

## 論文の内容の要旨

### C-type lectin receptor Dectin-1 regulates the balance of mouse intestinal microbiota

(C 型レクチン受容体 Dectin-1 を介したマウス腸内細菌叢制御機構の解析)

氏名 神谷 知憲

#### 【研究背景と目的】

腸管にはウイルスや真菌、細菌などの無数の生物が共生しており、宿主と相互に作用し共生している。これら共生生物は宿主の免疫システムと密接な関係にあり、お互いを制御している。近年、腸内に共生する細菌の働きが注目されており、腸管のみならず全身性に影響があるという報告もある。このことから、腸内細菌叢を含む腸管恒常性の破綻は身体に重篤な影響をもたらし、様々な疾患の発病につながっている。腸内菌叢バランスの破綻、即ち **Dysbiosis** を防ぐシステムが幾つか存在する中で、近年の研究により、粘膜免疫系、とりわけ自然免疫受容体がそれらに対しての制御機構の一つとして解析が進められ、その役割が期待されている。

Dectin-1 は自然免疫受容体の一種である C 型レクチン受容体ファミリー分子の一つである。Dectin-1 は  $\beta$ -glucan の受容体であり、細胞内領域に ITAM(Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif)を有する。ITAM によって最終的に NF- $\kappa$ B 誘導され、炎症性サイトカイン、別の経路から活性酸素が誘導されることで、真菌感染に対して防御的に働くことが知られている。また、古くから  $\beta$ -glucan は酵母やキノコから多く摂取され、一部の健康食品として販売され、腸や身体に有益な効果をもたらすことが知られている一方で、 $\beta$ -glucan が腸管免疫系の活性化に働くことが最新の研究により報告されている。しかし、 $\beta$ -glucan、または Dectin-1 の腸管恒常性、腸管免疫系への効果のメカニズムは未だ解明されていない。本研究では Dectin-1 を介した  $\beta$ -glucan の腸管恒常性維持を制御するメカニズムについて解析を行った。

## 【結果と考察】

### Dectin-1 欠損マウスでの腸内細菌叢、及び腸管免疫系の変化

Dectin-1 の大腸免疫細胞上での発現を解析した結果、骨髓由来の細胞に発現していることが確認された。そして、Dectin-1 の欠損マウスを用いることにより、Dectin-1 の腸管免疫系での働きを確認した。デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)により大腸炎を誘導した結果、野生型マウスに比べ Dectin-1 欠損マウスでは大腸炎が抑制され、炎症を抑制する制御性 T 細胞が Dectin-1 欠損マウスにて増加していることが明らかとなった。制御性 T 細胞増殖の原因を解明するため、腸管免疫系に影響を及ぼすことが報告されていることから、腸内細菌叢の同定を試みた。糞便中の 16S rDNA を次世代シーケンサーにより解析した結果、Dectin-1 欠損マウスの糞便中では *Lactobacillus murinus* 14221 株(*L. murinus*)の大幅な増加が確認された。この菌株を無菌マウスにノトバイオードすると、大腸粘膜固有層にて制御性 T 細胞が増加していた。これらの結果から、Dectin-1 欠損マウスにて増殖した *L. murinus* が抑制性 T 細胞を誘導し、腸炎を抑制することが明らかとなった。

### *L. murinus* 制御メカニズム

次に Dectin-1 がどのように *L. murinus* を制御しているかを解析した。上皮細胞から産生される抗菌タンパクの発現に着目し、Dectin-1 欠損マウスの大腸上皮細胞に発現する抗菌タンパクを測定した結果、抗菌ペプチド S100A8 遺伝子の発現量が減少していることがわかった。そして、S100A8 は S100A9 とヘテロダイマー形成することで抗菌活性を示し、*L. murinus* の増殖を抑制することが *in vitro* の試験により明らかとなった。Dectin-1 の下流では種々のサイトカインの産生が知られていることから、腸管における Dectin-1 発現細胞へリガンドである  $\beta$ -glucan の刺激を加えると、IL-17F を誘導することが明らかとなった。さらに、IL-17F は Dectin-1 の粘膜固有層にて発現量、及び産生量が低下していることが確認された。

そして、種々のサイトカインが S100A8 を誘導するという報告から、*in vitro* 試験における腸管上皮細胞への抗菌タンパク誘導確認試験を実施した。結果、IL-22、IL-23、そして IL-17F が大腸上皮細胞の初代培養試験にて S100A8 の発現を誘導した。さらに、IL-17F を欠損させたマウスでは大腸上皮細胞における S100A8 の発現が低下し、糞便中の *L. murinus* の存在量が増加していることが明らかとなった。Dectin-1、IL-17F、S100A8 の関係性を示す実験として、腸管骨髓由来細胞を  $\beta$ -glucan で刺激し、その培養上清と大腸上皮細胞とをさらに共培養し S100A8 の発現を測定した。結果、Dectin-1、及び IL-17F 欠損マウス由来の腸管骨髓由来細胞では S100A8 の発現が低下していた。これらのことから、腸管骨髓由来細胞に発現する Dectin-1 を介して IL-17F の産生が誘導され、大腸上皮細胞の S100A8 の産生

が促進される。そして S100A8/S100A9 により *L. murinus* の増殖が制御されていることが明らかとなった。この結果は C 型レクチン受容体による腸内細菌叢制御機構を初めて明らかにするものであり、腸管恒常性維持システムの解明に繋がるものと推察される。

#### 経口摂取 $\beta$ -glucan による腸管恒常性維持機構

腸管には様々な物質や生物由来の  $\beta$ -glucan が存在する。Dectin-1 が腸管免疫系制御に働くことから、 $\beta$ -glucan の由来を探索することで、寄与が高い  $\beta$ -glucan を調整することで腸管恒常性を制御する可能性を期待した。 $\beta$ -glucan 合成酵素を有する細菌や腸内細菌が存在することから、その細胞壁表面を  $\beta$ -glucan 認識タンパクにて標識したが、いずれも  $\beta$ -glucan を検出することはできず、また無菌マウスと通常飼育マウスの S100A8 発現細胞に違いがないことから、細菌由来の  $\beta$ -glucan はこの制御機構に働かないことが判明した。通常マウス飼料には酵母が多量に含まれており、これはヒトがパンやキノコを食し  $\beta$ -glucan を経口摂取することと同義である。そこで、食物に含まれる  $\beta$ -glucan について検討するため、 $\beta$ -glucan を含まない飼料にてマウスを育成した。その結果、S100A8 の発現低下、*L. murinus* の増加、さらに Dectin-1 欠損マウスと同様に DSS 誘導大腸炎が抑制されることが明らかとなった。

上記の結果を総合し、経口摂取された  $\beta$ -glucan は腸管骨髄由来細胞に発現する Dectin-1 を介して IL-17F を誘導し、大腸上皮細胞の S100A8 の産生を促すことが示された。そして、S100A8/S100A9 により *L. murinus* の増殖が制御され、Dectin-1 欠損マウスでは制御性 T 細胞が増殖し大腸炎を抑制することが明らかとなった。経口摂取される  $\beta$ -glucan を制御することで、腸管恒常性を維持できるメカニズムが明らかとなった。これは食物による免疫システムの制御メカニズムを示唆するものであり、食品による健康増進が証明された。

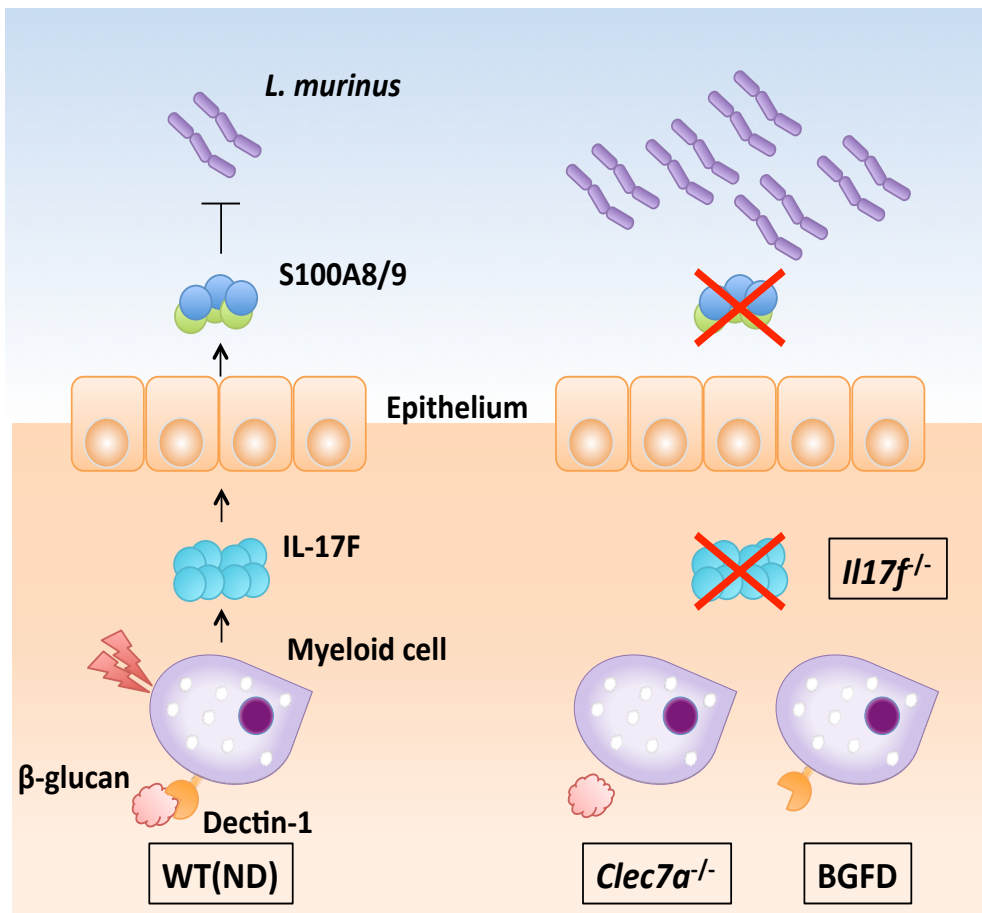


図. Dectin-1 を介したマウス腸内細菌叢制御機構模式図

通常飼料(ND; Normal Diet)飼育野生型マウス(WT; Wild-type)では骨髄由来細胞(Myeloid cell)に  $\beta$ -glucan が Dectin-1 を介して刺激を加える。刺激により産生された IL-17F が大腸上皮細胞(Epithelium)から S100A8 の産生を促し、*Lactobacillus murinus* 14221 株 (*L. murinus*) の増殖を制御している。Dectin-1 欠損マウス(*Clec7a*<sup>-/-</sup>)や  $\beta$ -glucan を含まない飼料(BGFD;  $\beta$ -glucan free diet)では IL-17F 産生の低下、また IL-17F 欠損マウス(*Il17f*<sup>-/-</sup>)も同様に、S100A8 の産生が低下し *L. murinus* が増殖する。