA 抗体の経口投与により腸内細菌叢の乱れを改善することができれば腸炎を抑えられるのではないかと考え、今回の研究を行った。予想した通り、W27 IgA 抗体を DSS 腸炎モデルマウス、T 細胞移入腸炎モデルマウスに経口投与を行うことで腸炎を抑制することができた。抗体による腸炎抑制効果は、炎症そのものの抑制によるものではなく、W27 IgA 抗体を経口投与することでマウスの腸内細菌叢が変化し、その結果 DSS 腸炎や T 細胞移入腸炎を抑制することができたと考えられる。しかし、DSS 腸炎モデルマウス、T 細胞移入腸炎モデルでの腸内細菌の影響はまだ詳しいことが分かっていない。今後、W27 IgA 抗体と腸炎を惹起する腸内細菌との関係を解析していきたい。

W27 IgA 抗体は、現在使われている免疫抑制剤や抗炎症剤のように宿主の免疫反応を制御するのではなく、宿主の免疫反応の原因である抗原そのものを制御する抗体であり、今までの医薬品とは全く異なる視点の医薬品につながる可能性がある。

謝辞

本論文は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科応用免疫学研究室及び長浜バイオ大学大学院バイオサイエンス研究科生体応答学研究室において新藏礼子教授のご指導の下、行った研究成果をまとめたものである。新藏礼子教授には、研究のご指導やご鞭撻を賜りまして謹んで感謝いたします。

本研究を行うにあたり、アドバイザーとして数多くの貴重なご意見、ご助言いただきました、奈良先端科学技術大学院大学・構造生物学研究室・箱嶋敏雄教授奈良先端科学技術大学院大学・分子免疫制御研究室・河合 太郎教授に深く感謝申し上げます。格別のご支援、ご協力を賜りました、長浜バイオ大学・長谷川 慎教授、中村 肇伸准教授、京都大学病院・黒澤 学博士、熊本大学エイズ研究センター・岡田 誠治教授、東京工業大学・山田 拓司准教授、西山 依里博士、山本 和也氏、国立遺伝学研究所・黒川 顕教授、森 宙史助教、ヤクルト中央研究所・南野 昌信博士、松本 敏博士、内藤智昭博士、渡邊 洋平博士、理化学研究所・大野 博司博士、宮内 栄治博士、加藤 保博士、応用免疫学研究室メンバーにこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Bensussan, C. N., and Routhian, G. V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol.* 10, 735-744.
2. Hooper, L. V., and Macpherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol.* 10, 159-169
3. Round, J. L., and Mazmanian, S. K. (2010). Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 12204-12209.
4. Gilbert, J. A., Quinn, R. A., Debelius, J., Xu, Z. Z., Morton, J., Garg, N., Jansson, J. K., Dorrestein, P. C., and Knight, R. (2016). Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. *Nature.* 535, 94–103.
5. Kumar, V. M., Aitken, J. D., Carvalho, F. A., Cullender, T. C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S. V., Knight, R., Ley, R. E., and Gewirtz, A. T. (2010). Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science.* 328, 228-231.
6. Shulzhenko, K., Morgun, A., Hsiao, W., Battle, M., Yao, M., Gavrilova, O., Orandle, M., Mayer, L., Macpherson, A. J., McCoy, K. D., et al. (2011). Crosstalk between B lymphocytes, microbiota and the intestinal epithelium governs immunity versus metabolism in the gut. *Nat Med.* 17, 1585-1593.
7. Bry, L., Falk, P. G., Midtvedt, T., and Gordon, J. I. (1996). A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science.* 273, 1380-1383.
8. Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Yadava, K., Sichelstiel, A. K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., Blanchard, C., Junt, T., Nicod, L. P., Harris, N. L., and Marsland, B. J. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med.* 20, 159-66.
9. Andoh, A., Kuzuoka, H., Tsujikawa, T., Nakamura, S., Hirai, F., Suzuki, Y.,

- Matsui, T., Fujiyama, Y., and Matsumoto, T. (2012). Multicenter analysis of fecal microbiota profiles in Japanese patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol.* 47, 1298-1307.
10. Andoh, A., Imaeda, H., Aomatsu, T., Inatomi, O., Bamba, S., Sasaki, M., Saito, Y., Tsujikawa, T., and Fujiyama, Y. Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *J Gastroenterol.* 46, 479-486.
 11. Brandtzaeg, P. (2013). Secretory IgA: designed for anti-microbial defense. *Front. Immunol.* 4, 222.
 12. Fernandez, M. I., Pedron, T., Tournebize, R., Olivo-Marin, J. C., Sansonetti, P. J., and Phalipon, A. (2003). Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin a by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells. *Immunity.* 18, 739-749.
 13. Martinoli, C., Chiavelli, A., and Rescigno, M. (2007). Entry route of *Salmonella typhimurium* directs the type of induced immune response. *Immunity.* 27, 975-984.
 14. Boullier, S., Tanguy, M., Kadaoui, K. A., Caubet, C., Sansonetti, P., Corthésy, B., and Phalipon, A. (2009). Secretory IgA-mediated neutralization of *Shigella flexneri* prevents intestinal tissue destruction by down-regulating inflammatory circuits. *J Immunol.* 183, 5879-5885.
 15. Phalipon, A., Cardona, A., Kraehenbuhl, J. P., Edelman, L., Sansonetti, P. J., and Corthésy, B. (2002). Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity.* 17, 107-115.
 16. Macpherson, A. J., and Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science.* 303, 1662-1665.
 17. Macpherson, A. J., and McCoy, K. D. (2015). Independence Day for IgA. *Immunity.* 43, 416-418

18. Palm, N. W., de Zoete, M. R., Cullen, T. W., Barry, N.A., Stefanowski, J., Hao, L., Degnan PH., Hu, J., Peter, I., Zhang, W., Ruggiero, E., Cho, JH., Goodman, AL., and Flavell, RA. (2014). Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell*. 158, 1000-1010.
19. Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 102, 553-563.
20. Shinkura, R., Ito, S., Begum, N. A., Nagaoka, H., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Sakakibara, Y., Hijikata, H., and Honjo T. (2004). Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat Immunol*. 5, 707-712.
21. Ta, V. T., Nagaoka, H., Catalan, N., Durandy, A., Fischer, A., Imai, K., Nonoyama, S., Tashiro, J., Ikegawa, M., Ito, S., Kinoshita, K., Muramatsu, M., and Honjo, T. (2003). AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat Immunol*. 4, 843-848.
22. Fagarasan, S., Muramatsu, M., Suzuki, K., Nagaoka, H., Hiai, H., and Honjo, T. (2002). Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science*. 298, 1424–1427.
23. Wei, M., Shinkura, R., Doi, Y., Maruya, M., Fagarasan, S., and Honjo, T. (2011). Mice carrying a knock-in mutation of Aicda resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. *Nat Immunol*. 12, 264-270.
24. Okai, S., Usui, F., Yokota, S., Hori-I, Y., Hasegawa, M., Nakamura, T., Kurosawa, M., Okada, S., Yamamoto, K., Nishiyama, E., et al. (2016). High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice. *Nat Microbiol*. 1, 16103.
25. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., and Mori, H. (2006). Construction of Escherichia

coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol.* 2, 2006.0008

26. Morita, H., Kuwahara, T., Ohshima, K., Sasamoto, H., Itoh, K., Hattori, M., Hayashi, T., and Takami, H. (2007). An Improved DNA Isolation Method for Metagenomic Analysis of the Microbial Flora of the Human Intestine. *Microbes Environ.* 22, 214-222.
27. Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., and Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol.* 79, 5112-5120.
28. Schmieder, R., Lim, Y. W., Rohwer, F., and Edwards, R. (2010). TagCleaner: Identification and removal of tag sequences from genomic and metagenomic datasets. *BMC Bioinformatics.* 11, 341.
29. Edgar, R.C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., and Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics.* 27, 2194-2200.
30. Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., and Cole, J. R. (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 73, 5261-5267.
31. Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., Schwager, E., Knights, D., Song, S. J., Yassour, M., Morgan, X. C., Kostic, A. D., Luo, C., et al. (2014). The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe.* 15, 264-270.
32. Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., et al. (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature.* 500, 232-236.
33. Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S., and Sedergran, D. J. (1993).

Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis.
Lab Invest. 69, 238-249

34. Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med.* 190, 995-1004.
35. Mantis, N. J., Rol, N., and Corthésy, B. (2011). Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* 4, 603-611.
36. Mathias, A., and Corthésy, B. (2011). Recognition of gram-positive intestinal bacteria by hybridoma- and colostrum-derived secretory immunoglobulin A is mediated by carbohydrates. *J Biol Chem.* 286, 17239-17247.
37. Lasserre, J. P., Beyne, E., Pyndiah, S., Lapaillerie, D., Claverol, S., and Bonneau, M. (2006). A complexomic study of *Escherichia coli* using two-dimensional blue native/SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 27, 3306-3321.
38. Link, A. J., Robison, K., and Church, G. M. (1997). Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis.* 18, 1259-1313
39. Weiner, J. H., and Li, L. (2008). Proteome of the *Escherichia coli* envelope and technological challenges in membrane proteome analysis. *Biochim Biophys Acta.*

图表

Clone	V _H	D _H	J _H	No. of amino acid changes
W1	J558.22.112	DSP2.7	JH2	17
W2	V165.1	DSP2.2	JH3	7
W3	3609N.2.77	DFL16.1	JH1	2
W4	VH10.3.91	-	JH2	16
W6	SM7.3.54	DFL16.1	JH2	7
W7	J558.6	DST4-C57BL/6	JH4	17
W11	VHQ52.a21.63	DSP2.9	JH2	8
W24	J558.67.166	DST4.3	JH4	7
W27	SM7.2.49	DFL16.1	JH2	12
W28	Q52.2.4	DSP2.9	JH2	9
W30	J558.18.108	DSP2.9	JH2	12
W32	V165.1	DSP2.2	JH3	6
W34	36-60.1.46	DFL16.1	JH4	6
W37	J558.9.99	DQ52-BALB/c	JH2	8
W43	J558.5A	DSP2.7	JH2	11
W45	7183.20.37	DSP2.8	JH4	1

表 6. 各ハイブリドーマ IgA 抗体の重鎖可変領域遺伝子の VDJ セグメントとアミノ酸変異数

Score	Weight loss	Stool consistency	Occult/gross bleeding
0	None	Normal	Normal
1	1-5%		
2	5-10%	Loose stools	Hemoccult +
3	10-20%		
4	>20%	Diarrhea	Gross bleeding

表 7. DSS 腸炎での Disease activity index の基準 [30]

Disease activity index は、体重減少と糞便の硬さと出血のスコアを足して 3 で割った値として示す。糞便は **Normal** が良好に形成されたペレット、**Loose stools** は、ペースト状や半球状の糞便、**Diarrhea** は、液体の糞便で肛門に張り付く糞便と定義される。

Score	Histological change
0	0 was given when there were no changes observed.
1	Minimal scattered mucosal inflammatory cell infiltrates, with or without minimal epithelial hyperplasia; grade.
2	Mild scattered to diffuse inflammatory cell infiltrates, sometimes extending into the submucosa and associated with erosions, with minimal to mild epithelial hyperplasia and minimal to mild mucin depletion from goblet cells; grade.
3	Mild to moderate inflammatory cell infiltrates that were sometimes transmural, often associated with ulceration, with moderate epithelial hyperplasia and mucin depletion; grade.
4	Marked inflammatory cell infiltrates that were often transmural and associated with ulceration, with marked epithelial hyperplasia and mucin depletion; and grade.
5	Marked transmural inflammation with severe ulceration and loss of intestinal glands.

表 8. T 細胞移入腸炎の Histological score の基準 [31]

		野生型マウス由来IgA抗体														
細菌名	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
	1	2	3	4	6	7	11	24	27	28	30	32	34	37	43	45
<i>Escherichia coli</i>	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Staphylococcus lentus</i>	■	□	■	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecalis</i>	□	□	■	■	□	□	■	■	■	■	■	■	□	■	□	■
<i>Pseudomonas fulva</i>	■	□	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Lactobacillus murinus</i>	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterorhabdus mucosicola</i>	■	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Lactobacillus casei</i>	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<i>Blautia coccoides</i>	■	■	■	■	■	■	■	ND	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Megamonas hypermegale</i>	□	□	■	□	□	□	□	ND	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Prevotella melaninogenica</i>	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Bacteroides vulgatus</i>	■	■	■	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Megamonas funiformis</i>	■	□	■	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Blautia producta</i>	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

図 1. 各ハイブリドーマ IgA 抗体の細菌に対する反応性

IgA 抗体が細菌に反応した場合(OD_{405 nm} の値が 0.3 以上)を■、反応しなかった場合を□で表す。ND は解析を行っていないことを示す。抗体濃度は 1.4 μg/ml で統一した。

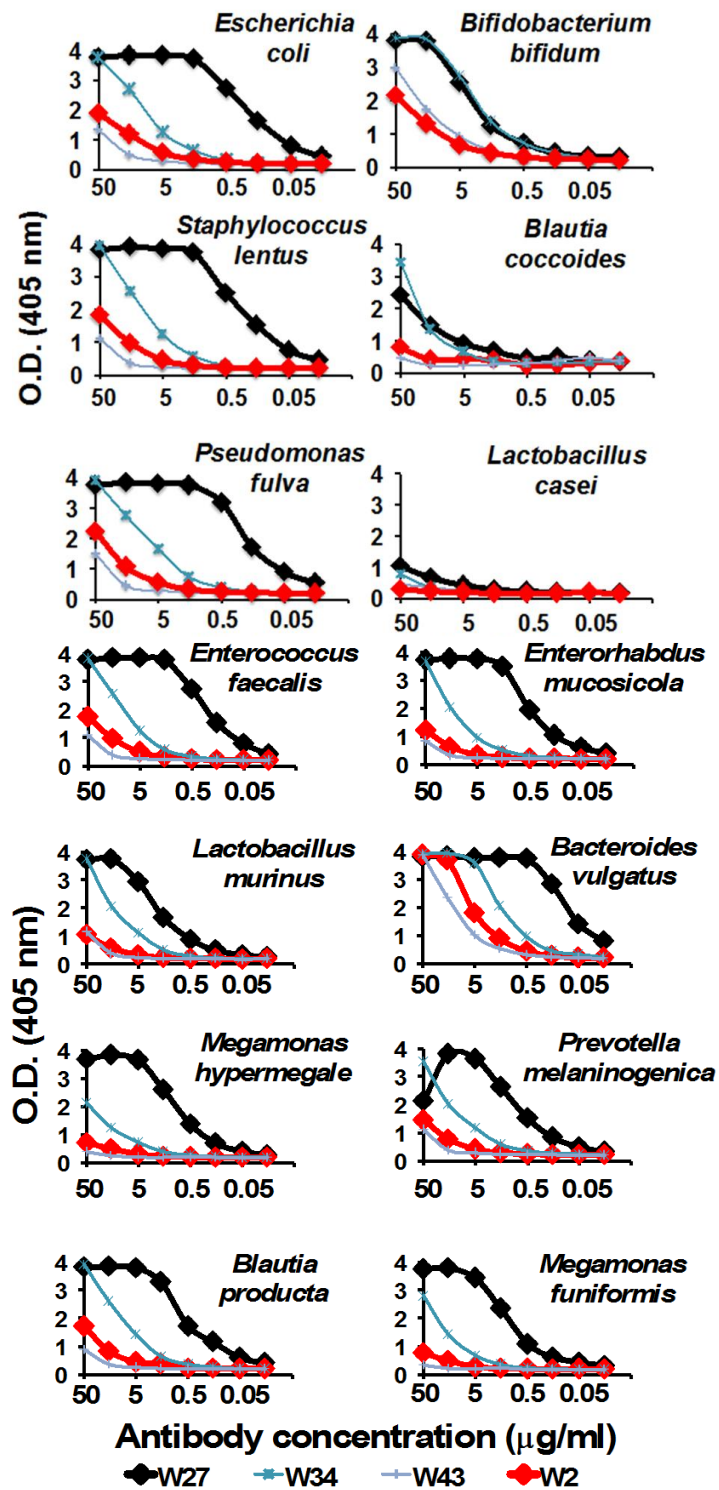
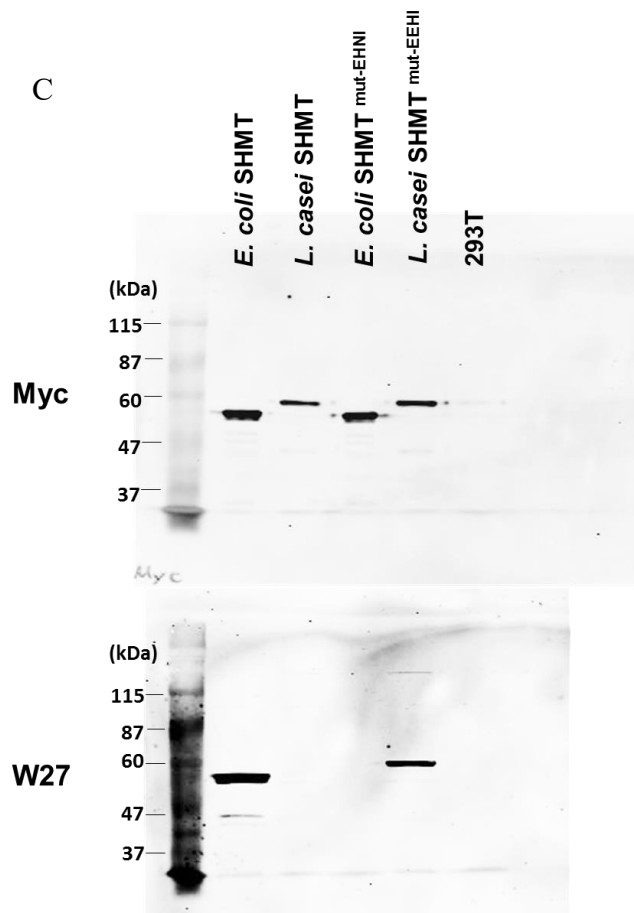
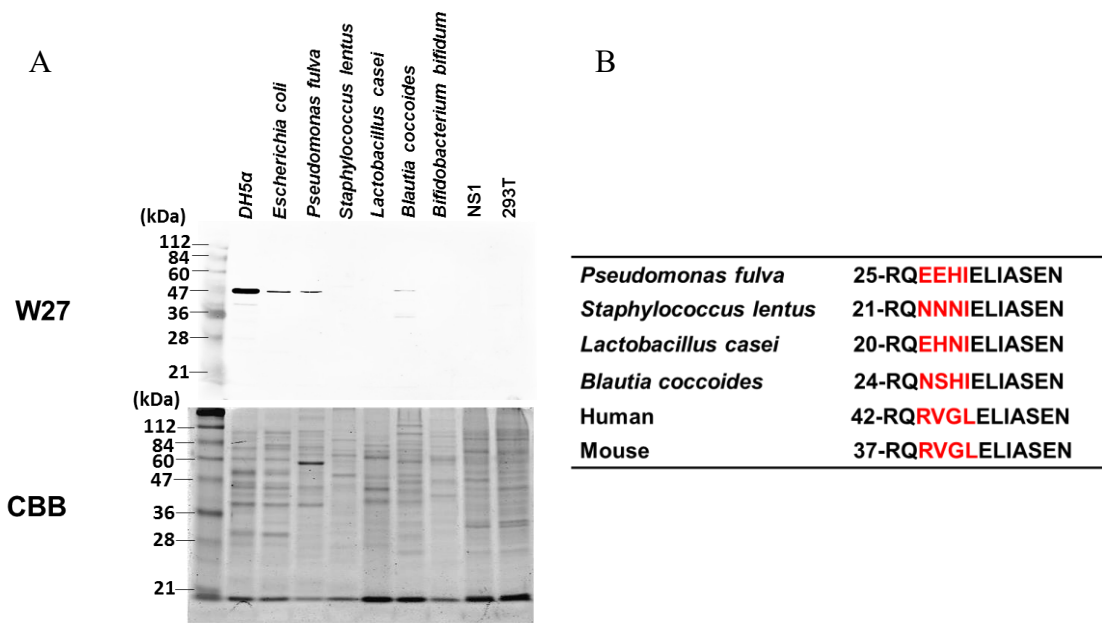


図 2. 各ハイブリドーマ IgA 抗体の細菌に対する結合力の比較

ELISA 法で 14 種類の細菌に対するモノクローナル IgA 抗体の結合力を比較した。横軸は抗体濃度を表し、縦軸は吸光度 405 nm を表す。



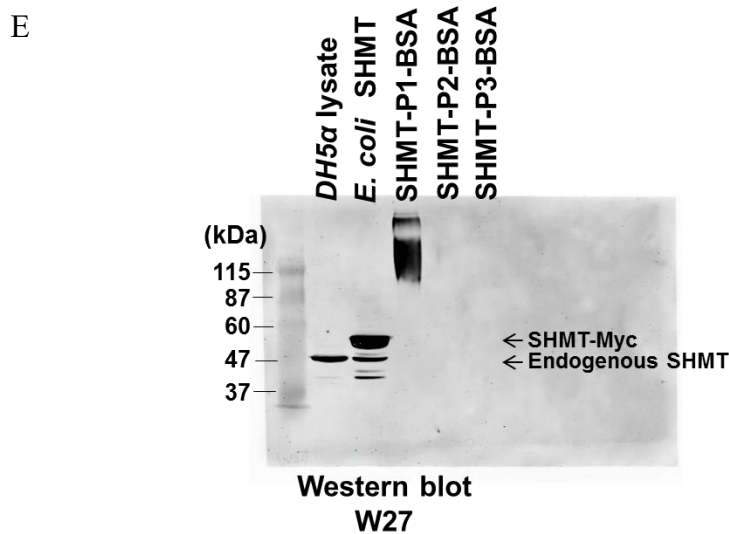
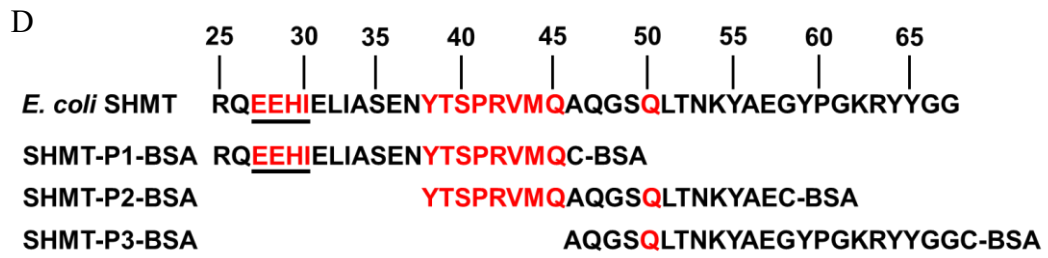


図 3. W27 IgA 抗体が認識する抗原とエピトープ

A. W27 IgA 抗体を用いた 7 種類の細菌と 2 種類の哺乳類細胞に対する Western blotting (図 上)。タンパク質量確認のための CBB 染色(図 下)。NS-1 細胞：マウス由来骨髄腫細胞 293T：ヒト胎児由来腎臓上皮細胞

B. 細菌とヒトおよびマウスの SHMT N 末配列。黒字が保存されている配列。赤字が可変部配列。

C. SHMT の 4 アミノ酸配列変異体を作製し、W27 IgA 抗体の反応を確認した。

D. *E. coli* SHMT の N 末合成ペプチドのアミノ酸配列

E. W27 IgA 抗体が反応するペプチドの解析

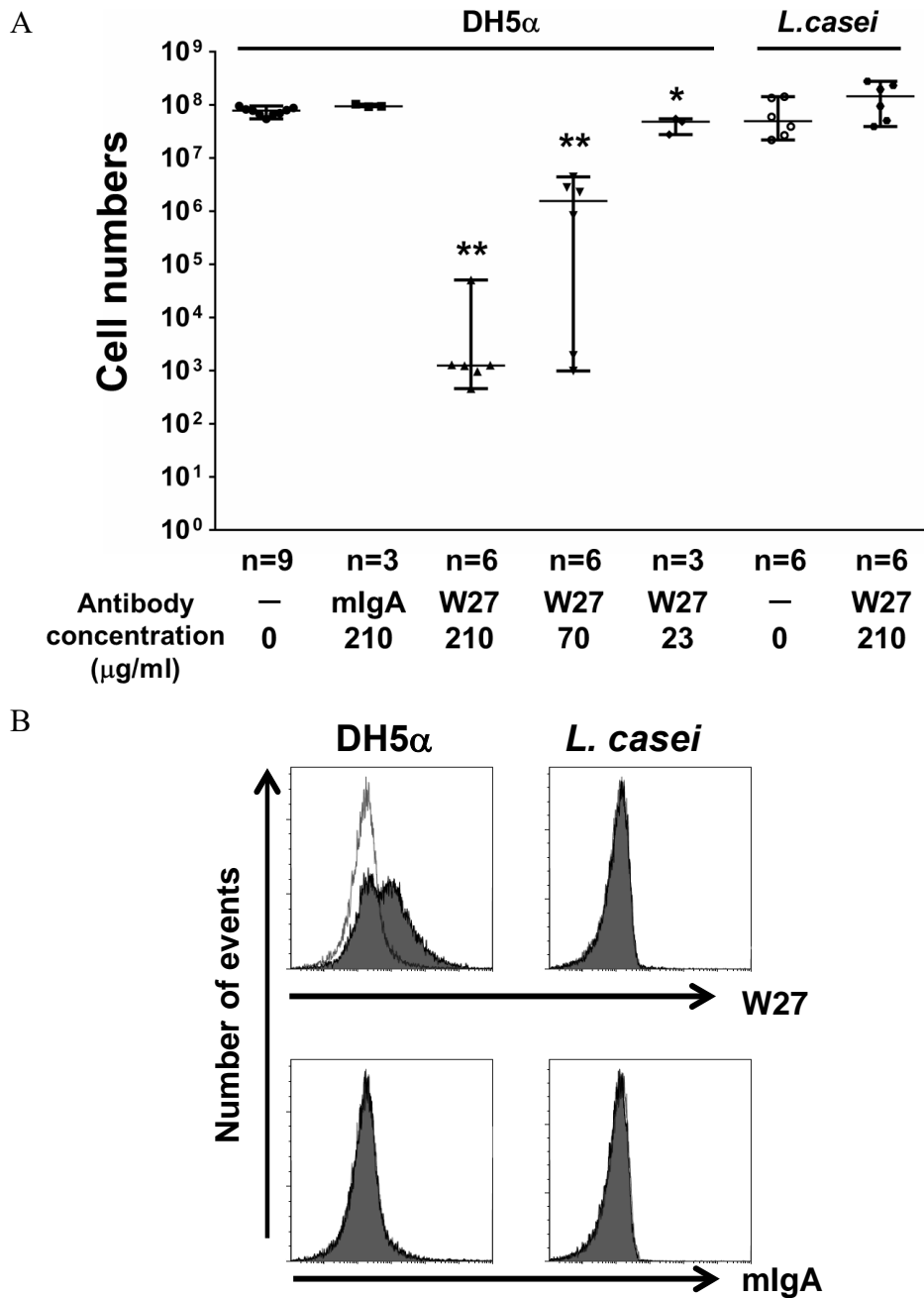


図 4. DH5αと *Lactobacillus casei* の増殖抑制試験

A. 精製 W27 IgA 抗体及びコントロール mIgA を細菌と共培養した。横棒は medians ± range、統計解析は Bonferroni-Holm post-hoc tests で多重解析を行った。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

B. フローサイトメーターを使用し、精製 W27 IgA 抗体及びコントロール mIgA を用いて細菌への結合を検討した。

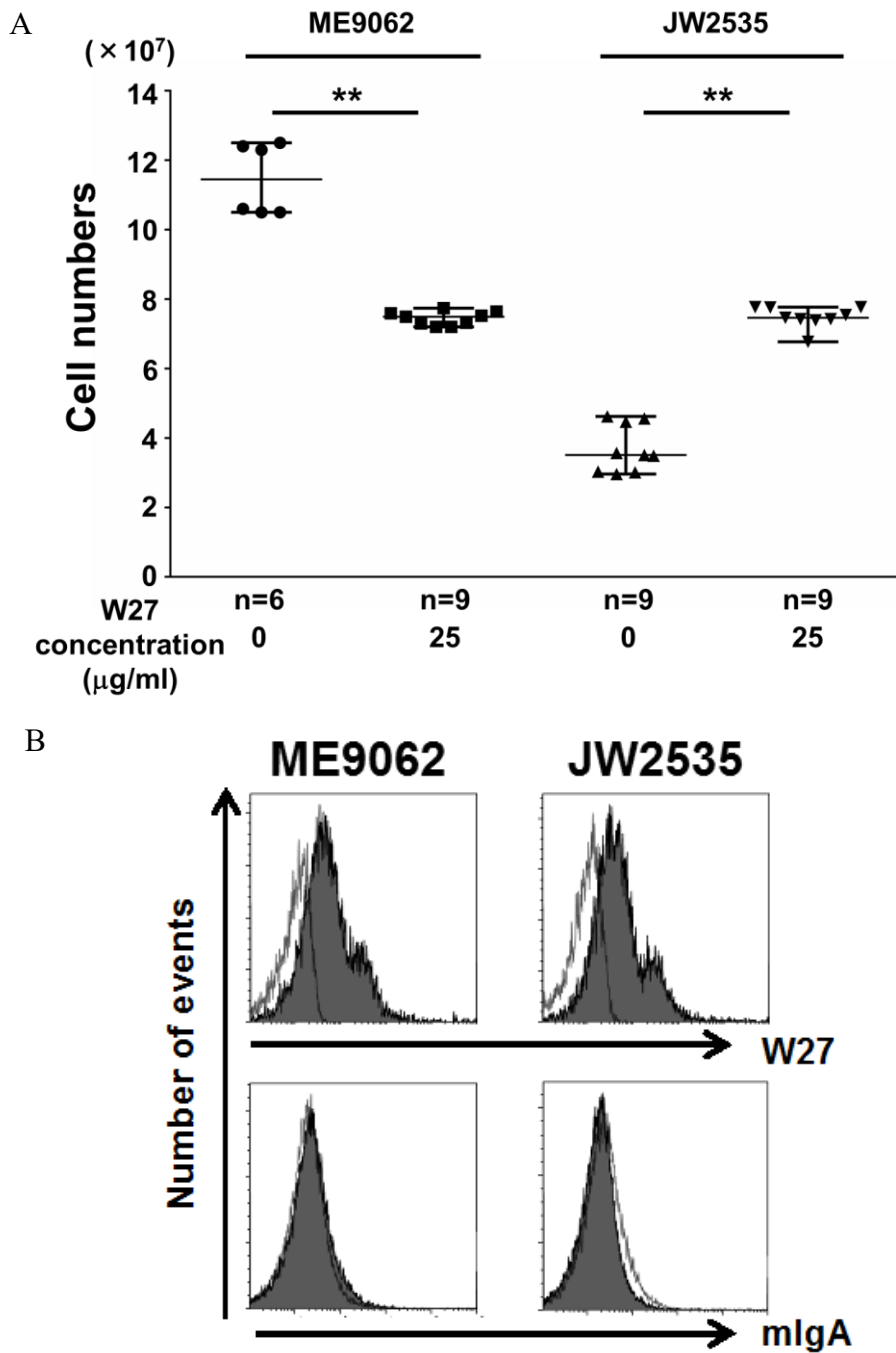


図 5. SHMT 野生型大腸菌株 ME9062 と SHMT 欠損大腸菌株 JW2535 の増殖抑制試験

A. 精製 W27 IgA 抗体及びコントロール mIgA を細菌と共培養した。横棒は medians ± range、統計解析は Two-sided Mann–Whitney test を行った。** $P < 0.01$

B. フローサイトメーターを使用し精製 W27 IgA 抗体及びコントロール mIgA を用いて細菌への結合を検討した。

**AID^{-/-}
W27-treated**

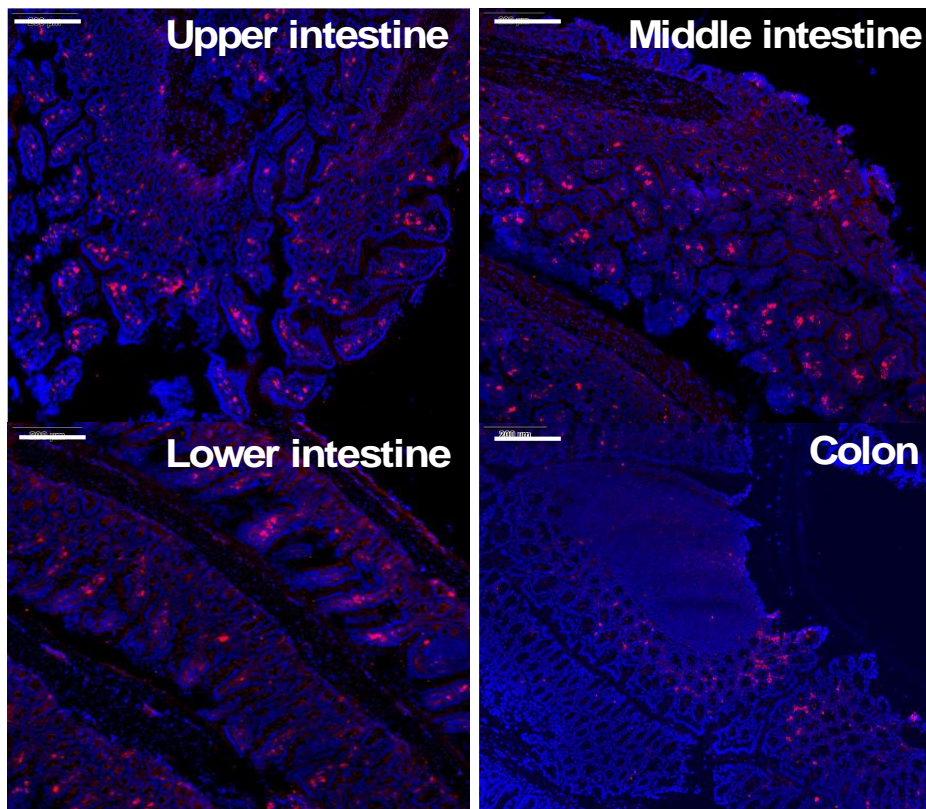


図 6. W27 IgA 抗体投与後の腸管内での IgA 抗体の局在

AID^{-/-}マウスに W27 IgA 抗体 1 mg を胃ゾンデを使用して経口投与を行った。4 時間後解剖し組織を凍結し、切片を作成した。染色に用いた抗体は、rabbit anti-mouse IgA (Rockland Antibodies)、Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies)および DAPI を使用した。

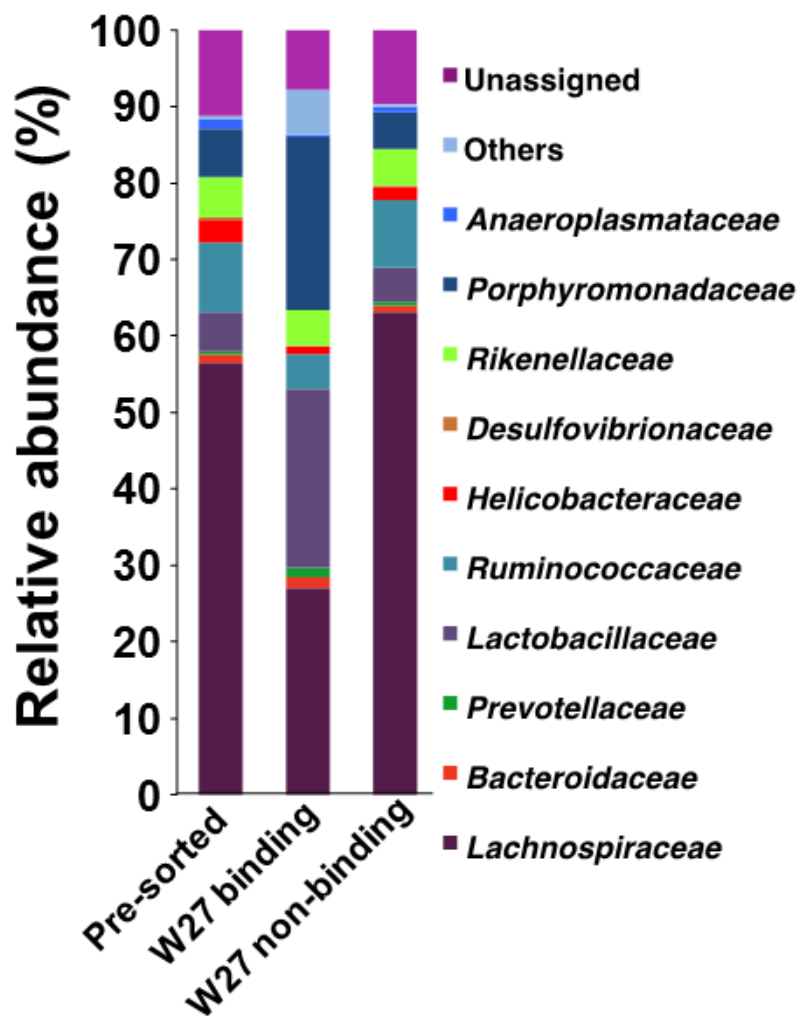


図 7. W27 IgA 抗体結合細菌と非結合細菌(AID^{-/-}マウス)

W27 IgA 抗体結合菌として *Lactobacillaceae* と *Prevotellaceae* などの細菌種が濃縮された。また、W27 IgA 抗体非結合菌としては *Ruminococcaceae* と *Lachnospiraceae* などが濃縮された。

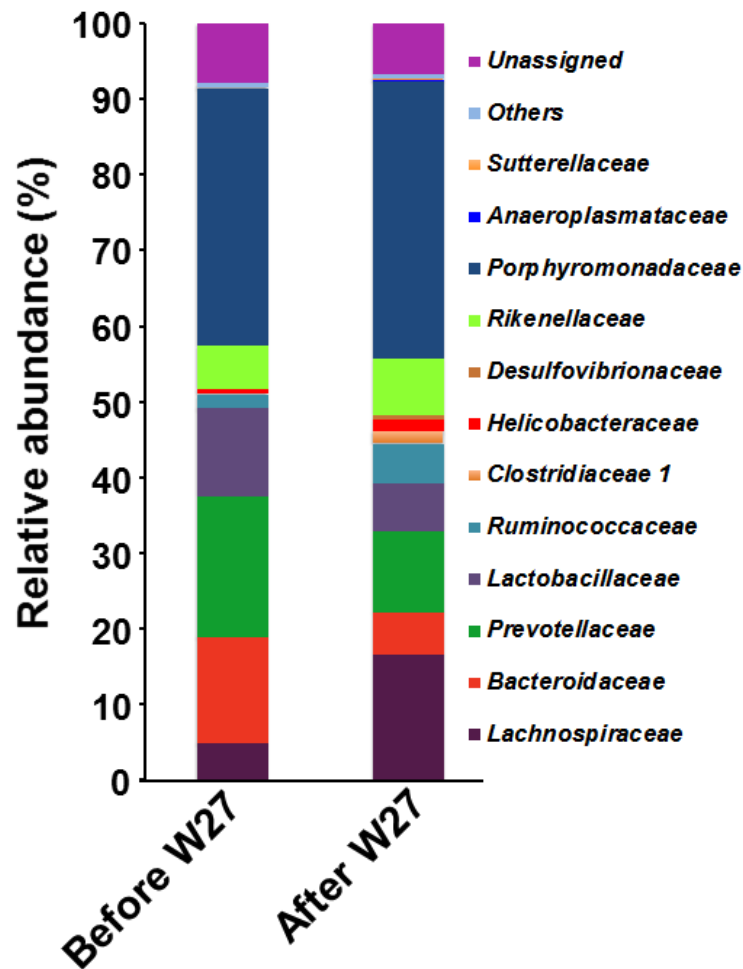


図 8. W27 IgA 抗体投与前後の腸内細菌叢の比較

AID^{G23S} マウスに W27 抗体を 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で給水瓶に加え 4 週間継続経口投与を行った。W27 IgA 抗体を経口投与することで *Lactobacillaceae* と *Prevotellaceae* などの細菌種の割合が減少した。反対に *Ruminococcaceae* と *Lachnospiraceae* の割合は抗体投与後で増加した。表記した細菌種は、Fisher's exact test 統計解析により $P < 0.05$ の有意な変化が確認された細菌種のみを列挙している。

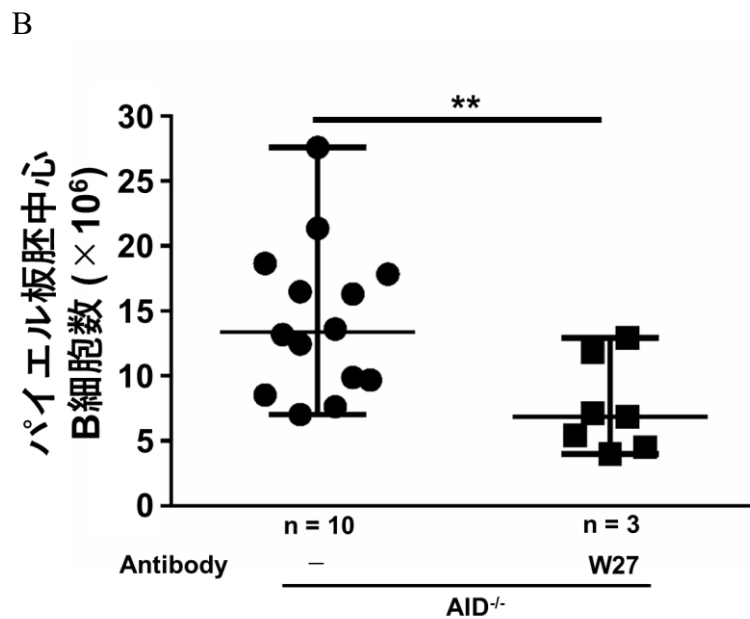
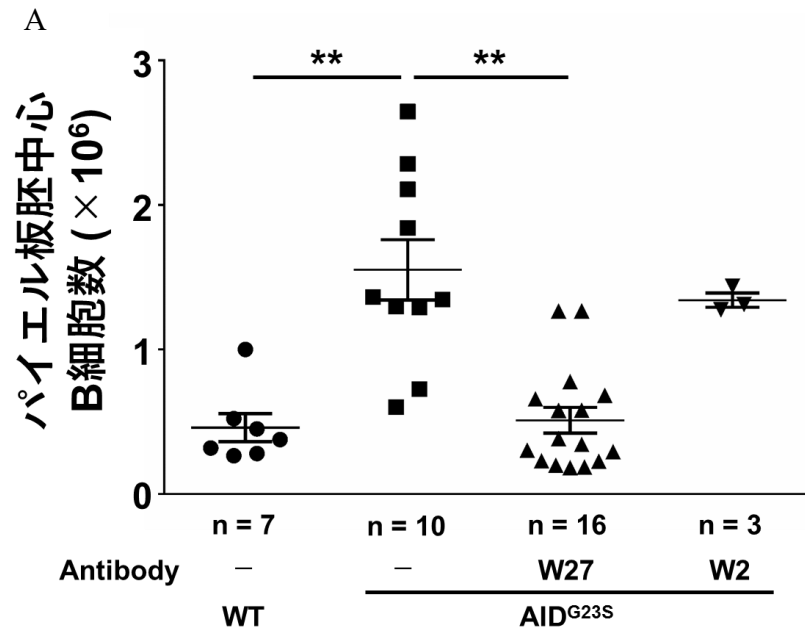


図 9. IgA 抗体投与前後のパイエル板胚中心 B 細胞数の比較

A. AID^{G23S} マウスに W27 抗体を 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で給水瓶に加え 4 週間継続経口投与を行った。横棒は means \pm s.e.m.、統計解析は Bonferroni-Holm post-hoc tests で多重解析を行った。* $P < 0.01$

B. AID^{-/-} マウスに W27 抗体 30 μg を胃ゾンデで週 2 回 4 週間経口投与を行った。横棒は medians \pm range、統計解析は Two-sided Mann-Whitney test を行った。** $P < 0.01$

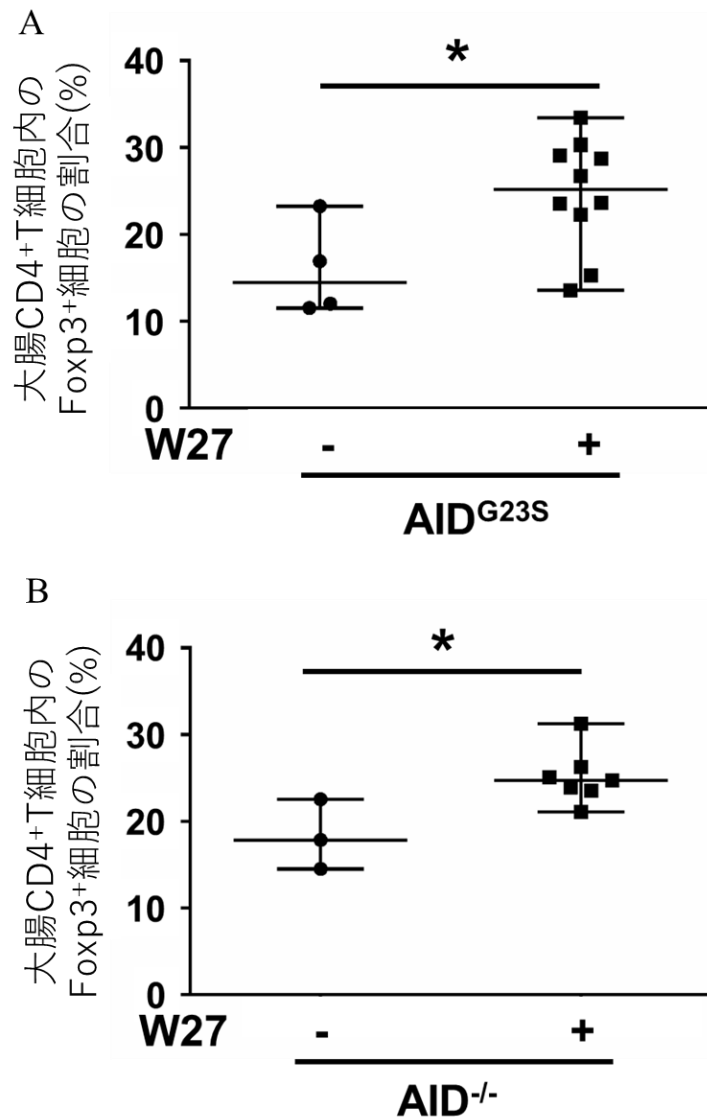


図 10. W27 IgA 抗体経口投与前後の大腸抑制性 T 細胞の割合の比較

A. AID^{G23S} マウスに W27 抗体 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で給水瓶に加え 4 週間継続経口投与を行った。横棒は medians \pm range、統計解析は Two-sided Mann-Whitney test を行った。* $P < 0.05$

B. AID^{-/-} マウスに W27 抗体 30 μg を胃ゾンデで週 2 回 4 週間経口投与を行った。横棒は medians \pm range、統計解析は Two-sided Mann-Whitney test を行った。* $P < 0.05$

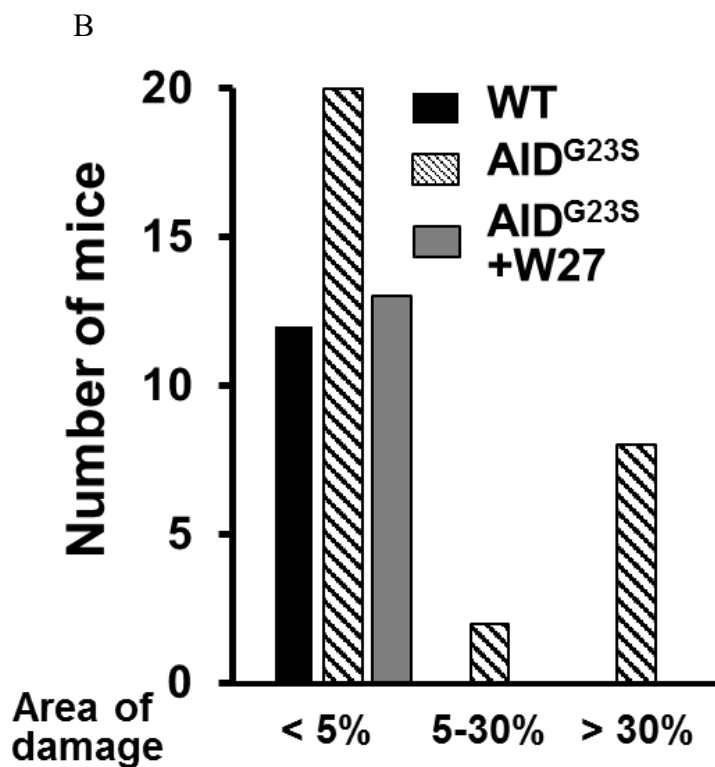
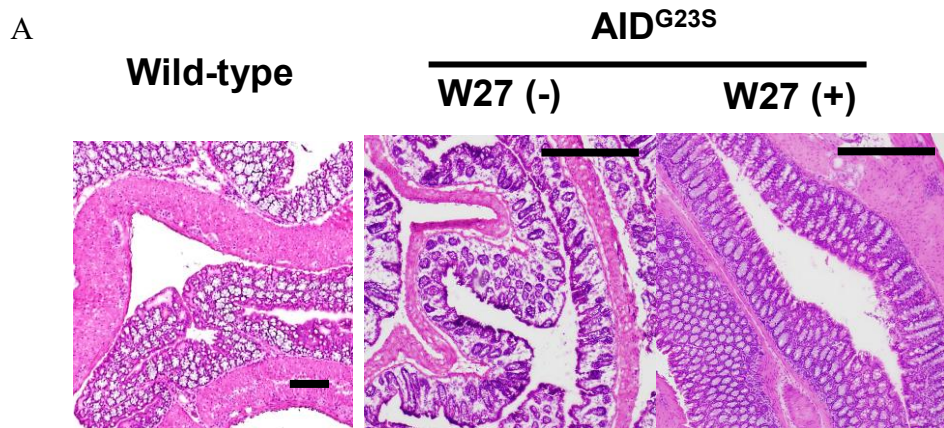


図 11. W27 IgA 抗体経口投与マウスの大腸組織の比較

A. AID^{G23S} マウスに W27 抗体を 25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で給水瓶に加え 4 週間継続経口投与を行った。マウス大腸組織は HE 染色を行った。スケールバーは 500 μm

B. 野生型マウスと AID^{G23S} マウス、AID^{G23S} マウスに W27 抗体経口投与マウスについて、マウスの大腸全長に占めるクリプト損傷部位の割合を比較した。

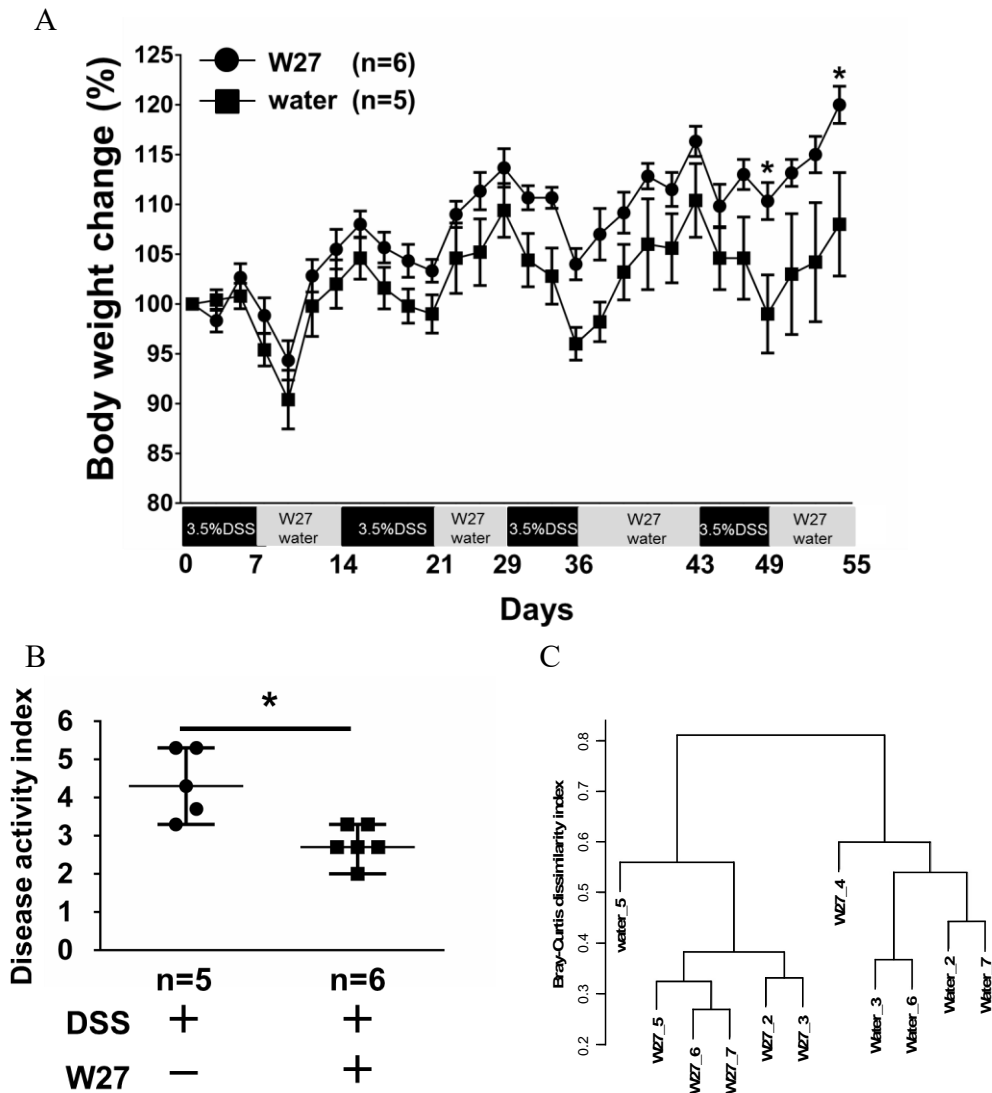


図 12. W27 IgA 抗体の経口投与による DSS 腸炎の抑制

A. 野生型マウスに 3.5% DSS 添加飲料水、W27 IgA 25 $\mu\text{g/ml}$ 添加飲料水または水のみを交互に与えた。横棒は $\text{mean} \pm \text{s.e.}$ 、統計解析は Bonferroni-Holm post-hoc tests で多重解析を行った。* $P < 0.05$

B. W27 IgA 抗体投与マウスの Disease activity index (Day 55)。横棒は medians \pm range、統計解析は Two-sided Mann-Whitney test を行った。* $P < 0.05$

C. 糞便を回収し各個体間の腸内細菌叢比較解析を行った(Day 55)。統計解析は PERMANOVA を行った。* $P < 0.05$

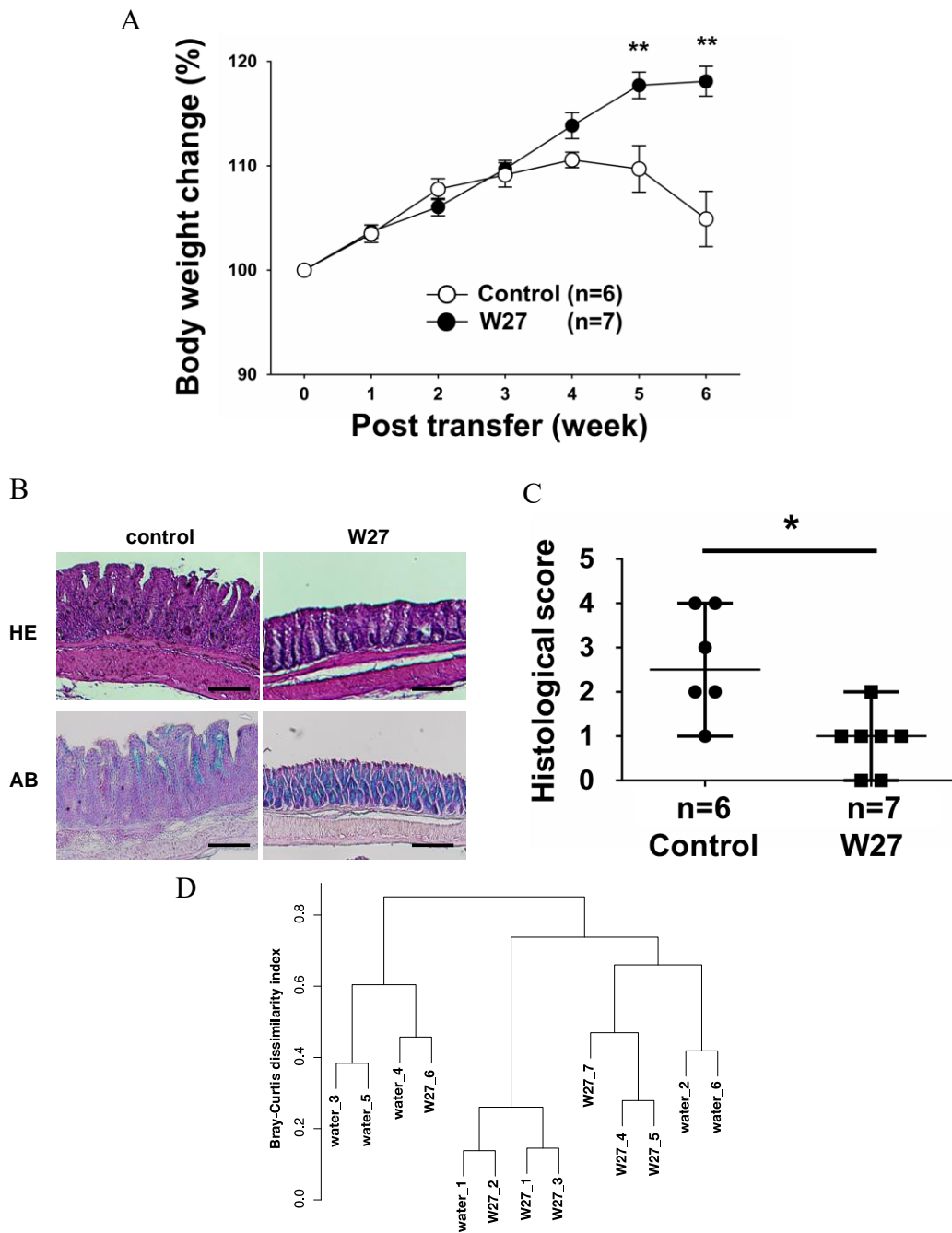


図 13. W27 IgA 抗体の経口投与による T 細胞移入腸炎の抑制

A. $Rag1^{-/-}$ マウスに $CD4^{+}CD45RB^{high}$ T 細胞を移入した。移入後、W27 IgA 25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で飲料水に加える、もしくは水のみを給水瓶で与えた。横棒は $\text{mean} \pm \text{s.e.}$ 、統計解析は Bonferroni–Holm post-hoc tests で多重解析を行った。** $P < 0.01$

B. マウス直腸組織の HE 染色とアルシアンブルー染色。アルシアンブルー

で染まる細胞は粘液産生細胞であり、機能している腸上皮細胞であることを表す。スケールバーは 200 μm

C. マウス大腸の Histological score。横棒は medians \pm range、統計解析は Two-sided Mann–Whitney test を行った。* $P < 0.05$

D. $\text{CD4}^+\text{CD45RB}^{\text{high}}\text{T}$ 細胞移入後 3 週目に糞便を回収し、各個体間の腸内細菌叢比較解析を行った。統計解析は PERMANOVA を行った。* $P < 0.05$