

## 「腸内細菌叢による腸管免疫系の概日リズム制御の実態解明」

神戸大学大学院 農学研究科

万谷 洋平

### 1 研究の背景と目的

動物の消化管には、大量の腸内細菌が棲息しており、ビタミンなどの栄養素の合成、宿主の分解できない栄養素の分解、免疫系などの発生活動など、宿主の健康構築・維持に極めて重要な役割を果たしている。その破綻は **dysbiosis** と呼ばれ、腸疾患のほか、精神疾患なども含む宿主の様々な疾患に関連することが知られている。疾患と腸内細菌の相関関係は、従来の研究から精力的に解析されてきた。例えば、肥満 (Armougom *et al.*, 2009, *PLoS One*, 4, e7125), アレルギー (Sjögren *et al.*, 2009, *Clin. Exp. Allergy* 39, 518–526), 糖尿病 (Karlsson *et al.*, 2013, *Nature* 498, 99–103), 炎症性腸疾患 (Lloyd-Price *et al.*, 2019, *Nature*, 569, 655–662) の患者の糞便では、それぞれ特有の細菌叢の兆候がみられることが報告されている。このため、プロバイオティクスなどによって腸内環境の改善は、古くから試みられてきており、近年では正常なヒト由来の糞便移植による腸内環境の改善も試みられている。したがって、腸内細菌の定着様式やその制御機構を明らかにすることは、今後の腸内環境の改善技術の開発に向けて、社会的に重要な課題と言える。

近年、腸内細菌叢の組成は常に一定ではなく、1日の中で変動することが唾液 (Takayasu *et al.*, 2017, *DNA Res* 24, 261–270), 糞便 (Thaiss *et al.*, 2014, *Cell* 159, 514–529), 盲腸内容物 (Wu *et al.*, 2018, *Biochem Biophys Res Commun* 501, 16–23) で報告されている。さらに、申請者はこれまで、食道、胃、小腸の粘膜表面に定着する細菌の定着量には、それぞれ固有のリズムを有する日内変動が存在することを明らかにしてきた (Sakata *et al.*, 2022, *Cell Tissue Res.*, 389, 71–83)。加えて、このような細菌定着の日内変動が小腸リンパ組織であるパイエル板でも起こり、これを1日限定で破綻させると、ケモカインなどの免疫系を制御する様々な遺伝子の発現が変動すること、さらにマクロファージや肥満細胞などの数が減少することを見出した (Mantani *et al.*, 2023, *Cell Tissue Res.*, 393, 83–95)。このことは、腸内細菌が概日リズムを刻み、腸管免疫系のリズムを毎日コントロールしていることを示唆している。しかしながら、このような腸内細菌のリズムが腸管免疫系に及ぼす影響が、小腸以外の部位でも存在するのか、その実態は不明であり、その詳細なメカニズムについても、現時点では明らかではない。細菌叢が宿主の免疫系の正常な維持と発達に不可欠であることを考えると、それらが日常的に宿主の免疫系を制御するメカニズムを解明することは極めて重要である。そこで本研究では、腸内細菌による腸管免疫系の概日リズム制御の実態について、組織学的解析とバイオインフォマティクス等により明らかにすることを目的とした。

### 2 研究方法・研究内容

今回の研究では、多量の細菌定着のみられるラットの上行結腸を主な実験モデルとして、定着細菌の概日リズムを調べるとともに、それらが上行結腸における集合リンパ小節 (免疫器官) に与える影響を精査した。

#### ①ラット上行結腸における細菌叢量の日内変動の解析

##### 1)上行結腸の定着細菌層を保存できる方法論の検討

過去の研究において、ラットの上行結腸に存在する粘膜ヒダと隣接するヒダと

の間には、大量の腸内細菌が定着していることがわかっている (Mantani *et al.*, 2014, *Anat. Rec.*, 297, 1462–1471; Qi *et al.*, 2009, *J. Vet. Med. Sci.*, 71, 745–752)。しかし、その概日リズムを調べたところ、腸内細菌の集積の中に頻りに亀裂が生じており、正確にその量の日内変動を調べるのが困難であった (図 1)。そこで、より高度な組織構造の保持が期待できる、ヒドロキシメタクリレートを主成分とする低温重合樹脂 (テクノビット 8100, Heraeus Kulzer 社, 独国) による組織包埋法を検討した。

## 2) 上行結腸における細菌叢量の日内変動に関する組織学的解析

4つの時刻 (ZT0, ZT6, ZT12, ZT18) に9週齢の雄 Wistar ラットから、上行結腸組織を採取し、カルノア固定液で固定後、脱水し、①-1)の方法を用いて樹脂に包埋した。滑走式マイクロトーム (Leica SM2000R 型, Leica Microsystem 社, Wetzlar, 独国) を用いてそれらの樹脂ブロックを薄切し、4 μm 厚の切片を作製した。最終的にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色により組織切片を染色し、上行結腸の横断切片から、定着細菌量の日内変動を評価した。

## ② 上行結腸, 盲腸, 糞便における細菌組成解析

細菌組成レベルでの日内変動についても評価した。2つの時刻 (ZT6, ZT18) に9週齢の雄 Wistar ラットから、上行結腸, 盲腸内容物, 糞便を採取した。上行結腸については、定着細菌のみを解析するために、上行結腸組織を採取し、内容物を洗浄後、4% paraformaldehyde で浸漬固定して、凍結ブロックを作製した。上行結腸組織の凍結ブロックから、4 μm 厚の凍結切片を作製した。盲腸内容物, 糞便, 上行結腸の凍結切片からそれぞれ DNA を抽出し、V4 領域に対する 16S rRNA アンプリコンシーケンスを実施した。

## ③ 上行結腸の集合リンパ組織における腸内細菌への応答遺伝子群の探索

抗生物質の飲水投与により、1日限定で腸内細菌の増殖を阻害することで、定着細菌の日内変動に対する応答遺伝子を評価することができる (Mantani *et al.*, 2023, *Cell Tissue Res.*, 393, 83–95)。この方法を用いて細菌のリズムを1日間破綻させた Wista ラットと対照群のラットからそれぞれ上行結腸集合リンパ小節を採取し、RNA を抽出した後、トランスクリプトーム解析に供試した。

また、将来的に空間トランスクリプトーム解析にもつなげるために、方法論の検討も行った。

## 3 研究成果

### (1) 樹脂包埋による細菌層保持の改善

ラットの上行結腸には、腸壁を斜走する粘膜ヒダが存在しており、そのヒダ間には大量の細菌が定着している

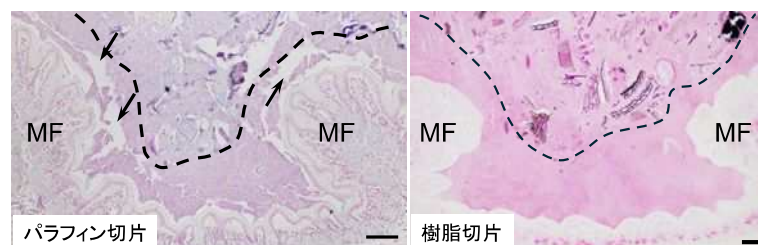


図1 細菌の層を残存させる包埋法の検討: パラフィン切片では粘膜ヒダ (MF) 間における細菌の層に、多数の亀裂が生じている (矢印)。樹脂切片ではこの亀裂がほとんどみられない。Bar = 100 μm

(Mantani *et al.*, 2014, *Anat. Rec.*, 297, 1462–1471; Qi *et al.*, 2009, *J. Vet. Med. Sci.*, 71, 745–752)。本研究で樹脂包埋を試みた結果、以前のパラフィン包埋で頻

繁にみられた細菌層における亀裂が明らかに改善していることがわかった(図 1)。

一方、以前の研究 (Sakata *et al.*, 2022, *Cell Tissue Res.*, 389, 71–83; Mantani *et al.*, 2023, *Cell Tissue Res.*, 393, 83–95) で細菌量の評価に用いていたグラム染色を行った結果、樹脂包埋をした場合には、標本によるばらつきが著しく、信頼性のあるデータを出すことが困難であった(図 2)。そこで、HE 染色を行った結果、細菌の層と内容物を明瞭に区別することが可能であることが示された。そこで、以下の解析では HE 染色を行うこととした。

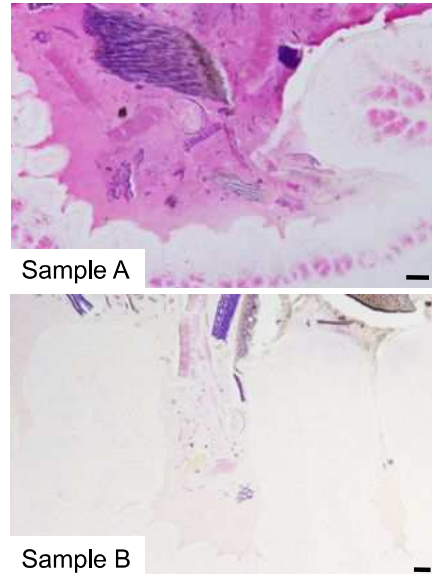


図2 樹脂切片におけるグラム染色: Sampleごとに、染色性に大きな違いがみられ、Sample Bでは細菌の層を評価しづらい。Bar = 100 μm

## (2) 上行結腸表面における細菌定着レベルの日内変動

ラットの上行結腸には、特定の位置に集合リンパ小節が出現する。そこで、この集合リンパ小節と、これに隣接する部位を採取し、それぞれにおける細菌量の日内変動を評価した。その結果、集合リンパ小節を含まない部位では、明瞭な細菌量の日内変動が観察されない一方、集合リンパ小節を含む部位では、細菌量が 1 日の中で変動することが示され、とくに ZT18 において細菌量が多くなることが示された(図 3)。

## (3) 細菌組成レベルでの日内変動に関する解析

まず、上行結腸に定着する細菌が、多くの研究で調べられている盲腸内容物と糞便の細菌と比べて、どのようにユニークな

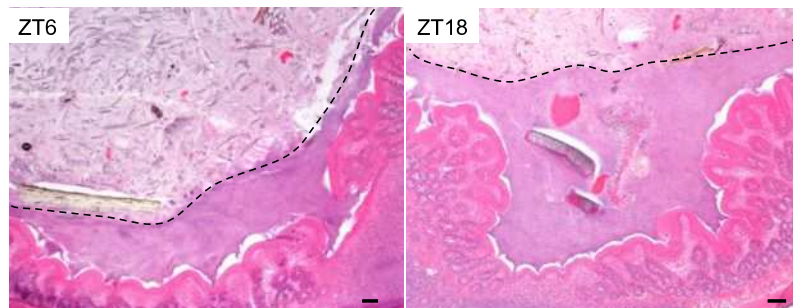


図3 ラット上行結腸における細菌量の概日リズム: 粘膜の表面に分厚い細菌の層が観察される(内容物との境界を破線で示す)。その量は、ZT18で非常に多い。Bar = 100 μm

組成をもつのかを調べた。その結果、上行結腸の定着細菌は、盲腸と糞便の細菌叢とは異なる特徴を持つことが示された。さらに、上行結腸の定着細菌叢を ZT6 と ZT18 で比較すると、いくつかの細菌種がいずれかの ZT で多いことが示された。バイオインフォマティク解析については現在解析途中であり、引き続きより詳細な解析を進めて公表予定である。

## (4) 上行結腸の集合リンパ組織における腸内細菌への応答遺伝子群の同定

上記の通り、上行結腸集合リンパ小節周囲では、定着細菌量に概日リズムが存在することが示された。過去の研究から、このような細菌のリズムを、抗生物質により 1 日限定で破綻させると、小腸の集合リンパ小節では種々の免疫系遺伝子発

現が増加することを見出している (Mantani *et al.*, 2023, *Cell Tissue Res.*, 393, 83–95)。そこで、同実験をラット上行結腸の集合リンパ小節でも実施したところ、小腸よりも多くの遺伝子が増加することが示された。その中には、発現量の低下する遺伝子よりも、増加する遺伝子の方が多く含まれていたことから、定着細菌は上行結腸の集合リンパ小節では多くの遺伝子の発現をむしろ抑制している可能性が考えられた。また、発現低下遺伝子には、上皮細胞の中でも杯細胞の分化を制御する遺伝子が含まれていた。杯細胞の産生する粘液は、細菌に対する重要な生体防御因子でもあり、我々の過去の研究によると、小腸では粘液層の概日リズムが細菌の概日リズム形成に大きく関わる可能性がある (Sakata *et al.*, 2022, *Cell Tissue Res.*, 389, 71–83)。以上のことから、定着細菌が 1 日の中で増加することにより、杯細胞などを介した生体防御応答が活性化される可能性が考察された。バイオインフォマティク解析については現在解析途中であり、引き続きより詳細な解析を進めて公表予定である。

以上の通り、本研究では Wistar ラットを実験モデルとして、上行結腸に定着する細菌が、定着量、細菌組成のレベルで概日リズムを示す可能性が示され、この概日リズムが免疫器官である集合リンパ小節において、種々の遺伝子の発現制御に寄与していることを明らかにすることができた。現在本成果について追加の解析と論文執筆を進めており、来年度以降に学会発表および論文によって公表予定である。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

腸内細菌叢は、「もう一つの臓器」と呼称されるほど、ヒトを含めた宿主動物の健康維持に重要な役割を果たしている。実際に、腸内細菌叢が種々の疾患と関連する可能性が数多く報告されており、その改善技術の確立が望まれている。しかし、それらを効果的に制御する技術を確認し、さらに改善していくためには、細菌叢の生態と役割を深く理解していく必要がある。本研究では、多量の細菌定着がみられるラットの上行結腸を主な実験モデルとして、定着細菌の概日リズムの特徴を明らかにするとともに、それらのリズムが、同部位に発達する免疫器官である集合リンパ小節に及ぼす影響を探索することができた。我々はこの他、小腸などにおける定着細菌の概日リズムや免疫器官への影響解析についての知見も報告している (Sakata *et al.*, 2022, *Cell Tissue Res.*, 389, 71–83; Mantani *et al.*, 2023, *Cell Tissue Res.*, 393, 83–95)。このため、これらの知見と合わせて、将来的にはヒト、家畜、愛玩動物における腸内環境の改善技術を概日リズムの観点から改良することで、広く動物の健康寿命延伸に貢献することが期待できる。

##### 【語句説明】

概日リズム：生物体内に備わる 24 時間周期の体内リズムのこと。

**Dysbiosis**: 宿主の体調や生活習慣の変化などにより、腸内細菌叢の細菌数や構成比が減少するなどの異常が生じている状態を指す。**dysbiosis** は食生活の乱れや抗生物質の投与などで生じるとされ、近年では肥満や糖尿病など種々の疾患と関連をもつことが知られている。

**Zeitgeber time (ZT)**：明暗周期に基づく時刻表記。明期12時間/暗期12時間の条件では、明期の開始時刻をZT0、暗期の開始時刻をZT12とする。