

博士論文

論文題目 大腸の恒常性維持における SP-D の役割

氏名 貴田（更級） 葉菜

# 目次

要旨 .....	3
1. 腸管の核酸認識経路の活性化に SP-D が与える影響 .....	4
1.1 序文 .....	4
1.2 結果 .....	11
1.2.1 糞便中の核酸による IRF3 依存的遺伝子群の誘導 .....	11
1.2.2 核酸による遺伝子誘導に SP-D が与える影響 .....	14
1.2.3 消化器系における SP-D 産生細胞の同定 .....	16
1.2.4 <i>Sftpd</i> <sup>-/-</sup> マウスにおける DSS 誘導性大腸炎の解析 .....	18
1.3 考察 .....	20
2. 腸内細菌叢を介した SP-D の腸炎抑制機構 .....	22
2.1 序文 .....	22
2.2 結果 .....	25
2.2.1 <i>Sftpd</i> <sup>-/-</sup> マウスにおける腸内細菌叢の解析 .....	25
2.2.2 <i>Sftpd</i> <sup>-/-</sup> マウスの大腸における <i>Clostridium</i> 属細菌に関連した抗炎症応答の解析 ..	27
2.3 考察 .....	29
本研究のまとめ .....	32
方法 .....	55
謝辞 .....	64
6. 略語一覧 .....	66
7. 引用文献 .....	68

## 要旨

腸内細菌叢は宿主の免疫系と密接に関わっており、その異常は腸炎をはじめ全身性の様々な疾患に繋がること指摘されている。当研究室の先行研究によって、腸管に存在する核酸が細胞質内核酸センサーを介して IRF3 を活性化することで腸炎を抑制することが判明していたが、細胞外の核酸が細胞質内へ輸送される機構は不明であった。本研究では、腸管において細胞外核酸の取り込みに関与する可能性がある分子としてサーファクタントプロテイン D (SP-D) に着目し、SP-D 遺伝子欠損マウスの解析を行った。その結果、胆嚢由来の SP-D が特定の腸内細菌の増殖を制御することで大腸の恒常性維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。

# 1. 腸管の核酸認識経路の活性化に SP-D が与える影響

## 1.1 序文

生体は様々な病原体に晒されているが、免疫系がそれらを「非自己」として認識して排除することで、生体の恒常性が維持されている。脊椎動物の免疫系は、自然免疫系と適応免疫系の異なる2つのシステムに大別されることが知られており、両応答系が連携することによって多様な病原体に対して迅速かつ効果的に免疫応答を活性化することができる<sup>1</sup>。マクロファージや樹状細胞といった免疫細胞は、病原体に共通する特徴的な構造（pathogen-associated molecular patterns, PAMPs）をパターン認識受容体（pattern recognition receptors, PRRs）を介して認識することで活性化され、IL-6 や TNF $\alpha$  といった炎症性サイトカインや I 型インターフェロン（I 型 IFN）などの遺伝子発現の誘導によって、感染等の初期応答に重要な役割を果たす<sup>2</sup>。また、この PRR 経路の活性化はサイトカイン産生とともに樹状細胞の成熟化を誘導することによって、T 細胞や B 細胞等の適応免疫系の活性化をも引き起こす<sup>3-5</sup>。さらに、活性化した適応免疫系は病原体に特異的な分子構造を認識し、病原体や宿主の感染細胞をより特異的に攻撃するだけでなく、自然免疫系をさらに増強し、両免疫系の連携によって病原体を効果的に排除する<sup>6</sup>。このように、自然免疫系と適応免疫系は、緻密なネットワークを構築して協調的に作用し、多種多様な外来の非自己に対して応答する重要

な防御機構である。一方で最近の研究では、内在性の自己細胞由来分子に対しても免疫系が様々な応答をすることが判明しつつあり、その制御系の破綻は、自己免疫疾患や炎症性疾患等、様々な疾患の原因になることが報告されている<sup>7-9</sup>。

免疫系は、外来性の非自己である病原体や内在性の自己分子に加えて、内在性の非自己である腸内細菌叢に対しても応答することが分かっている<sup>10-12</sup>。非常に興味深いことに、100兆個以上もの細菌から構成される腸内細菌叢は、非自己でありながら免疫系による排除を免れて宿主と共生しており、通常は重篤な炎症反応や臓器傷害を惹起しない<sup>13</sup>。それは腸内で高度な免疫寛容が成立しているからであり、この制御機構の破綻は炎症性腸疾患の原因となることが知られている<sup>14,15</sup>。一方で、腸内細菌叢の存在は、全免疫細胞の70-80%が存在すると言われる腸管内の免疫細胞を一定のレベルに活性化させておくためにも重要であり<sup>16</sup>、腸内細菌叢が存在しない無菌マウスでは全身性の様々な免疫応答の活性化に異常が生じることが分かっている<sup>17</sup>。そのため、腸内細菌叢は免疫寛容の誘導と免疫応答の活性化の両面から全身の免疫応答を制御する非常に重要な内在性因子として注目され、近年急速に研究が進められている<sup>18</sup>。特に最近では16s rDNAメタゲノム解析技術を用いることで、これまで検出できなかった細菌叢全体の網羅的な解析が可能になり、ヒト常在細菌の全貌解明が推進され、炎症性腸疾患や食物アレルギー、がん、さらには精神神経疾患などに関連する特定の細

菌種も見出されている<sup>19-24</sup> (表 1)。これらの疾患の中でも炎症性腸疾患であるクローン病や潰瘍性大腸炎は、世界的に患者が増加し続けている極めて重要な疾患であり、腸内細菌叢との関連が特に強く示唆されていることから、腸内細菌叢の正常化に焦点を当てた治療法等の開発が進んでいる<sup>25,26</sup>。しかしながら、炎症性腸疾患が発症する分子機構については未だ不明な点が多く残されており、治療法の確立には至っていない<sup>26</sup>。

表 1

疾患	発症に関連する細菌 (増減)	参考文献
クローン病	<i>Fusobacterium prausnitzii</i> (↓)	19
潰瘍性大腸炎	<i>Fusobacterium varium</i> (↑)	20
	<i>Bacteroides ovatus</i> (↑)	21
食物アレルギー	<i>Clostridium</i> clusters XIVa, XIVb, IV (↓)	22
肝臓癌	<i>Clostridium</i> cluster XI (↑)	23
自閉症スペクトラム障害	<i>Bacterioides fragilis</i> (↓)	24

腸内細菌叢と炎症性腸疾患の関係についてはマウスモデルを用いた解析を中心に研究が行われており、無菌マウスや抗生物質を投与されたマウスでは腸炎が悪化するなど、腸内細菌叢が腸炎の抑制に重要であることが明らかになっている<sup>27,28</sup>。腸内細菌由来の分子は Toll-like receptors (TLRs)、Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors (RLRs)、Stimulator of IFN genes protein (STING)、Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein (NOD) -like receptors などの自然免疫受容体に認識されて複

数のシグナル経路を活性化させると考えられる<sup>18,29-31</sup>。これらの受容体経路の中でも、RLRsは腸炎の抑制に重要であり、RLRsのひとつであるRIG-I欠損マウスは大腸炎を自然発症することが分かっている<sup>32</sup>。また、鞭毛のフラジェリンタンパク質によるTLR5シグナルの活性化も、IL-22の産生誘導や腸内細菌叢の正常化を介して腸炎を抑制することが知られている<sup>33,34</sup>。

一方で、病原体に対する免疫応答において上記受容体の下流で誘導されることが分かっているサイトカインが、腸内においては腸炎の抑制に関与するケースが報告されている。すなわち、I型IFNは腸管上皮細胞におけるSTAT3の活性化を介してバリア機能を亢進させることが知られており<sup>35</sup>、また、マウスへのリコンビナントIFN $\beta$ の投与は腸炎を改善することも報告されている<sup>36</sup>。さらにI型IFNの受容体サブユニットであるIFNARの欠損マウスではdextran sodium sulfate (DSS) 誘導性大腸炎が悪化することも明らかになっており、腸炎の抑制におけるI型IFNシグナルの重要性が示されている<sup>37</sup>。さらにI型IFNの他にも、IL-10、IL-33、thymic stromal lymphopoietin (TSLP)などのサイトカインを欠損したマウスでは腸炎の増悪や回復の異常が生じることが知られている<sup>38-40</sup>。しかしながら、このように腸内において腸炎抑制に関わるサイトカインやパターン認識受容体が個別に特定される一方で、それらの関係や制御機構については明らかにされていなかった。

このような背景から、当研究室では I 型 IFN および IL-33 を誘導することが分かっていた RLRs 経路に着目し<sup>41,42</sup>、その下流で活性化される転写因子の中でも特に重要な Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3) を中心に<sup>41</sup>、腸炎の制御機構を解析した。その結果、IRF3 欠損マウス (*Irf3*<sup>-/-</sup> マウス) では DSS 誘導性大腸炎に対する感受性が高く、腸炎からの回復に重要なサイトカインである TSLP や IL-33 の産生が著明に減弱していることが明らかになった。また、無菌マウスの糞便を用いた解析からは、腸内細菌由来の分子が IRF3 を介して TSLP や IL-33 を誘導することも示された。さらに、IRF3 の上流の分子をノックダウンしたマウス胎仔由来線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) を糞便懸濁液で刺激した際のサイトカイン誘導を検討したところ、興味深いことに細胞質内に存在する RNA 認識受容体のアダプター分子である Mitochondrial antiviral-sensing protein (MAVS) と細胞質内 DNA センサーである STING をノックダウンした際に TSLP や IL-33 の誘導が抑制されるということも判明した<sup>43</sup>。これらの研究結果から、腸内細菌由来の核酸が細胞質に取り込まれ、核酸センサーおよび IRF3 を介した大腸炎抑制機構を活性化することが示唆された。細胞外の核酸が細胞表面やエンドソームに存在する TLR 等を活性化することは知られているが<sup>44</sup>、腸管でこれらの核酸を細胞質内にまで到達させる宿主の機構は知られていない (図 1)。



核酸を細胞質内へ輸送する働きを持つ内因性の分子としては、これまでに LL-37 とサーファクタントプロテイン D (Surfactant protein D, SP-D) が報告されている<sup>45,46</sup>。

LL-37 はヒトの白血球や上皮系細胞に発現するペプチドで、細胞質内への核酸取り込みを促進することが知られており、乾癬、関節リウマチ、SLE の病態増悪との関連が報告されている一方で<sup>47-49</sup>、腸炎に対しては抑制的に働くことが知られている<sup>45,50</sup>。

しかしながら、LL-37 のマウスホモログである cathelicidin-related antimicrobial peptide (CRAMP) は核酸の取り込みを促進しないことが報告されており<sup>51</sup>、マウスの腸管で核酸の取り込みに関与することを示唆する報告もない。一方で、SP-D はⅡ型肺胞上皮細胞に発現するタンパク質として単離され、現在も間質性肺炎のマーカーとして広く用いられている分子である<sup>52</sup>。SP-D は内部にコラーゲン構造を有する C 型レクチン (コレクチン) であり、細菌やウイルスに結合して宿主を感染から防御する作用のほか、肺胞マクロファージへの核酸の取り込みを促進する作用がマウスで報告されている<sup>46</sup> (図 2)。そのため SP-D 欠損マウスでは、肺における二本鎖 DNA のクリアランスが正常に行われず、二本鎖 DNA に対する自己抗体の産生が亢進することも示されている<sup>46</sup>。さらに、SP-D はマウスの腸管で発現することが報告されており<sup>53</sup>、ヒト大腸炎との関連においても潰瘍性大腸炎の患者が SP-D の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) を持つことが分かっている<sup>54,55</sup>。このような過去の報

告から、私は腸管において核酸の細胞質への取り込みに SP-D が関与するという仮説を立て、*in vitro*、*in vivo* で検証を行うこととした。

## 1.2 結果

### 1.2.1 糞便中の核酸による IRF3 依存的遺伝子群の誘導

当研究室での先行研究から、糞便懸濁液が IRF3 の活性化を引き起こし、TSLP や IL-33 の転写を亢進することで腸炎を抑制することが示された。さらに、IRF3 の上流分子をノックダウンした MEF を用いた検討から、細胞質内受容体による外来核酸の認識に必須の MAVS および STING が糞便懸濁液による遺伝子誘導にも必要であることが明らかになり、糞便懸濁液に含まれる核酸が細胞質内核酸認識受容体経路を介して大腸炎を抑制することが示唆されていた<sup>43</sup>。腸管には常在細菌のほか、宿主の腸管上皮死細胞や食物残渣も含まれるため、様々な種類の核酸が存在すると推定されるが、報告されているいずれの核酸も何らかの輸送機構の補助なしには細胞質内の核酸認識受容体経路を活性化できないことが分かっている<sup>56,57</sup>。そのため、腸管内には核酸を細胞質に輸送する機能をもった未知の因子が存在することが予想された。

先行研究では、糞便懸濁液が細胞質内核酸認識受容体経路を活性化することから、間接的に腸内核酸の重要性が示唆されたが、腸内核酸の免疫性を直接解析してはならず、糞便懸濁液中の未知の非核酸リガンドが RIG-I 等を活性化する可能性を除外できない状況であった。そこでまず、糞便中の核酸が IRF3 を介した遺伝子誘導に重要で

あることを確かめるため、野生型 (wild type, WT) マウスの糞便懸濁液をヌクレアーゼで処理し、MEF における *Tslp* mRNA と *Ii33* mRNA の発現誘導を解析した。ここで用いたヌクレアーゼは、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA を分解する DNase I、一本鎖 RNA を分解する RNaseA、DNA と RNA の両方を分解する Benzonase の 3 種類である<sup>58,59</sup>。その結果、興味深いことにいずれのヌクレアーゼで糞便懸濁液を処理しても *Tslp* mRNA の発現量は変化しなかった。一方で、*Ii33* mRNA に関しては、DNase I と Benzonase で糞便懸濁液を処理した場合にそれぞれ約 5 割の発現抑制が観察されたが、完全な発現抑制には至らなかった (図 3.1)。

核酸は他のタンパク質と結合した状態にあるとヌクレアーゼに対して耐性を示すことが知られていることから<sup>60</sup>、私は糞便中の核酸が細胞内への取り込みを促進する他の分子と複合体を形成しており、それがヌクレアーゼ処理に対する抵抗性の獲得にも繋がっているのではないかと考えた。そのため、糞便に含まれる核酸が IRF3 を活性化する際に、核酸単独で活性化できるか、もしくはリポフェクタミンによる細胞内への導入が必要かどうかを検証するため、WT マウスの糞便から抽出した核酸によって MEF を刺激し、*Tslp* mRNA および *Ii33* mRNA の発現誘導を解析した。その結果、核酸単独では *Tslp* mRNA と *Ii33* mRNA は誘導されず、核酸をリポフェクションによって細胞質内へ導入した際に、用量依存的に *Tslp* mRNA と *Ii33* mRNA が誘導された

(図 3.2)。この結果より、糞便中に含まれる核酸自体にはサイトカイン誘導能はあるが、誘導を活性化するにはさらに核酸を細胞質内へ輸送する機構が必要であり、そのような未知の機構が糞便中に存在することが示唆された。

## 1.2.2 核酸による遺伝子誘導に SP-D が与える影響

最近の報告では STING が腸炎の抑制に関わることが示されており<sup>61</sup>、先行研究においても MAVS よりも STING の方がより糞便懸濁液による遺伝子誘導に重要であることが示されている。そのため本解析では STING を活性化させる核酸刺激を用い、SP-D によって細胞への取り込みが促進されるかどうかを検討した。細胞質内核酸センサーを介して間接的に STING を活性化させるものとしては B 型 DNA (B-DNA) が<sup>62</sup>、また直接的な STING のリガンドとしては c-di-GMP (cyclic di-GMP) と 3'-3' cGAMP (cyclic GMP-AMP) が報告されている<sup>63</sup>。B-DNA はゲノム DNA が形成する一般的な構造であり、一方、c-di-GMP および 3'-3' cGAMP はともに細菌が産生するセカンドメッセンジャーである<sup>64,65</sup>。そのため、これらは腸内に多量に存在することが示唆され、かつ、いずれも STING-IRF3 を介した I 型 IFN の産生を促進することが分かっている<sup>66</sup>。しかしながら一方で、STING リガンドの研究はカチオン性脂質を利用したリポソーム法などによって解析されており、生理的にリガンドを輸送する機構については良く分かっていない<sup>67</sup>。上述の理由から生理的な核酸輸送機構を担う分子として SP-D に着目し、解析を行った。まず、WT マウスの MEF に上記 3 つのリガンドと SP-D の共刺激を行い、STING-IRF3 経路の活性化の指標として *Ifnb* mRNA を測定したところ、SP-D は c-di-GMP や 3'-3' cGAMP による *Ifnb* mRNA の誘導を顕著

に増強することが明らかとなった。同じ検討を WT マウスの腹腔滲出細胞 (PEC) でも行ったが、同様の結果を得た (図 4.1)。一方で、興味深いことに SP-D は B-DNA による *Ifnb* mRNA 誘導を増強しなかった (図 4.1)。また、STING 欠損マウス (*Tmem173*<sup>-/-</sup> マウス) から採取した PEC を用いて同様の実験を行ったところ、STING 欠損細胞では c-di-GMP による *Ifnb* mRNA の誘導が全く起こらず、SP-D を添加しても *Ifnb* mRNA は産生されなかった (図 4.2)。これらの結果より、SP-D は c-di-GMP や 3'-3' cGAMP といったサイクリックジヌクレオチドの細胞質内への取り込みを促進し、STING-IRF3 経路を介した遺伝子誘導を増強することが示された。糞便中でも同様の現象が起きており、c-di-GMP および 3'-3' cGAMP が SP-D 依存的遺伝子誘導に関与すると仮定すると、前項の検討で明らかとなった糞便懸濁液のヌクレアーゼ抵抗性についても説明することができる。

### 1.2.3 消化器系における SP-D 産生細胞の同定

上記の検討から SP-D が細胞レベルで STING リガンドの取り込みを促進することが示されたため、さらにマウス個体レベルにおける SP-D の役割を検討することとした。SP-D は肺以外にも、消化管を含む全身の様々な組織で発現することがヒトとマウスで報告されているが<sup>68,69</sup>、これらは半定量 PCR あるいは免疫染色による解析であり、マウスの腸管における SP-D の遺伝子発現を定量的に解析した報告はこれまでにない。そこでまず、WT マウスの各組織を比較対象として腸における *Sftpd* mRNA の発現を qRT-PCR 法にて解析した。その結果、これまでの報告と一致して消化管で *Sftpd* mRNA が検出されたものの、そのレベルは相対的に極めて低いものであった。一方で興味深いことに、胆嚢において極めて高いレベルの *Sftpd* mRNA の発現が確認された (図 5.1A)。また、*Sftpd* mRNA は単離した胆嚢上皮細胞で発現する一方、胆嚢の粘膜固有層ではほとんど発現しないことも判明した (図 5.1B)。SP-D は分泌タンパク質であるため、胆嚢上皮細胞によって産生された SP-D が胆汁中に分泌される可能性が考えられた。そこで、マウスの胆嚢から胆汁を採取し、胆汁中の SP-D 濃度を ELISA で定量したところ、WT マウスの胆汁中には約 20 ng/ml-100 ng/ml という高レベルの SP-D が存在することが明らかになった (図 5.2)。以上の結果より、SP-D は WT マウスの胆嚢上皮細胞で高発現し、胆汁中に分泌されていることが示された。



摂食刺激は胆嚢を収縮させ、胆汁を腸管内へ分泌させることから<sup>70</sup>、胆汁中に含まれる SP-D が腸管内へ流入しているかどうかを検討した。まず、糞便懸濁液中の SP-D について ELISA 法による定量を試みたところ、WT マウスと SP-D 欠損マウス両者のサンプルで同程度の高い値を示し、正確な濃度測定ができなかった。糞懸濁液には様々な可溶および不溶成分が含まれているため、それらが ELISA plate の表面に非特異的に結合し、SP-D 濃度の測定を著しく妨げていると考えられた。そこで ELISA 法による測定を断念し、WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの糞便懸濁液を用いて SP-D の免疫沈降を行い、ウエスタンブロットによって SP-D を検出した。この際、WT マウスの胆汁は界面活性作用が強くウエスタンブロットに用いることができなかったため、陽性対照にはマウスリコンビナント SP-D を使用した。その結果、WT マウスの糞便懸濁液からは SP-D が検出された (図 5.3)。この結果より、SP-D は腸管での発現は非常に低いものの、胆嚢由来の SP-D が胆汁によって腸管へ運ばれていることが示唆された。

## 1.2.4 *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスにおける DSS 誘導性大腸炎の解析

### 1.2.4.1 *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスにおける DSS 誘導性大腸炎の悪化

これまでの検討より、SP-D が STING リガンドの取り込みを促進して遺伝子誘導を活性化させること、また腸管に SP-D が存在することが明らかになり、SP-D が STING を介したサイトカイン産生を増強することで大腸炎を抑制する可能性が示唆された。そこで次に、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスを用いて DSS 誘導性大腸炎モデルを作製し、*in vivo* における SP-D の役割について検討した。本研究で使用した *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスは NIH Swiss black で作製され<sup>71</sup>、FVB とのバッククロスにより維持されてきたものである。マウスは系統によって DSS に対する感受性が異なることが知られており<sup>72</sup>、FVB の DSS 由同性大腸炎モデルは 3-4% DSS 投与により作製されることが多いため<sup>73-75</sup>、本検討でも 3.5% DSS を投与することとした。実験開始前、無刺激状態では WT マウスも *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスも腸炎を自然発症することはなく、両マウスに顕著な体重差は見られなかった。3.5%の DSS を 8 日間投与したところ、WT マウスの体重は実験開始後 8 日目までに約 5%減少し、その後回復を示した。一方 *Sftpd*<sup>-/-</sup>マウスの体重は実験開始後 8 日目までに約 10%減少し、DSS 投与中止後も体重減少が継続した (図 6.1)。大腸炎の指標として実験開始前と実験開始後 8 日目の大腸の長さを比較したところ、WT マウスでは約 11%短縮したのに対して *Sftpd*<sup>-/-</sup>マウスでは約 36%の短縮が見られた

(図 6.2A)。同じく実験開始後 8 日目の大腸病理切片では、*Sftpd*<sup>-/-</sup>マウスで顕著な大腸上皮細胞の脱落と炎症細胞の浸潤が観察された(図 6.2B)。これらの結果から、SP-D が腸炎の抑制に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

#### 1.2.4.2 *Sftpd*<sup>-/-</sup>マウス腸管における大腸炎抑制性遺伝子の発現解析

さらに、SP-D による腸炎の抑制機構について解析した。まず、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスで見られた大腸炎の悪化が IRF3 依存性の遺伝子群の発現レベルの差によるものなのかどうかを検討した。定常状態のマウス大腸における *Ifnb* mRNA の発現を qRT-PCR 法により解析したところ、WT マウスと *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの間に有意な差は見られなかった。また、*Tslp* mRNA および *Il33* mRNA の発現に関しても、両マウスの間に有意な差は見られなかった(図 6.3)。これらの結果から、今回観察された *Sftpd*<sup>-/-</sup>マウスにおける大腸炎の悪化が、少なくとも STING-IRF3-TSLP/IL-33/IFN $\beta$ シグナルの異常ではないことが示唆された。すなわち、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスで見られる大腸炎の悪化と、*in vitro* で観察された SP-D による核酸を介した遺伝子誘導の増強機構との間には関連が無いことが示唆され、SP-D の別の機能が大腸炎を抑制していると考えられた。

### 1.3 考察

当研究室の先行研究により、腸内細菌由来の核酸が細胞質内核酸認識受容体経路を介してIRF3を活性化させることが大腸炎の抑制に繋がることが示されていた。そこで腸管における核酸の取り込み機構の解明を目的とし、SP-Dに着目して解析を行ったところ、図 3.1 で示したように、細胞レベルの解析においては、SP-D が細胞質内の STING 経路の活性化を増強するという結果を得た。この結果は、今まで報告されている SP-D の機能から予測されるものであるが、SP-D によって取り込みが増強されることの意義として、自然免疫受容体経路の活性化が起こることを示したのは本研究が初めてである。細胞レベルの解析結果を受け、SP-D 欠損マウスの解析をさらに推進したところ、予想していた通り、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスは腸炎に対する感受性が高いことが明らかになった(図 6.1、図 6.2)。しかしながら、その分子機構については、予想外の興味深い結果が得られた。すなわち、SP-D 欠損マウスの大腸において、*Ifnb*、*Il33*、*Tslp* の発現量は正常であることから、生体レベルでは SP-D が細胞質内核酸認識受容体経路の活性化を増強しないことが明らかとなり、核酸輸送や *Il33* 等の遺伝子誘導に依存しない別の機構によって腸炎が制御されていることが示唆された(図 4.3)。

*in vitro* の解析と *in vivo* の解析でこのような相違が生じた原因として、以下 2 つの可能性が考えられる。1つ目は、*in vitro* の実験で用いた細胞の種類である。すなわち、腸管組織において、管腔側に位置し腸内細菌の刺激を最も受けやすいのは上皮細胞であるが、腸

管上皮細胞は安定した培養が困難であったことから、本研究では *in vitro* で糞懸濁液や STING リガンド刺激を行った実験に MEF と PEC を用いた。そのため、これらの実験系が生体内の環境を適切に反映できていなかった可能性がある。2015 年には腸管上皮幹細胞の培養法も確立され、基底状態の腸管上皮細胞を用いた検討も容易になってきていることから<sup>76</sup>、今後、腸管上皮細胞を用いた検討を行うことにより、腸管内で核酸の輸送に関する分子の同定が可能になると考えられる。2 つ目は、STING を活性化させる物質として実験に用いた核酸試薬の種類である。本研究では、STING のリガンドとして、腸管内に豊富に存在することが示唆される細菌由来の 2 種類のサイクリックジヌクレオチドを用いた。しかしながら、通常の腸管では杯細胞から分泌される粘液が宿主と腸内細菌を隔てており、宿主細胞への細菌の接触は限られている。そのため、細菌が産生する STING のリガンドよりも、宿主細胞に由来する核酸や、宿主細胞が DNA 刺激を受けたときに産生される STING リガンドである 2'-3' cGAMP<sup>63</sup> を用いた方が *in vivo* と一致する結果を得られていた可能性がある。

本研究では *in vitro* の実験で SP-D が核酸認識受容体経路の活性化を引き起こすことを明らかにしたが、その生理的重要性については解明できず、少なくとも「SP-D による核酸輸送機構が腸炎を抑制する」という仮説は否定された。しかしながら、SP-D 欠損マウスは DSS 誘導性大腸炎に高い感受性を示すという興味深い実験結果が得られており、SP-D が核酸の取り込み促進以外の機構により大腸の恒常性維持に寄与している可能性が示された。

## 2. 腸内細菌叢を介した SP-D の腸炎抑制機構

### 2.1 序文

前章の結果より、SP-D は核酸の取り込みや IL-33 等の遺伝子誘導の活性化とは別の機構でマウスの DSS 誘導性腸炎を抑制していることが示唆された。SP-D は肺サーファクタントの構成タンパク質として 1989 年に同定され<sup>77</sup>、肺での機能を中心に解析が進められてきた。同定の経緯に反してその界面活性作用は比較的弱いものの、肺における感染防御に重要な役割を果たしており、肺胞マクロファージへの核酸の取り込みを促進して異物を処理するほか、インフルエンザ A ウイルスや *Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus* といった様々な病原微生物に結合し、それらの増殖を制御したり、排除を促進したりすることが知られている<sup>78-81</sup>。さらに、2000 年代に入ると SP-D が全身性に発現することが確認され、角膜や尿管でも肺と同様の機構で感染防御に寄与することが報告された<sup>82,83</sup>。SP-D は核酸の取り込み以外の機能のほか、グラム陰性細菌、グラム陽性細菌、マイコバクテリウム、ウイルスなど様々な病原体に結合し、それらの増殖を制御することが知られている<sup>78</sup>。そのため前章の結果に基づけば、胆汁とともに腸管へ分泌された SP-D が腸内細菌の増殖にも影響し、腸内細菌叢の組成を変化させる可能性が考えられる。

腸内細菌叢と免疫に関する研究の歴史は古く、無菌動物を用いた解析から、1960 年代には既に腸内細菌叢が免疫系の活性化に関与することが明らかにされている<sup>84</sup>。

その後、細菌培養法の確立によって腸内細菌の系統的な解析が行われるようになり、腸内細菌と疾患の関係が精力的に研究された。1980年代には細菌の16SリボソームRNA（16s rRNA）遺伝子をターゲットとする細菌解析法が登場し、その後、それまで培養不可能だった腸内細菌の存在が明らかになった。同時に腸内細菌の全体像の解明が進み、腸内細菌叢の変化が腸炎の感受性に大きく影響することも明らかになった<sup>85</sup>。

炎症性腸疾患の患者や動物モデルの腸内細菌では、*Bifidobacterium* 属細菌や *Lactobacillus* 属細菌が減少していることが知られている<sup>17</sup>。これらの細菌は病原性細菌の接着や侵入を防いだり、宿主の免疫機構やバリア機能を改善したりすることで腸炎を抑制すると考えられており、プロバイオティクスとして市販の食品でも利用されている<sup>86</sup>。しかしながらプロバイオティクスは炎症性腸疾患の根本的な治療法とはなっておらず、これらの細菌の腸炎抑制効果に関しては不明な点も多い。さらには、ある種の *Lactobacillus* 属細菌は腸炎を悪化させることや<sup>87</sup>、プロバイオティクスの摂取で *Lactobacillus* 菌血症を発症した例も報告されており<sup>88</sup>、特定のプロバイオティクスの摂取が腸炎を悪化させる可能性があることも示されている。

一方で、炎症性腸疾患の患者においては、腸内細菌叢全体に占める *Clostridium* 属細菌 cluster4、cluster14a の割合が減少していることも報告されている<sup>89</sup>。これらの

*Clostridium* 属細菌は、腸炎の抑制に重要な役割を果たす制御性 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) の誘導を引き起こすことが知られており、ヒトとマウスでは Treg を誘導する *Clostridium* 属細菌も分離、同定されている<sup>90,91</sup>。

これらの背景から、腸管に存在する SP-D が常在細菌の増殖を制御することで腸管免疫を調節している可能性が考えられるため、本章では SP-D 欠損マウスの腸内細菌叢について解析を行った。



## 2.2 結果

### 2.2.1 *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスにおける腸内細菌叢の解析

SP-D 欠損マウスの腸内細菌叢について網羅的に解析するため、WT マウスまたは *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの糞便を採取し、DNA を抽出した。この際、ケージごとの腸内細菌のばらつきが実験結果に影響しないようにするため<sup>92</sup>、それぞれの遺伝子型につきランダムに 4-5 ケージを抽出した。得られた DNA を鋳型として、細菌間で保存されている配列に対して設計したプライマーを用いて 16s rDNA の可変領域を PCR 増幅し、それらの配列についてシーケンス解析を行った。このようにして得られた結果（リード）について、一定値以上の相同性を持つ配列同士をクラスタリングし、operational taxonomic unit (OTU) を作成した。その結果、リード 3000 個あたりの OTU 数は *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスで有意に減少しており、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスでは腸内細菌叢のバリエーションが少ないことが示唆された(図 7.1)。続いて作成した OTU の代表配列を Ribosomal Database Project (RDP) に登録されている単離菌由来の 16S 配列と比較し、菌種帰属の推定を行った。その結果、WT マウスと *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスでは門レベルでの菌組成には有意差が無いことが判明した(図 7.2)。さらに、Unifrac 解析 (weighted) を用いて WT マウスと *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの菌叢構造全体の比較を行った。この解析は、OTU の代表配列を用いて作成される系統樹データと配列数データから、2 サンプル間の菌組成の相違度

を距離 (Unifrac Distance) として表すものである<sup>93,94</sup>。その結果、WT マウス-*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウス間の Unifrac Distance が *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウス-*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウス間の Unifrac Distance よりも有意に大きく、WT マウスと *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの間には腸内細菌の菌叢構造に差異があることが示唆された (図 7.3)。また、OTU 解析を行って WT マウスと *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの腸内細菌の違いを詳細に調べると、WT マウスと比較して *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスで *Lactobacillus* 属の細菌が顕著に増加していることが明らかになり (図 7.4A)、特に *Lactobacillus murinus* の増加が顕著であった。逆に *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスでは *Clostridium* 属の細菌が減少していることも示唆された (図 7.4B)。

さらに、WT マウスと *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスで有意差が見られた常在細菌として図 7.3B でリストアップされた細菌のうち、*Clostridium* 属に分類される細菌について系統樹解析を行ったところ、全ての細菌が制御性 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) を誘導することが知られている cluster4 あるいは cluster14a のいずれかに属することも明らかになった (図 7.5)。これらの結果から、SP-D が *Clostridium* 属細菌の定着に関与し、腸炎の抑制に関わる可能性が示唆された。

## 2.2.2 *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの大腸における *Clostridium* 属細菌に関連した抗炎症応答の解析

### 2.2.2.1 *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウス大腸における Treg の割合

腸内細菌叢の OTU 解析の結果から、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスでは *Clostridium* 属細菌が顕著に減少していることが示唆された。これらは Treg の誘導に重要な役割を果たすことが知られていることから<sup>90</sup>、さらに *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの腸における Treg の割合について検討した。WT マウスと *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスから大腸粘膜固有層細胞を単離し、CD4 および Treg 特異的に発現している Forkhead box P3 (Foxp3) 陽性細胞を FACS により解析した。その結果、CD4 陽性細胞中に占める Foxp3 陽性 Treg の割合が WT では約 19% であったのに対し *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスでは約 14% にまで減少していた。(図 8.1)。この結果から SP-D は腸内細菌叢の制御を介して Treg の誘導に関与することが示唆された。

### 2.2.2.2 *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの大腸における IL-22、RegIIIβ の発現

腸内では、粘膜固有層に存在する自然リンパ球 (innate lymphoid cells, ILC) のグループ 3 (ILC3) や Th17 が IL-22 を産生することが分かっている<sup>95</sup>。IL-22 は腸管上皮細胞における mucin の産生や抗菌ペプチド RegIIIβ の産生を介して腸炎のバリア機能を亢進させることが知られており<sup>96</sup>、実際、遺伝子発現ベクターを用いて IL-22 をマウスの腸管で発現させると DSS 腸炎が抑制されることも明らかになっている<sup>97</sup>。昨

年の報告により、*Clostrisium* 属の細菌が腸管における IL-22 や RegIII $\beta$  の産生を誘導することが示され<sup>22</sup>、この機構が *Clostrisium* 属細菌による腸炎抑制の一端を担っていることが示唆された。そこで前節で示された *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスにおける *Clostridium* 属細菌の減少が IL-22 および RegIII $\beta$  の発現レベルに影響しているかどうかを検討するため、WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの大腸から粘膜固有層細胞と上皮細胞を単離して RNA を抽出し、qRT-PCR 法を用いて *Il22* mRNA、*Reg3b* mRNA の発現量を解析した。

その結果、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの大腸粘膜固有層細胞における IL-22 の発現は、WT マウスと比較して 6 割程度まで減弱していることが明らかになった。また、大腸上皮細胞における *Reg3b* mRNA に関しても、WT マウスと比較して 6 割程度まで減弱していることが明らかになった (図 8.2)。図 8.1 の結果と合わせて、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの大腸では、*Clostridium* 属細菌の減少と一致し、Treg の減少と IL-22、RegIII $\beta$  の発現レベルの低下が見られたことから、これらの異常が複合的に働き、腸炎への感受性を増大させていると考えられた。

## 2.3 考察

SP-D の研究は肺から始まり、他の器官での研究も発展しつつあるが、未だ病原性微生物に対する感染防御機構が研究の主流であり、感染防御以外の生理的重要性についてはあまり解析が進んでいない。本研究では SP-D の解析を推進したことで、胆嚢上皮細胞を SP-D の高産生細胞として同定し、さらにそこから腸管へ放出された SP-D が果たす全く新しい生理的機能として、SP-D による腸内細菌叢を介した腸炎抑制機構を発見した。本研究成果は SP-D の全く新しい生理的重要性を解明し、学術的に重要な情報を提供するものと考えられる。また、腸内細菌叢は全身の免疫応答を制御し、様々な全身性の疾患と関わることから、今後、SP-D と全身性の様々な疾患との関係について、さらに研究が発展していくと思われる。本研究はそのような大きな発展に繋がるブレークスルーとして、非常に重要な研究成果をもたらしたと考えられる。

図 7.1-図 7.5 で示されたように、SP-D が腸内細菌叢の制御に関与し、特に *Lactobacillus* 属と *Clostridium* 属の細菌の増殖に影響を与えていることが分かった。しかしながら、SP-D が *L. murinus* の増殖を抑制する一方で *Clostridium* 属細菌の増殖を促進する分子機構については今回の検討で明らかにすることができなかった。SP-D は特定の病原体の増殖を抑制することが報告されているが、微生物の増殖を促進するという報告はないことから、SP-D が直接影響を及ぼしているのは *L. murinus* の増殖であり、その結果、二次的な影響で

*Clostridium* 属細菌の増殖が抑制された可能性が考えられる。この仮説と一致する報告として、偽膜性大腸炎の原因細菌である *Clostridium difficile* を用いた研究において、*Lactobacillus* 属の細菌が *C. difficile* の増殖を抑制することが明らかにされている<sup>98</sup>。本研究において *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスにおける減少が示唆された *Clostridium* 属細菌 (cluster4、cluster14a) と *C. difficile* が同様の挙動を示すかについては、今後、詳細に検討する必要がある。SP-D による常在細菌の制御機構を明らかにすることができれば、腸内細菌叢の異常 (dysbiosis) によって引き起こされる他の様々な疾患の治療への応用も期待できることから、本件は重要な検討課題であると考えられる。

一方で、本研究で得られた結果とは逆に、*L. murinus* の増加が Treg の誘導を促進して腸炎を抑制することが最近報告された<sup>99</sup>。この論文において著者らは、*Clec7a*<sup>-/-</sup> マウスでは *L. murinus* が増加しており、DSS 誘導性大腸炎に対して抵抗性を示すこと、また無菌マウスの腸管へ定着させた *L. murinus* が Treg を誘導することを明らかにし、*L. murinus* が腸炎を抑制すると結論づけている。*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウス、*Clec7a*<sup>-/-</sup> マウスで見られた *L. murinus* の増加がなぜこのように逆の表現型をもたらすのかということに関しては不明であるが、その原因のひとつとして *Lactobacillus* 属細菌全体が占めるニッチの違いが考えられる。すなわち、本研究では *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスは WT マウスと比較して約 2 倍の *Lactobacillus* 属細菌を有することが示されたが、*Clec7a*<sup>-/-</sup> マウスでは WT マウスと比較して約 6 倍の *Lactobacillus* 属細菌を有するこ

とが明らかになっている。従って、*Sftpd*<sup>-/-</sup>マウスでは *Lactobacillus* 属細菌の増加よりも *Clostridium* 属細菌の減少が腸炎に対してより大きく影響した結果、腸炎が悪化した可能性が考えられる。両マウスにおける腸炎の表現型の違いは、*L. murinus* 以外の細菌による影響や *L. murinus* の株の違いに加え、マウスの系統など宿主側の要因も含めて慎重に今後さらに検討するべきである。

本研究では胆汁中に分泌された SP-D が腸管で腸内細菌叢の増殖に影響を与えて腸炎を抑制することが示されたが、胆汁酸自身も腸炎の制御を行うことが報告されている<sup>100</sup>。この報告では食餌中の脂肪が胆汁酸の組成を変化させて *dysbiosis* を引き起こす結果、腸内細菌が産生する硫化水素や二次胆汁酸により腸管のバリア機構が破綻することを示している。腸管循環により十二指腸に分泌された胆汁酸のうち 95%が回腸で再吸収されて肝臓に輸送されるため、様々な化学物質が肝臓、胆嚢、腸管を行き来することが知られており、腸内環境の変化と胆汁酸は相互に影響を及ぼし合う密接な関係にあると考えられている<sup>101</sup>。胆嚢における SP-D の発現制御メカニズムは不明であるが、私が行った検討からは DSS 誘導性大腸炎の進行に伴って胆汁中の SP-D 濃度が増加するという予備的知見も得られており、炎症時の腸内環境の変化に加えて食事内容や腸内細菌叢の変化が SP-D の産生・分泌に与える影響についても今後明らかにしていきたい。

## 本研究のまとめ

当研究室の先行研究により、腸内細菌由来の核酸が細胞質内核酸認識受容体経路を介して IRF3 を活性化させることが大腸炎の抑制に繋がること示されていたため、本研究では核酸の取り込み機構の解明を目的とし、その候補分子として SP-D に着目して解析を行った。その結果、図 3.1 で示したように、細胞レベルの解析においては、SP-D が細胞質内の STING 経路の活性化を増強することを示す結果を得ることができた。この結果は、今まで報告されている SP-D の機能から予測されるものであるが、SP-D によって取り込みが増強されることの意義として、自然免疫受容体経路の活性化が起こることを示したのは本研究が初めてである。細胞レベルの解析結果を受け、SP-D 欠損マウスの解析をさらに推進したが、予想していた通り、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスは腸炎に対する感受性が高いことが明らかになった(図 6.1、図 6.2)。しかしながら、その分子機構については、予想外の興味深い結果が得られており、そこから SP-D の新しい役割の発見につながった。すなわち、SP-D 欠損マウスの大腸において、*Ifnb*、*Il33*、*Tslp* の発現量は正常であることから、生体レベルでは SP-D が細胞質内核酸認識受容体経路の活性化を増強しないことが明らかとなり、核酸輸送や *Il33* 等の遺伝子誘導に依存しない別の機構によって腸炎が制御されていることが示唆された(図 4.3)。そこで SP-D の別の機能である微生物の増殖制御に着目し、SP-D が腸内細菌叢の制御を介して腸炎の抑制に関与している可能性について検討したところ、SP-D 欠損マウスでは腸



炎の抑制に関与する *Clostridium* 属細菌が減少していたことから、SP-D がこれら細菌の増殖を促進することが示唆された(図 7.4、図 7.5)。また、SP-D 欠損マウスの腸では *Clostridium* 属細菌の減少を反映して、Treg の割合や IL-22、RegIII $\beta$  といった腸炎の抑制に関与する分子の発現量が減弱することが明らかになった。以上の結果より、SP-D は正常な腸内細菌叢を形成して、腸管内の恒常性を維持するのに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

本研究では、上記のような非常に興味深い結果を得たものの、「腸内において、細胞質に核酸を輸送する機構を解明する」という当初の目的は果たすことができなかった。核酸を輸送する分子として SP-D に着目し解析を行ったが、もうひとつの候補分子であった CRAMP に関する検討は行っていない。CRAMP のヒトホモログである LL-37 は高い抗菌活性を有するペプチドで、病原性細菌による腸炎を抑制する作用の他に、核酸の取り込みを促進して STING を介した I 型 IFN の産生を引き起こすことが報告されている<sup>45</sup>。本検討を行った当時は、CRAMP が TLR9 のリガンドである非メチル化オリゴヌクレオチドの取り込みを促進しないという報告に基づいて、SP-D の解析を優先したものの<sup>51</sup>、CRAMP が腸管内で B-DNA やサイクリックヌクレオチドの輸送に関与している可能性は十分に考えられる。そのため、CRAMP に関する検討は今後の興味深い課題である。

本研究では腸炎の抑制という SP-D の新たな機能を示したが、これらは近年患者数が増加

の一途をたどる炎症性腸疾患の病態解明に寄与する重要な知見であると考えられる。今後、ヒトの胆嚢での SP-D 発現の有無や、炎症性腸疾患の患者における胆嚢や腸内の SP-D 発現レベルについて検討を行うことにより、ヒトの病態と SP-D の関係がさらに解明されると思われる。また、2009 年と 2011 年にはヒトの SP-D の SNP が潰瘍性大腸炎に関与することが報告されていることから<sup>54,55</sup>、それらの変異が SP-D の機能に与える影響についての解析も非常に興味深い課題である。このような知見の蓄積が、いずれ SP-D の腸管内投与等による潰瘍性大腸炎の治療法として発展することを期待している。さらに、腸内細菌叢は全身の免疫応答と深く関わることが分かっていることから、SP-D による腸内細菌叢の制御機構を解明することは、自己免疫疾患、がん、精神神経疾患等 dysbiosis が関与する様々な疾患の予防法や治療法の開発に繋がると期待している。

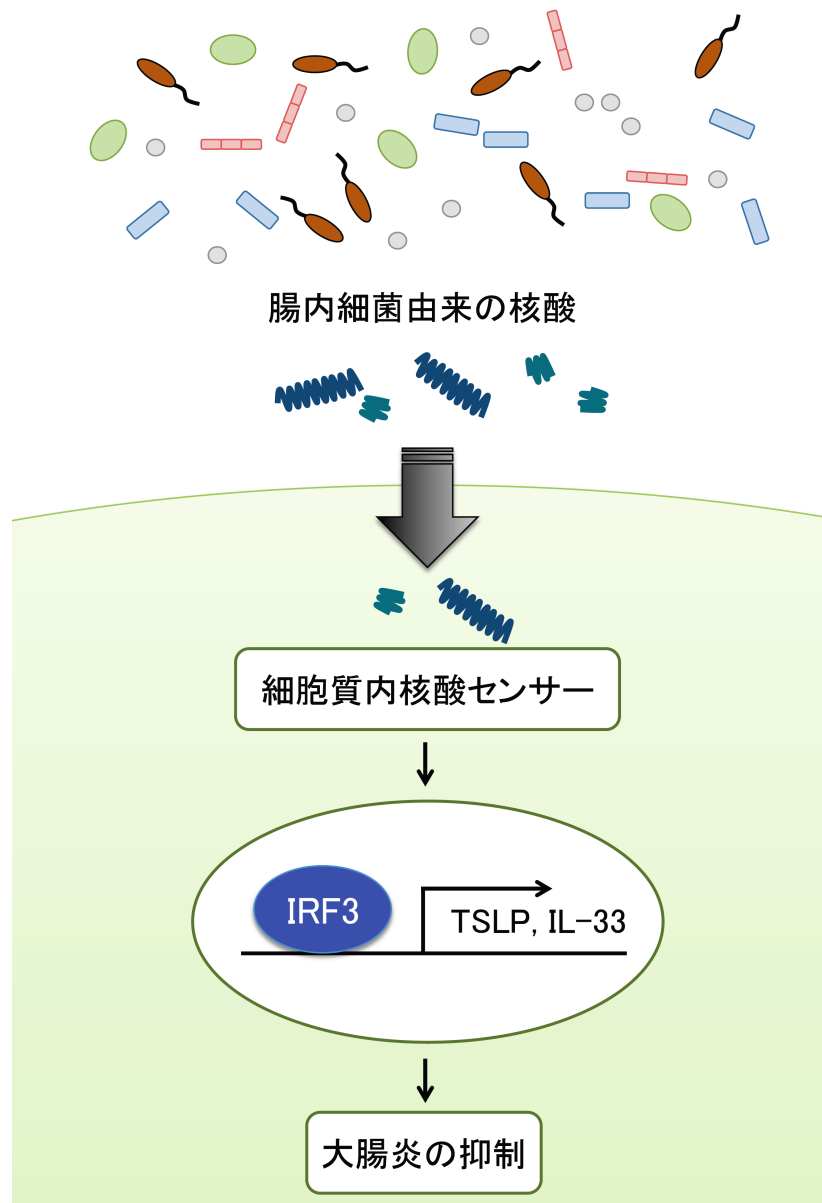


図1 IRF3による大腸炎抑制機構の模式図

腸内細菌由来の核酸は、未知の核酸輸送機構により細胞質内へ輸送され、細胞質内の核酸センサーに認識される。その結果 IRF3 の活性化が引き起こされ、腸炎を抑制するサイトカインである *Tslp* や *Il33* の転写が亢進し大腸炎が抑制される。

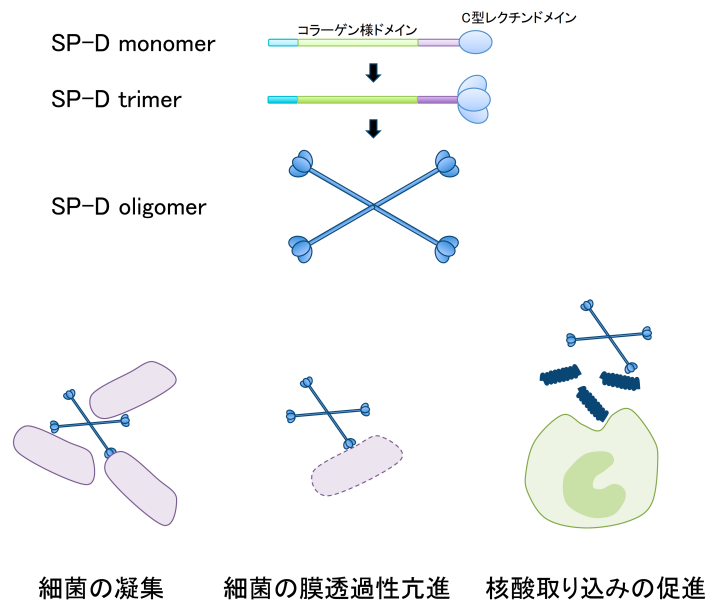


図2 SP-Dの構造と機能

SP-Dは肺コレクチンファミリーに属する約43 kDaのタンパク質であり、C型レクチンドメイン（糖鎖認識領域）とコラーゲン様ドメインを持つ。SP-Dは生体で多量体として存在し、細菌に直接作用してそれらを排除する働きを持つほか、宿主の免疫細胞のクリアランス機能を亢進させることが知られている。

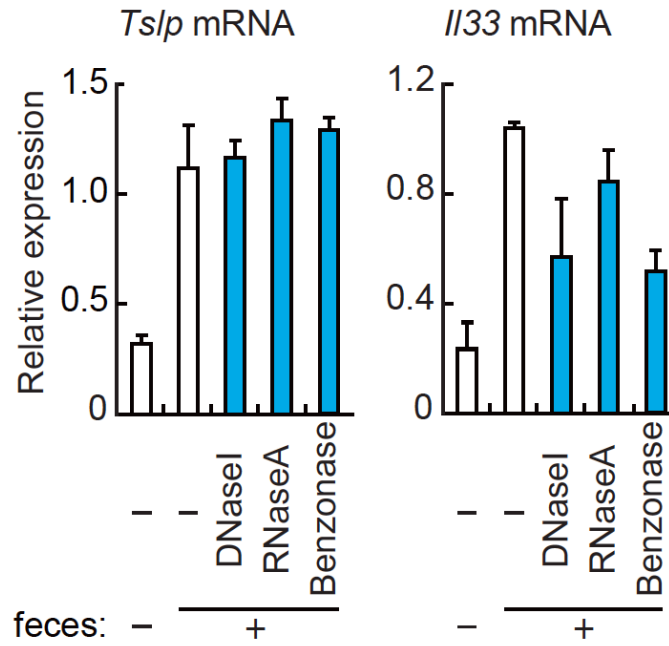


図 3.1 マウス糞便懸濁液の刺激性にヌクレアーゼ処理が与える影響の検討

WT マウスの糞便懸濁液をそれぞれ DNase I、RNase A、Benzonase で 37°C にて 1 時間処理し、MEF の刺激に用いた。刺激開始から 3 時間後に RNA を抽出し、qRT-PCR 法により *Tslp* mRNA と *Il33* mRNA の発現を解析した。(n=3)

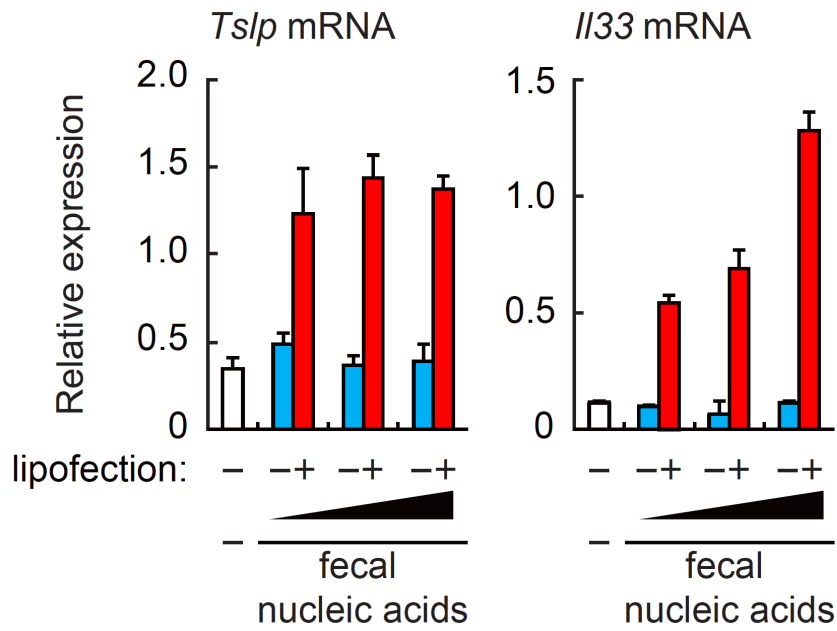


図 3.2 マウス糞便中の核酸を用いた MEF に対する刺激性の検討

WT マウスの糞便から抽出した核酸をリポフェクション法により MEF に導入した。3 時間後に MEF を回収して RNA を抽出し、qRT-PCR 法により *Tslp* mRNA と *Il33* mRNA の発現を解析した。(n=3)

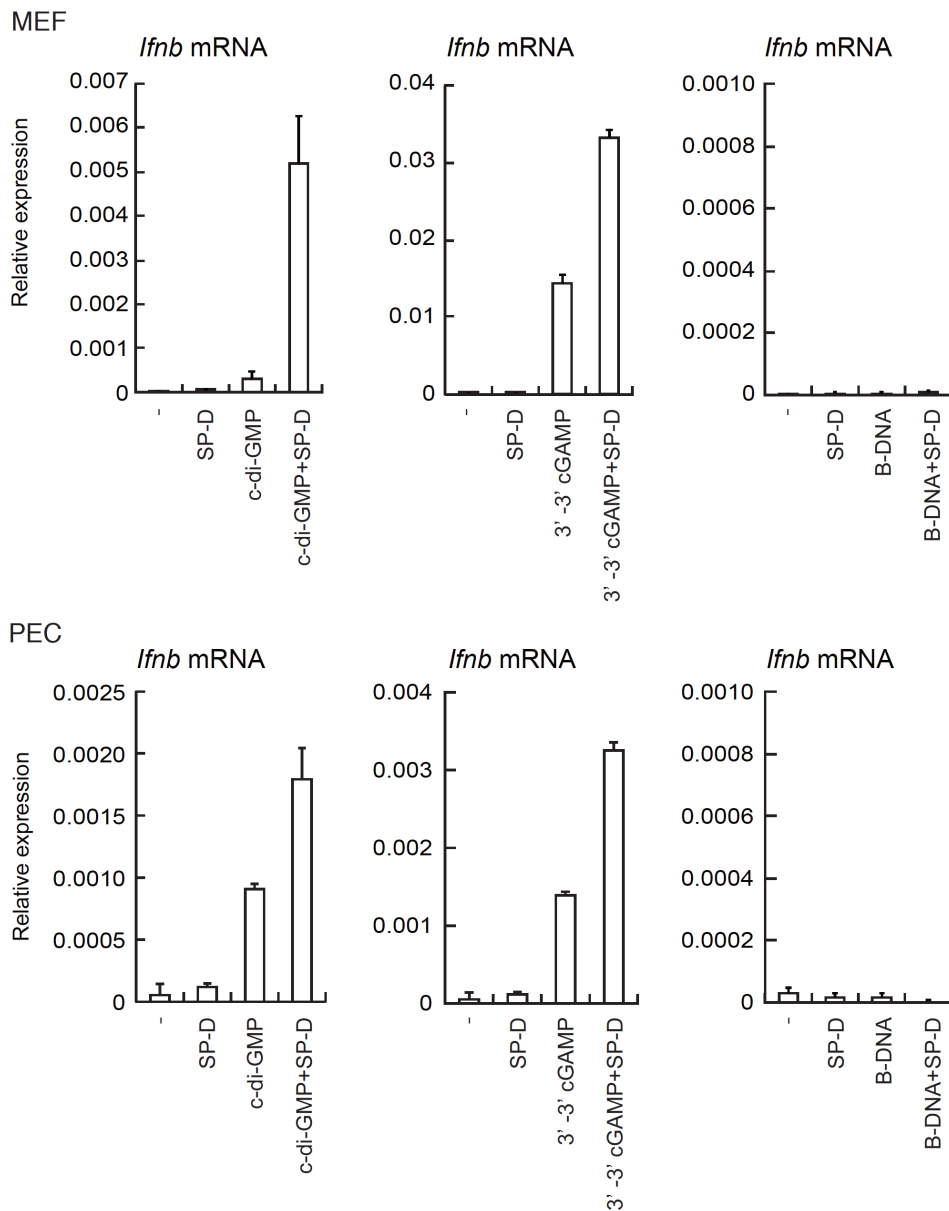


図 4.1 核酸刺激による *Ifnb* mRNA 誘導に SP-D が与える影響

WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの MEF あるいは PEC に c-di-GMP (1 μg/ml) あるいは 3'-3' cGAMP (10 μg/ml) あるいは B-DNA (10 μg/ml) と SP-D で共刺激を行った。刺激開始から 3 時間後に細胞を回収して RNA を抽出し、qRT-PCR 法により *Ifnb* mRNA の発現を解析した。(n=3)

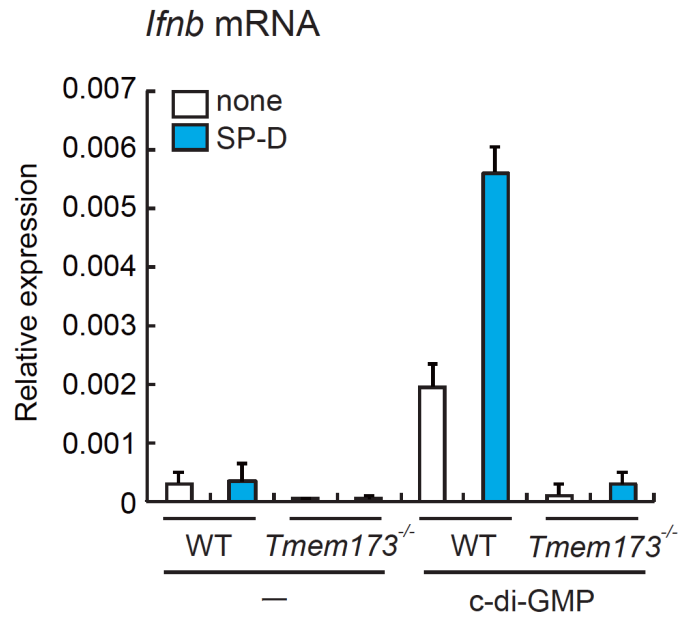


図 4.2 *Tmem173*<sup>-/-</sup> マウス由来 PEC を用いた *Ifnb* mRNA 誘導の検討

*Tmem173*<sup>-/-</sup>マウスから採取した PEC に c-di-GMP (1 μg/ml) と SP-D で共刺激を行った。刺激開始から 3 時間後に RNA を抽出し、qRT-PCR 法により *Ifnb* mRNA の発現を解析した。(n=3)



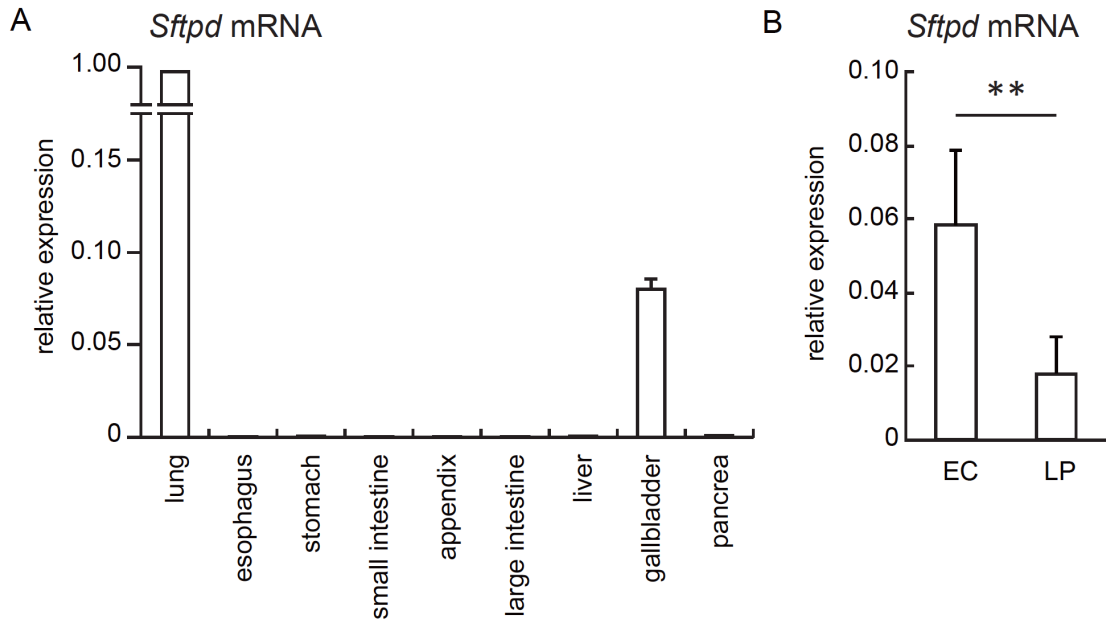


図 5.1 マウス臓器における *Sftpd* mRNA の発現レベル

A) WT マウスから食道、胃、小腸、盲腸、大腸、肝臓、胆嚢、膵臓を摘出し、RNA を抽出した後 qRT-PCR 法により *Sftpd* mRNA の発現を解析した。(n=3)

B) WT マウスの胆嚢を 0.05%トリプシン処理することにより上皮細胞を粘膜固有層から分離し、それぞれにおける *Sftpd* mRNA の発現を解析した。(n=5)

(\*\* :  $P < 0.01$ )

EC: 胆嚢上皮細胞、LP: 胆嚢粘膜固有層細胞

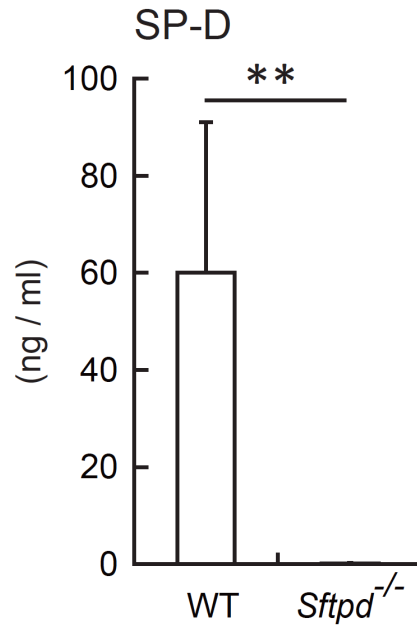


図 5.2 胆汁中の SP-D 濃度

WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの胆嚢から採取した胆汁 1 $\mu$ l を 100 倍希釈し、胆汁中の SP-D 濃度を ELISA 法にて測定した。(WT: n=6、*Sftpd*<sup>-/-</sup>:n=4)

(\*\* :  $P < 0.01$ )

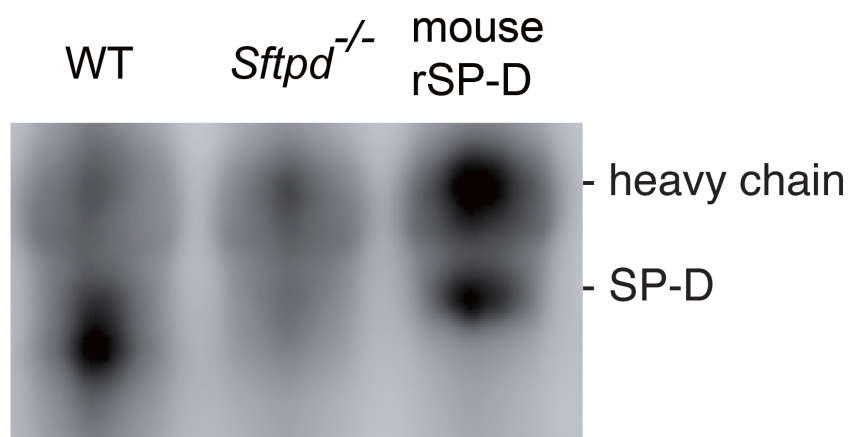


図 5.3 腸管に分泌される SP-D の検出

WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの糞便懸濁液の上清を 0.22 μm のフィルターで濾過したものをサンプルとして用い、SP-D の免疫沈降を行った後、ウエスタンブロットにより SP-D を検出した。陽性対照にはマウスリコンビナント SP-D 溶液 (mouse rSP-D) (1 μg/ml) を用いた。

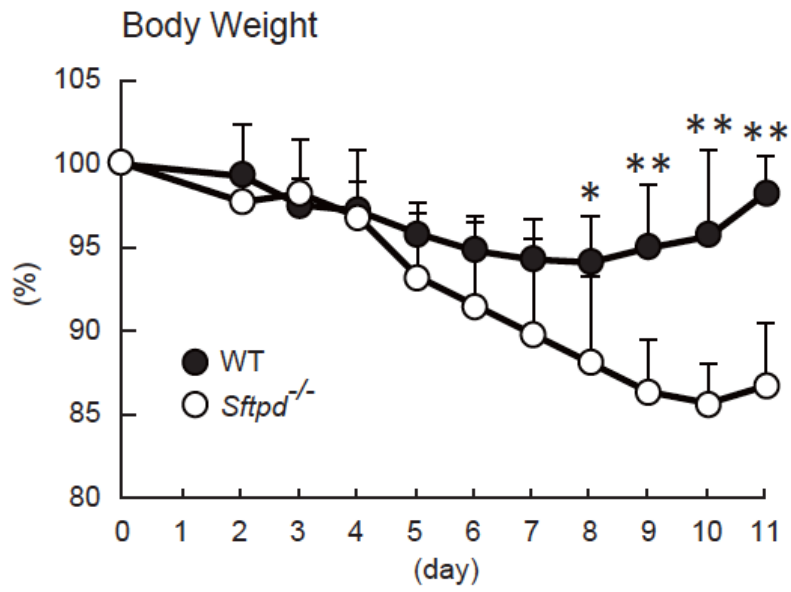


図 6.1 DSS 投与による WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの体重変化  
 WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスに 3.5% の DSS を 8 日間自由飲水させた時の体重変化を示した。結果は投与開始時の体重を 100% としたときの相対値で示した。(WT: n=5、*Sftpd*<sup>-/-</sup>: n=6)  
 (\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ )

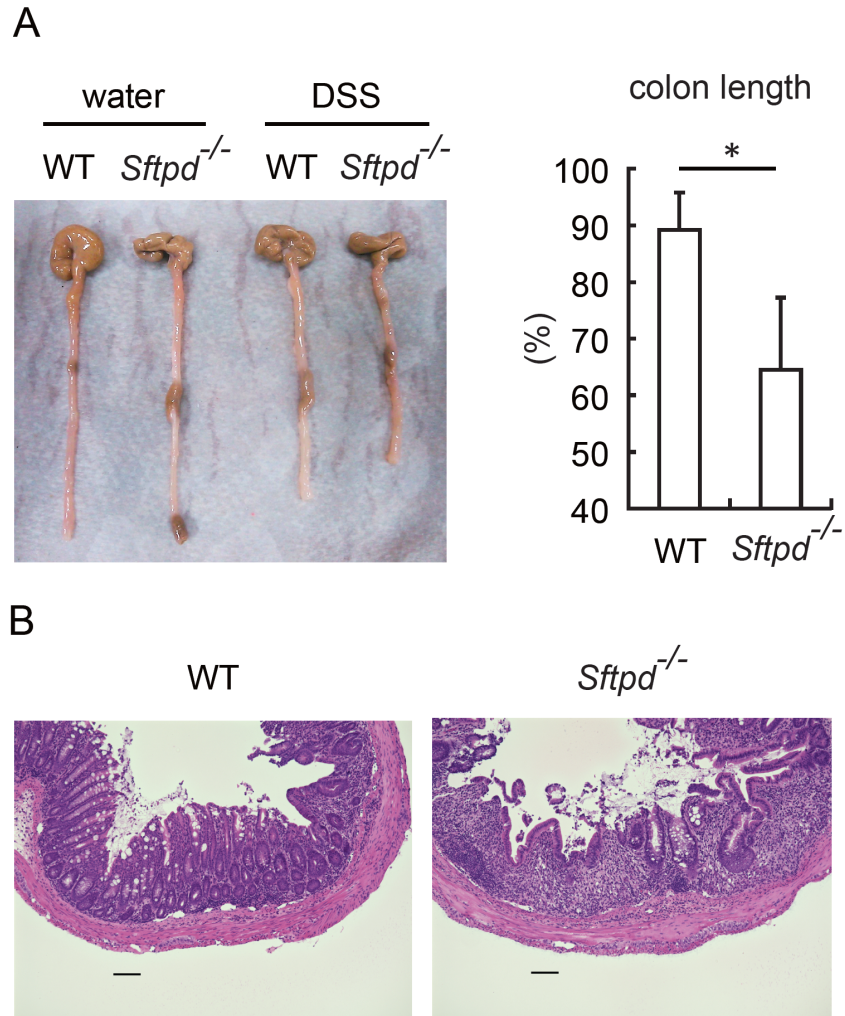


図 6.2 DSS 投与時の WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの大腸の長さ と病理切片

A) WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスに 3.5% の DSS を自由飲水させて 8 日目の大腸の長さを測定し、実験開始前の大腸の長さを 100% としたときの相対値で示した。(n=4)

B) WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスに 3.5% の DSS を 8 日間自由飲水させた時の大腸の HE 染色像の典型例。スケールバー: 100  $\mu$ m

(\* :  $P < 0.05$ )

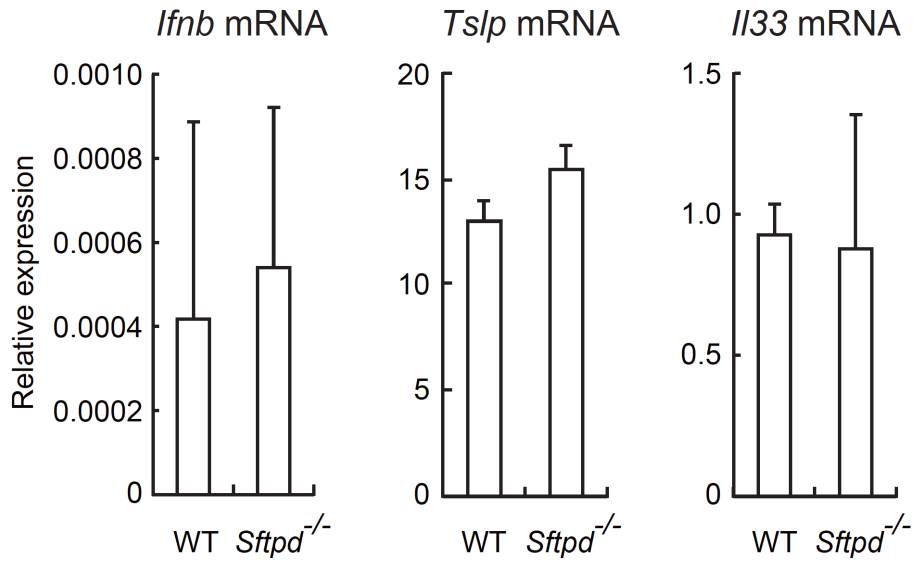


図 6.3 WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの大腸における各サイトカインの誘導  
 WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスに 3.5% DSS を 8 日間自由飲水させた時の大腸から RNA を抽出した後 qRT-PCR 法により *Ifnb* mRNA を定量した。(n=3)

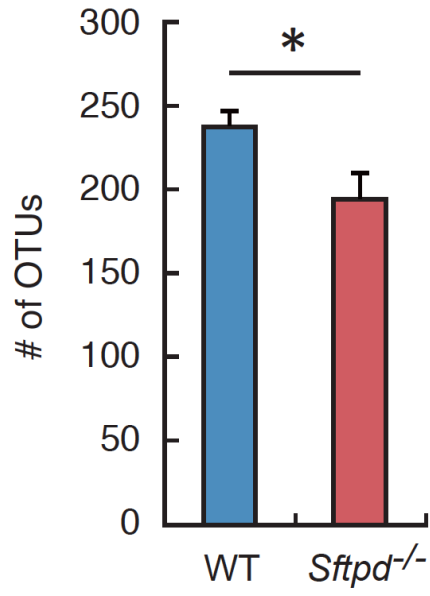
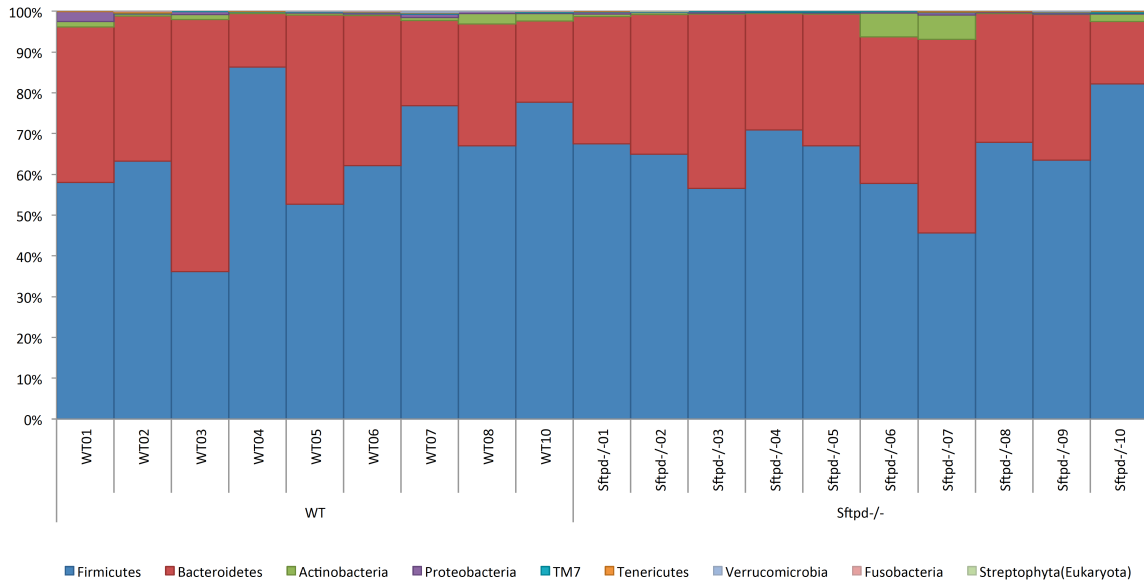


図 7.1 WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの腸内細菌叢の OTU 数  
野生型(WT)、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの糞便 DNA から得られたリード 3000 個に含まれる OTU  
の数。(WT: n=9、*Sftpd*<sup>-/-</sup> :n=10)  
(\* :  $P < 0.05$ )



	Average		SE		p value (t test)
	WT	<i>Sftpd</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Sftpd</i> <sup>-/-</sup>	
Firmicutes	1933.78	1932.00	150.11	91.80	0.992087226
Bacteroidetes	1008.33	1005.90	149.17	81.03	0.988790256
Actinobacteria	31.00	46.10	7.66	22.17	0.532771686
Proteobacteria	18.00	10.00	7.21	1.40	0.305673641
TM7	3.67	4.10	0.60	0.80	0.669436415
Tenericutes	3.00	1.60	0.93	0.65	0.236696208

図 7.2 WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの腸内細菌叢の菌種組成  
 野生型 (WT)、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの常在細菌について門レベルでの菌組成比を示した。  
 (WT: n=9、*Sftpd*<sup>-/-</sup> :n=10)



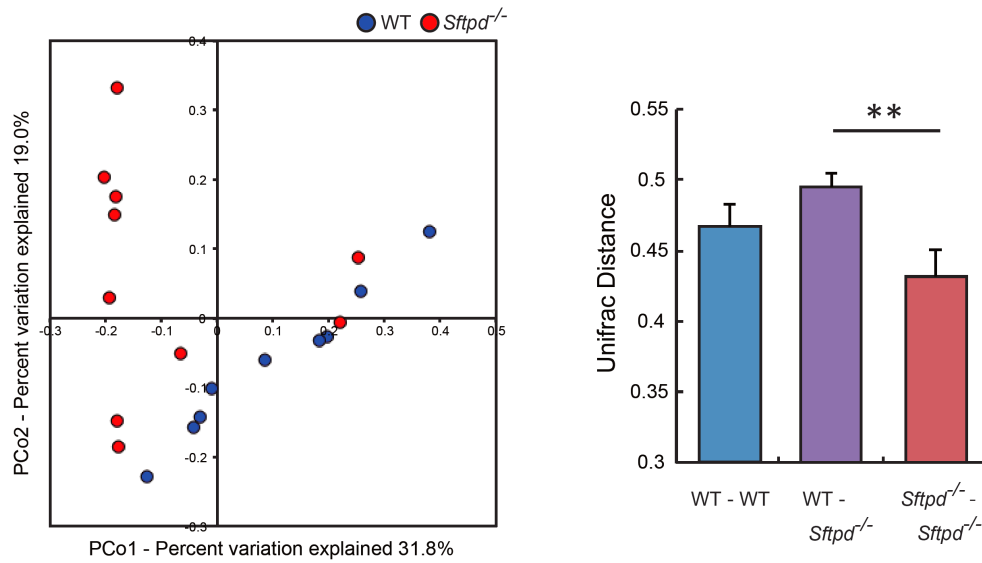


図 7.3 WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスにおける菌叢構造類似性の解析

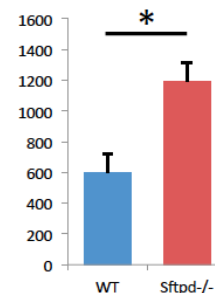
Unifrac distance (weighted) に基づく主座標分析。青が WT マウス検体、赤が *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウス検体を示す。(WT: n=9、*Sftpd*<sup>-/-</sup>: n=10)

(\*\* :  $P < 0.01$ )

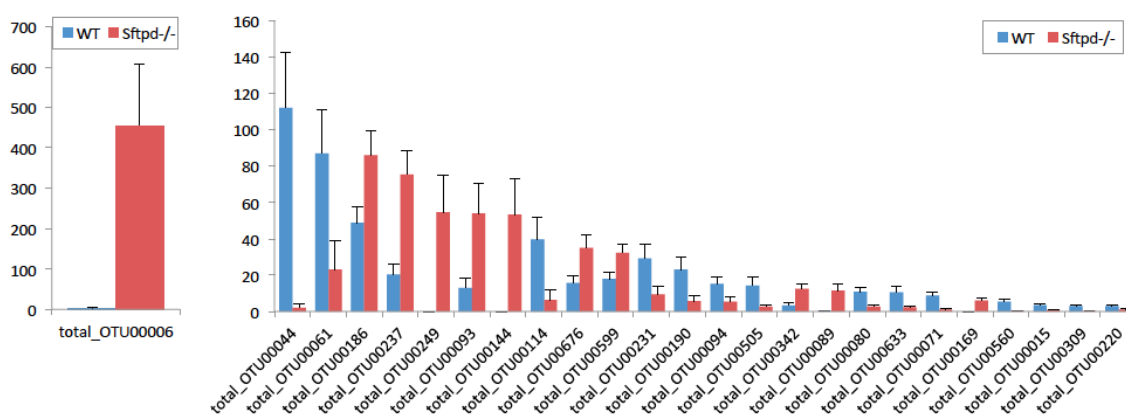
A

	Average		SE		p value (t test)
	WT	SP-DKO	WT	SP-DKO	
Lactobacillus	595.33	1190.10	124.62	166.96	0.011374404
Clostridium	223.44	134.20	49.87	39.33	0.179484671
Bacteroides	47.11	24.10	12.81	4.63	0.121907327
Bifidobacterium	13.44	38.90	7.71	22.31	0.303768784
Lactococcus	21.11	26.70	7.85	11.84	0.69944801
Turicibacter	36.00	8.10	20.25	4.53	0.212336385
Parabacteroides	17.89	16.00	5.58	3.31	0.775368846
Eubacterium	2.89	10.60	1.78	9.40	0.439573512
Parasutterella	4.00	5.80	1.60	1.54	0.428804424
TM7	2.56	3.60	0.63	0.83	0.330797597
Candidatus Arthromitus	3.56	2.10	2.19	1.40	0.584163954

Lactobacillus



B



OTU name	Species	Identity	Average		SE		p value (t test)
			WT	Sftpd <sup>-/-</sup>	WT	Sftpd <sup>-/-</sup>	
total_OTU00006	Lactobacillus murinus	99.1	3.67	455.20	1.59	152.61	0.015990924
total_OTU00044	Clostridium bolteae	87.96	112.00	2.20	30.42	2.09	0.006866414
total_OTU00061	Tannerella sp. 6_1_58FAA_CT1	83.07	87.00	23.00	23.89	16.12	0.042983008
total_OTU00186	Barnesiella viscericola	82.02	48.67	85.90	8.74	13.26	0.037455939
total_OTU00237	Prevotella sp. oral taxon 317	79.94	20.44	75.20	5.37	13.57	0.002874626
total_OTU00249	Prevotella sp. P2A_FAAD4	84.91	0.00	54.60	0.00	20.46	0.02567943
total_OTU00093	Prevotella loescheii	79.68	13.11	53.90	5.15	16.40	0.037455939
total_OTU00144	Lactobacillus animalis	95.48	0.00	53.20	0.00	19.97	0.02586559
total_OTU00114	Clostridium hathewayi	85.37	39.56	6.30	11.94	5.77	0.028079559
total_OTU00676	Lactobacillus reuteri	97.38	15.78	35.00	3.72	6.91	0.028352267
total_OTU00599	Bacteroides acidifaciens	80.8	17.78	32.20	3.44	4.70	0.024864617
total_OTU00231	Eubacterium sp. F1	80.86	29.33	9.30	7.94	4.60	0.04804422
total_OTU00190	Barnesiella viscericola	78.44	23.11	5.80	7.18	2.80	0.04745612
total_OTU00094	Clostridium sp. Clone-9	95.99	15.11	5.40	3.71	2.36	0.044770183
total_OTU00505	Lactobacillus sp. ASF360	95.78	14.11	2.60	4.67	0.88	0.039705628
total_OTU00342	Barnesiella viscericola	80.31	3.33	12.50	1.59	2.32	0.005125722
total_OTU00089	Clostridium bolteae	88.82	0.33	11.50	0.33	3.37	0.008989403
total_OTU00080	Clostridium hathewayi	91.67	10.89	2.80	2.23	1.08	0.006984624
total_OTU00633	Barnesiella viscericola	80.06	10.67	2.40	3.16	0.65	0.03153831
total_OTU00071	Oscillibacter sp. G2	93.52	8.78	1.20	2.13	0.63	0.007315584
total_OTU00169	Rikenella microfus	86.35	0.00	6.00	0.00	1.36	0.001676216
total_OTU00560	Clostridium bolteae	86.61	5.33	0.10	1.67	0.10	0.013798458
total_OTU00015	Acetivibrio cellulolyticus	80.33	3.56	0.80	0.90	0.25	0.01572162
total_OTU00309	Alistipes indistinctus	87.62	3.00	0.30	1.01	0.30	0.030009821
total_OTU00220	[Ruminococcus] obeum	86.07	3.00	1.20	0.60	0.49	0.033849832

図 7.4 WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの腸内細菌叢の OTU 解析

A) 野生型 (WT)、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの常在細菌について属レベルでの菌組成比を示した。  
(WT: n=9、*Sftpd*<sup>-/-</sup>: n=10)  
(\* :  $P < 0.05$ )

B) 野生型 (WT)、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの常在細菌の中で有意差のみられた細菌について OTU レベルでの菌組成比を示した。(WT: n=9、*Sftpd*<sup>-/-</sup>: n=10)

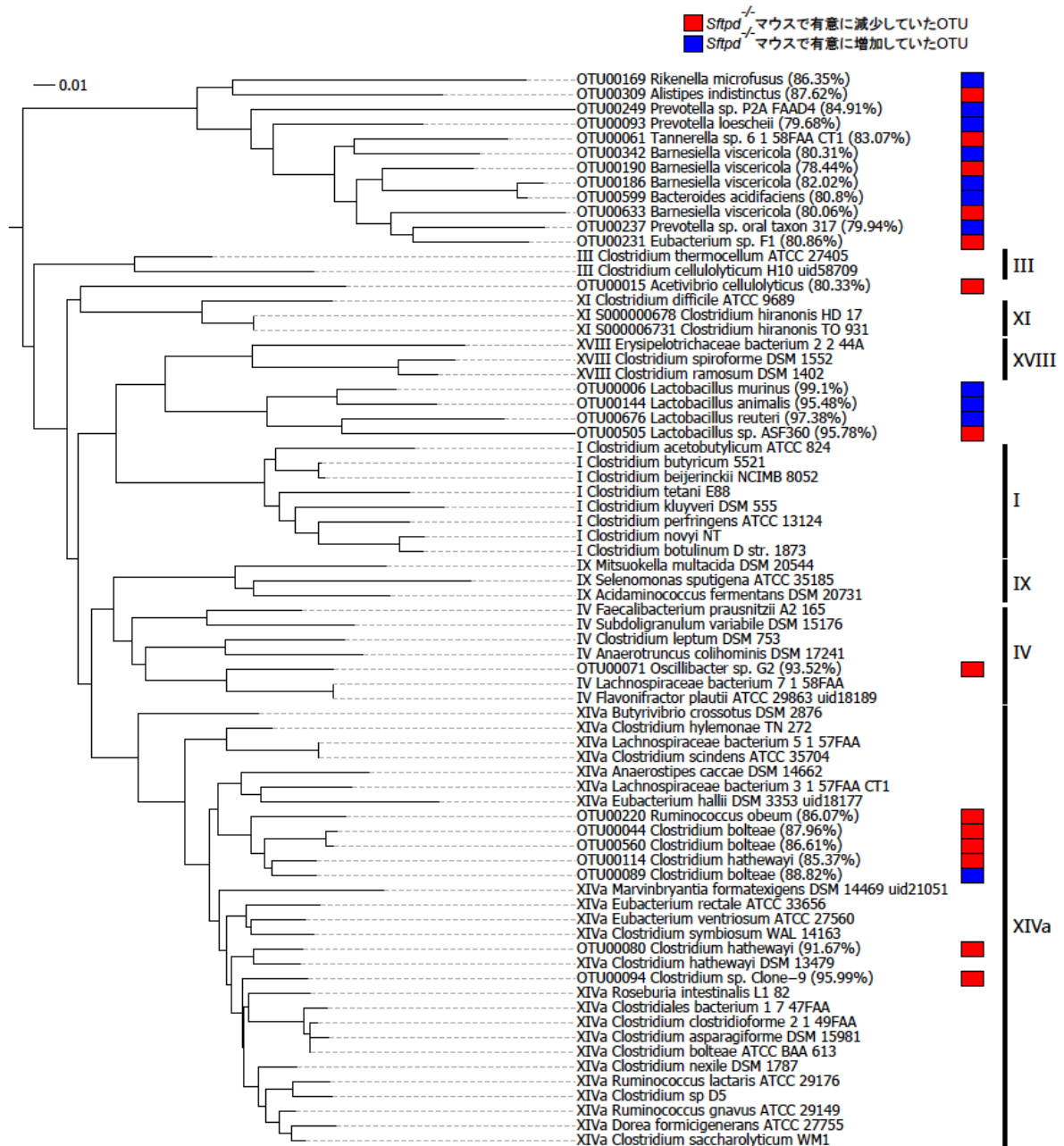


図 7.5 WT マウスと *Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの腸内細菌叢の系統樹解析

図 7.3B で示された *Clostridium* 属細菌について系統樹解析を行い、各細菌の cluster を決定した。

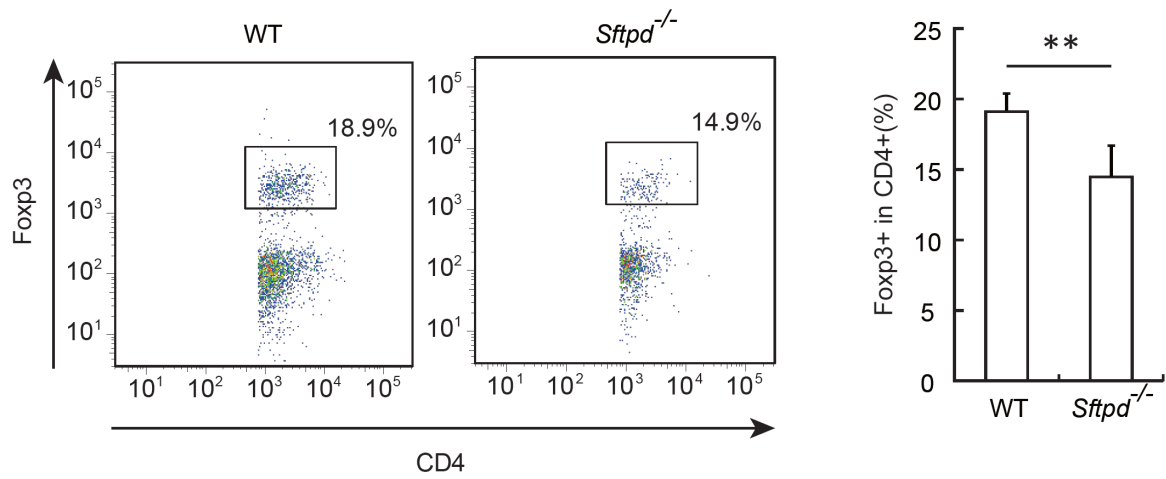


図 8.1 WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの大腸粘膜固有層の Treg 解析

無刺激状態における大腸粘膜固有層細胞のうち、CD4 陽性細胞に占める Foxp3 陽性細胞の割合 (%) を示した。(n=4)

(\*\* :  $P < 0.01$ )

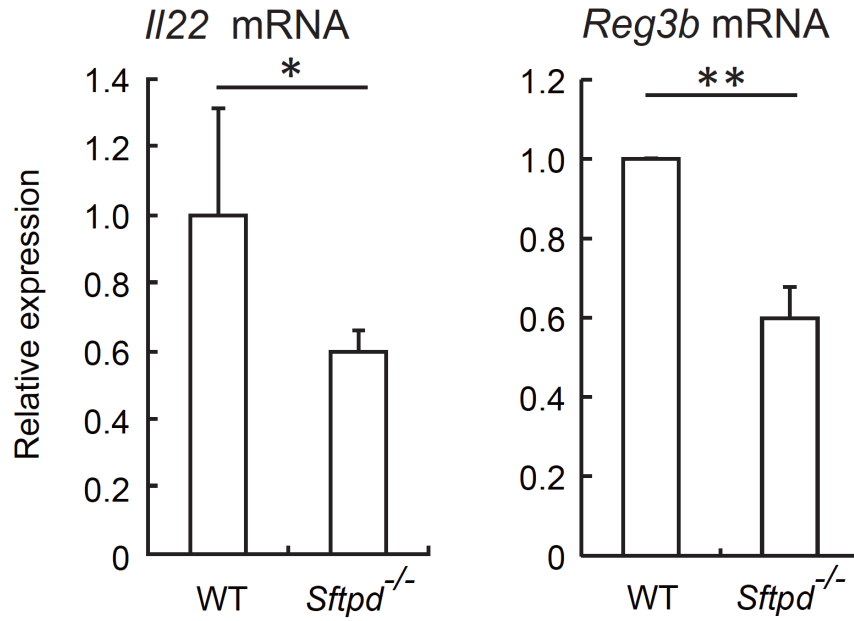


図 8.2 WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの大腸上皮細胞におけるサイトカイン発現解析  
 無刺激状態の WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスの大腸から上皮細胞を分離し、RNA を抽出  
 した後 qRT-PCR 法にて *Il22* mRNA、*Reg3b* mRNA の発現を解析した。(n=4)  
 (\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ )

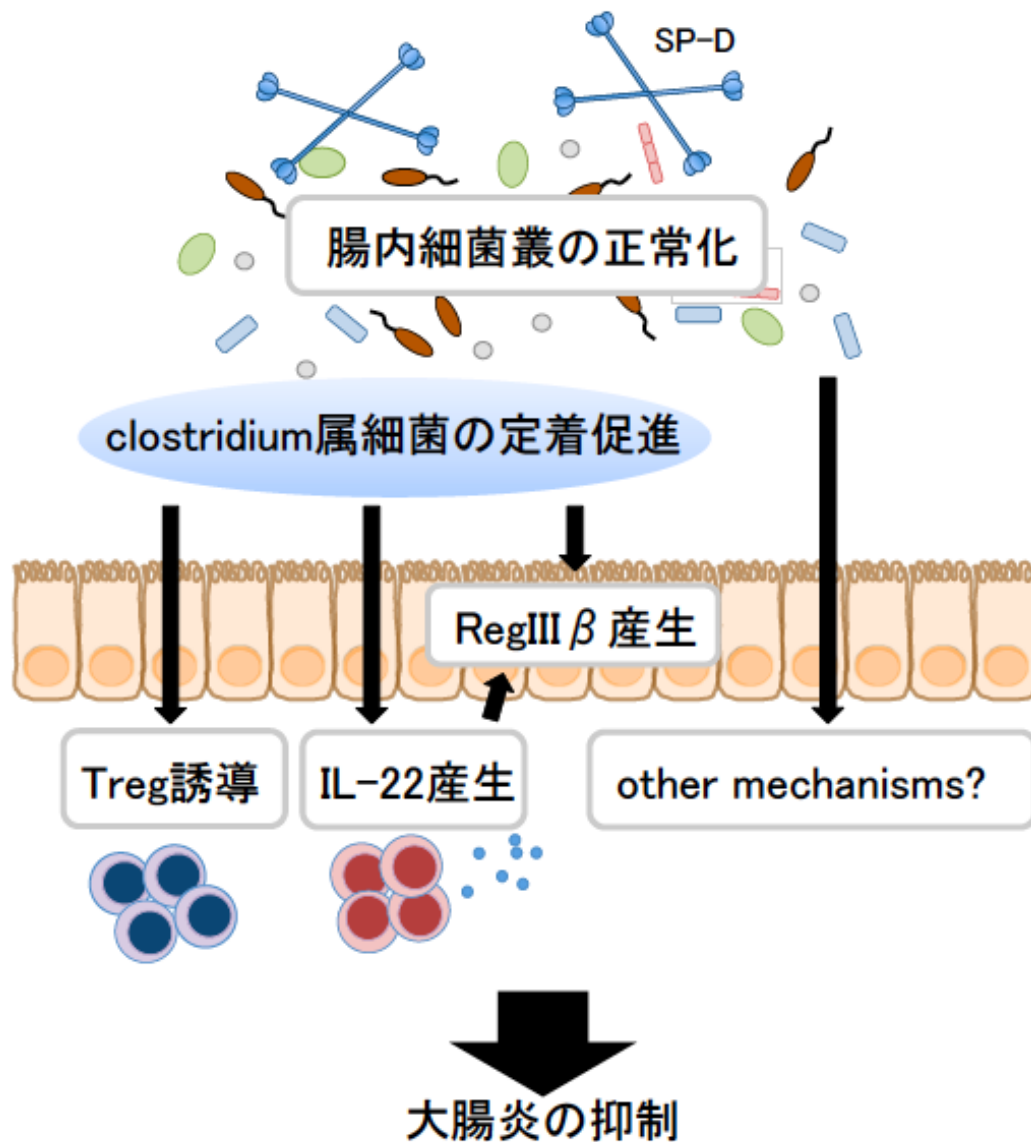


図9 SP-Dによる大腸の恒常性維持機構の模式図

腸管内の SP-D は *Lactobacillus* 属細菌や *Clostridium* 属細菌の増殖を制御する。本研究から、SP-D によって腸管に定着した *Clostridium* 属細菌は、大腸における Treg の誘導や IL-22、RegIII $\beta$  の産生を介して大腸炎を抑制することが示唆された。

## 方法

### 実験動物

c57B6/J マウス、FVB/Njcl マウスは日本クレアより購入し、8-10 週齢で各実験に用いた。SP-D 欠損 (*Sftpd*<sup>-/-</sup>) マウスは、大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫アレルギー内科学の熊ノ郷淳 教授よりご供与いただいた。本研究における動物実験は、東京大学医学系研究科動物実験委員会の承認（医 P10-104）および大阪大学動物実験委員会の承認（動医 266-022-002）を得ており、それぞれの機関において定められた実施マニュアルに従って行った。

### 培地

#### DMEM 培地

DMEM (4.5 g/l Glucose) with L-Gln and Sodium Pyruvate, liquid (ナカライテスク) に 10% 加熱非働化ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS, HyClone)、1% Penicillin Streptomycin, Liquid (Life technologies) を加えて各実験に用いた。

#### RPMI 培地

RPMI medium 1640 (ナカライテスク) に 10% FCS、100  $\mu$ M の MEM 非必須アミノ

酸溶液（ナカライテスク）、100  $\mu$ M MEM ピルビン酸ナトリウム溶液（ナカライテスク）、50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (2-ME, ナカライテスク)、1% Penicillin Streptomycin, Liquid を加えて各実験に用いた。

#### PFE

PBS pH7.2（ナカライテスク）に 2 mM EDTA（GIBCO）、2% FCS を加えて各実験に用いた。

#### FACS buffer

PBS (Sigma) に 10% FCS、10 mM EDTA、20mM HEPES (GIBCO)、10  $\mu$ g/ml Polymyxin B (Calbiochem)、1% Penicillin Streptomycin、1 mM sodium pyruvate (GIBCO) を加えて各実験に用いた。

#### Isolation medium

RPMI medium 1640（ナカライテスク）に 10% FCS、20 mM HEPES、1 mM MEM non-essential amino acids solution（GIBCO）、1% Penicillin Streptomycin、1 mM sodium pyruvate を加えて各実験に用いた。



## Culture medium for LP cell

RPMI medium 1640 に 10% FCS、20mM HEPES、1 mM MEM non-essential amino acids solution、1% Penicillin Streptomycin、50 µg/ml Gentamycin (Sigma)、10 µg/ml Polymyxin B、1 mM sodium pyruvate、50 µM 2-ME、2mM L-Glutamin (Sigma) を加えた。

## 細胞

マウス胎仔由来線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) の調製

胎生 13.5 日のマウス胎仔を母体から取り出し、PBS 中で洗浄後、胚全体をメスで細切した。Trypsin-EDTA (0.05%) (GIBCO) で消化処理 (37°C、30 min) した後 DMEM 培地で 24 時間培養 (37°C、5% CO<sub>2</sub>) した。得られた細胞をさらに 2 回継代し、実験に用いた。

マウス腹腔浸出細胞 (peritoneal exudate cells, PEC) の調製

マウスに 4 ml の 4% thioglycolate を腹腔内投与し、72 時間後に PFE を用いて腹腔内洗浄液を回収した。遠心 (1300 rpm、4°C、5 min) により得られた細胞を ACK Lysing Buffer (Lonza) に懸濁して赤血球を溶血させ、PFE で 2 度洗浄した後セルストレイナー (メッシュサイズ 40 µm、BD) に通した。細胞は RPMI に再懸濁して  $5.0 \times 10^5$ /well

となるように播種した。1 時間培養後 (37°C、10% CO<sub>2</sub>) に培養液を交換し、各刺激に用いた。

#### マウス大腸上皮細胞/粘膜固有層細胞の調製

マウスの大腸を摘出し、長軸方向に切開した後、氷冷した PBS 中で内容物を洗浄した。大腸組織を 5 mm に切断後、FACS buffer 中で攪拌 (37°C、30 min) して 100 µm メッシュフィルターに通し、大腸組織から上皮細胞を分離した。

上皮細胞は 1500 rpm で遠心 (25°C、5 min) し、5 ml の 20% percoll (GE Healthcare) に再懸濁した。この細胞浮遊液を 5 ml の 40% percoll に静かに重層し、2000 rpm で遠心した (25°C、20 min)。大腸組織を PBS で 5 回洗浄し、細切した後 collagenase D (Roche)、DNase I (Roche)、Dispase (GIBCO) 入りの Isolation medium 中で攪拌した (37°C、60 min)。得られた細胞浮遊液を 100 µm メッシュフィルターに通し、FACS buffer で洗浄後 5 ml の 40% percoll に再懸濁した。この細胞浮遊液を 5 ml の 80% percoll に静かに重層し、2000 rpm で遠心した (25°C、20 min)。myeloid 系細胞の層の細胞を全て回収し、FACS buffer で洗浄後、各実験に用いた。

## マウス胆嚢上皮細胞の調製

マウスの胆嚢を摘出し、切開して胆汁を取り除いた後、氷冷した PBS 中で 3 度洗浄した。その後 37°C の Trypsin-EDTA (0.05%) (GIBCO) 中で、5 min おきに vortex を行いながら 30 min 処理した<sup>102</sup>。得られた細胞浮遊液を 100  $\mu\text{m}$  メッシュフィルターに通し、PBS で洗浄して実験に用いた。

## 糞便中の SP-D の検出

マウスから新鮮糞便を採取し、糞便 60 mg を 3 ml の PBS に懸濁した。2000 rpm で遠心 (4°C、5 min) した後、得られた上清を 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルター (Millipore) に通した。Dynabeads Protein G (VERITAS) と抗 SP-D 抗体 (H-120、Santa Cruz) を用いてこの溶液に含まれる SP-D の免疫沈降を行った後、抗 SP-D 抗体 (ab17781、Abcam) を用いてウエスタンブロット法により SP-D を検出した。

## DSS 誘導性大腸炎モデルの作製

3.5% (w/v) のデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sodium sulfate, DSS) 溶液をオートクレーブ (121 °C、20 min) 後、マウスに 8 日間自由飲水させた。実験開始 2 日目から毎日体重を測定し、一定期間経過した後各組織を採取した。

## 細胞刺激

### B-DNA による刺激

PEC に B-DNA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (SIGMA) と mouse recombinant SP-D (5  $\mu\text{g/ml}$ ) を処置した。刺激から 3 時間後に細胞を回収して RNA を抽出した。

### STING リガンドによる刺激

PEC に c-di-GMP (1  $\mu\text{M}$ , invivogen) あるいは 3'-3' cGAMP (10  $\mu\text{M}$ , invivogen) と mouse recombinant SP-D を処置し、3 時間後に細胞を回収して RNA を抽出した。

### 糞便抽出核酸による刺激

c57B6/J マウスの新鮮糞便を採取し、TriZol (Invitrogen) を用いて核酸 (DNA、RNA) を抽出した。抽出した核酸のヌクレアーゼ処理は、DNase I (15 U/ml, Roche)、RNase A (15  $\mu\text{g/ml}$ , Invitrogen)、Benzonase (1000 U/ml, Millipore) を用いて行った。MEF への核酸のリポフェクションは Lipofectamine 2000 の標準プロトコルに従って行い、核酸と Lipofectamine 2000 をそれぞれ低血清培地 OPTI-MEM (GIBCO) と混合して 5 min 静置 (25°C) した後、両者を混合してさらに 20 min 静置 (25°C) したものを細胞培養液に加えた。刺激から 3 時間後に細胞を回収して RNA を抽出した。

## 組織/細胞の qRT-PCR

RNA 抽出は RNAeasy (Qiagen) の標準プロトコルに従って行った。抽出した RNA は 40  $\mu$ l の RNase-free water で溶出し、total RNA 溶液として用いた。total RNA は PrimeScript RT Master Mix の標準プロトコルを用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。

qRT-PCR には 7900HT (Applied Biosystems) を用い、SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Takara) の標準プロトコルに従って行った。sense primer、anti-sense primer は終濃度が 0.5 mM となるように希釈し、滅菌蒸留水で 20 倍に希釈した cDNA 溶液を 2  $\mu$ l を加え、滅菌蒸留水で全量を 20  $\mu$ l とした反応液を作製した。PCR で得られた各遺伝子の mRNA 発現量は *Gapdh* mRNA の発現量で標準化した。

qRT-PCR に用いたプライマーは以下の通りである。

遺伝子		配列
<i>Sftpd</i>	Forward	5'- CCAGTTGGACCCAAAGGAGAGAATG -3'
	Reverse	5'- GTCCTATGTTCCCCTGCTTCCCA -3'
<i>Ifnb</i>	Forward	5'- ACGCCTGGATGGTGGTCCGA -3'
	Reverse	5'- TGCCTGCAACCACCACTCATTCT -3'
<i>Tslp</i>	Forward	5'- AGGCTACCCTGAAACTGAGA -3'
	Reverse	5'- GGAGATTGCATGAAGGAATAC -3'
<i>Il33</i>	Forward	5'- CATGCCAACGACAAGGACTA -3'
	Reverse	5'- GCTCTCATCTTTCTCCTCCA -3'
<i>Reg3b</i>	Forward	5'- CCTGCTCCGTCATGTCCT -3'
	Reverse	5'- CGTGCGGAGGGTATATTCTT -3'

<i>Ii22</i>	Forward	5'-TCAGCTCAGCTCCTGTCACAT -3'
	Reverse	5'-TCCCCAATCGCCTTGATCTCT -3'
<i>Gapdh</i>	Forward	5'- CTCATGACCACAGTCCATGC -3'
	Reverse	5'- CACATTGGGGGTAGGAACAC -3'

### ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

胆汁中に含まれる SP-D は、マウスより摘出した胆嚢から胆汁を採取し、100 倍希釈した後 rat SP-D ELISA Kit (ヤマサ) を用いて定量した。

### ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

マウスから採取した大腸組織を 4%パラホルムアルデヒドにて 4°Cで一晩固定した後、大阪大学微生物病研究所にてパラフィン切片の作製と HE 染色を行っていただいた。その切片をオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE) 下で観察・撮影した。

### 腸内細菌叢解析

WT マウス、*Sftpd*<sup>-/-</sup> マウスから新鮮糞便を採取して DNA を抽出し、universal PCR プライマー Bact-27F (5'-AGRGTTTGATYMTGGCTCAG-3') Bact-1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') を用いて PCR を行った。得られた PCR 産物をシーケンス

解析して OTU を作成し、Unifrac 解析に用いた。

### フローサイトメトリー解析

単離したマウス大腸粘膜固有層細胞と抗マウス CD4 抗体 (BD) を FACS buffer 中で反応 (4°C、30 min) させた後、Foxp3/Transcription factor staining buffer set (eBioscience) を用いて、標準プロトコルに従い細胞の固定と細胞膜の透過処理を行った。続いて細胞と抗マウス Foxp3 抗体 (eBioscience) を permealization buffer 中で反応 (25°C、45 min) させ、FACS buffer で洗浄後 BD FACSCantoII フローサイトメーター (BD) を用いて解析を行った。

### 統計

実験成績は平均±標準誤差で示した。2 群間の有意差検定は unpaired Student's *t*-test を用い、危険率 (*P*) が 5%未満の場合を統計学的に有意とした。(\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ )

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究につきまして懇切なご指導およびご助言を賜りました  
東京大学生産技術研究所 炎症・免疫制御学社会連携研究部門 谷口維紹 特任教授  
(マックスプランク-東京大学統合炎症学センター長)、大阪大学大学院医学系研究科  
呼吸器・免疫アレルギー内科学 熊ノ郷淳 教授に謹んで御礼申し上げます。また、実  
験および論文執筆にあたり熱心にご指導くださいました、東京大学生産技術研究所  
炎症・免疫制御学社会連携研究部門 根岸英雄 特任助教をはじめ、同 西尾純子 特任  
助教、同 柳井秀元 特任准教授、大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫アレル  
ギー内科学 姜秀辰 助教、同 木田博 助教に厚く御礼申し上げます。

本論文で示した結果のうち、図 3.1、図 3.2 は三木祥治 氏 (東京大学生産技術研究  
所 炎症・免疫制御学社会連携研究部門)、遠藤信康 氏 (同) のご協力により、また  
図 7.1-図 7.5 は服部正平 教授 (東京大学大学院新領域創成科学研究科、早稲田大学理  
工学術院先進理工学研究科)、須田亙 博士 (東京大学大学院新領域創成科学研究科、  
慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室) のご協力により得られたものであり、こ  
こに深く感謝いたします。また、公私とも様々な面で支えて頂いた炎症・免疫制御学  
社会連携研究部門の皆様、呼吸器・免疫アレルギー内科学の皆様に心より御礼申し上  
げます。最後に、本研究のために捧げられた実験動物の尊い生命に感謝するとともに、



その霊が慰められるようお祈り致します。

## 6. 略語一覽

2-ME	2-mercaptoethanol
AMP	adenosine monophosphate
cDNA	complementary DNA
CRAMP	cathelicidin-related antimicrobial peptide
DAMP	damage-associated molecular pattern
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	deoxyribonucleic acid
DSS	dextran sodium sulfate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GMP	guanosine monophosphate
HE	hematoxylin and eosin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
IFN	interferon
IFNAR	interferon- $\alpha/\beta$ receptor
IL	interleukin
ILC	innate lymphoid cell
IRF	interferon regulatory factor
MAVS	Mitochondrial antiviral signaling protein
MEF	mouse embryonic fibroblast
MEM	minimum essential media
mRNA	messenger RNA
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein
OTU	operational taxonomic unit
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction

PEC	peritoneal exudate cell
PRR	pattern recognition receptor
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
rDNA	ribosomal DNA
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene-I
RLR	RIG-I like receptor
RNA	ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park memorial institute
SNP	single nucleotide polymorphism
SP-D	surfactant protein D
STAT	signal transduction and activator of transcription
STING	Stimulator of IFN genes protein
TLR	Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
Treg	regulatory T cell
TSLP	thymic stromal lymphopoietin
WT	wild type

## 7. 引用文献

1. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* **16**, 343–353 (2015).
2. Takeuchi, O.; Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
3. O’Neill, L. a J., Golenbock, D. & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 453–60 (2013).
4. Janeway, C. a & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
5. Paul, W. E. Bridging innate and adaptive immunity. *Cell* **147**, 1212–1215 (2011).
6. Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors : critical proteins linking inante and acquired immunity. *Nat. Immunol.* **2**, 675–680 (2001).
7. Waldner, H. The role of innate immune responses in autoimmune disease development. *Autoimmun. Rev.* **8**, 400–404 (2009).
8. Chen, G., Shaw, M. H., Kim, Y.-G. & Nuñez, G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu. Rev. Pathol.* **4**, 365–398 (2009).
9. Carroll, M. C. A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 825–831 (2004).
10. Lupp, C. *et al.* Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* **2**, 119–129 (2007).
11. Hayashi, A. *et al.* A single strain of Clostridium butyricum induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. *Cell Host Microbe* **13**, 711–722 (2013).
12. Kim, H., Rhee, S. H., Pothoulakis, C. & LaMont, J. T. Inflammation and Apoptosis in Clostridium difficile Enteritis Is Mediated by PGE2 Up-Regulation of Fas Ligand. *Gastroenterology* **133**, 875–886 (2007).
13. Hooper, L. V & Macpherson, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis

- with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 159–169 (2010).
14. June L. Round and Sarkis K. Mazmanian<sup>1</sup>. Inducible Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 12004–12009(2010).
  15. Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* **6**, 345–352 (2005).
  16. Furness, J. B., Kunze, W. a & Clerc, N. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. *Am. J. Physiol.* **277**, G922–G928 (1999).
  17. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 313–323 (2009).
  18. Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G. Y. & Núñez, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 321–35 (2013).
  19. Sokol, H. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 16731–16736 (2008).
  20. Ohkusa, T. *et al.* Fusobacterium varium. *Gut* **52**, 79–83 (2003).
  21. Saitoh, S. *et al.* Bacteroides ovatus as the predominant commensal intestinal microbe causing a systemic antibody response in inflammatory bowel disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**, 54–9 (2002).
  22. Stefká, a. T. *et al.* Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 2–7 (2014).
  23. Yoshimoto, S. *et al.* Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* **499**, 97–101 (2013).
  24. Hsiao, E. Y. *et al.* Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders. *Cell* **155**, 1451–1463 (2013).
  25. Borody, T. J., Brandt, L. J. & Paramsothy, S. Therapeutic faecal microbiota transplantation: current status and future developments. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **30**, 97–105 (2014).
  26. Kump, P. K. *et al.* Alteration of intestinal dysbiosis by fecal microbiota transplantation

- does not induce remission in patients with chronic active ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **19**, 2155–2165 (2013).
27. Maslowski, K. M. *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* **461**, 1282–1286 (2009).
  28. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **118**, 229–241 (2004).
  29. Wells, J. M., Rossi, O., Meijerink, M. & van Baarlen, P. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108 Suppl**, 4607–4614 (2011).
  30. Loo, Y. M. & Gale, M. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity* **34**, 680–692 (2011).
  31. Hooper, L. V., Littman, D. R. & Macpherson, J. A. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science (80-. )*. **336**, 1268–1273 (2012).
  32. Wang, Y. *et al.* Rig-I-/- mice develop colitis associated with downregulation of G alpha i2. *Cell Res.* **17**, 858–868 (2007).
  33. Chassaing, B., Ley, R. E. & Gewirtz, A. T. Intestinal Epithelial Cell Toll-like Receptor 5 Regulates the Intestinal Microbiota to Prevent Low-Grade Inflammation and Metabolic Syndrome in Mice. *Gastroenterology* **147**, 1363–1377.e17 (2014).
  34. Vijay-Kumar, M. *et al.* Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J. Clin. Invest.* **117**, 3909–3921 (2007).
  35. González-Navajas, J. M., Lee, J., David, M. & Raz, E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 125–135 (2012).
  36. Katakura, K. *et al.* Toll-like receptor 9 – induced type I IFN protects mice from experimental colitis. *J. Clin. Invest.* **115**, 695–702 (2005).
  37. McFarland, A. P. *et al.* Localized delivery of interferon- $\beta$  by *Lactobacillus* exacerbates experimental colitis. *PLoS One* **6**, e16967(2011).
  38. Scheinin, T., Butler, D. M., Salway, F., Scallon, B. & Feldmann, M. Validation of the interleukin-10 knockout mouse model of colitis: Antitumour necrosis factor-antibodies suppress the progression of colitis. *Clin. Exp. Immunol.* **133**, 38–43 (2003).

39. Taylor, B. C. *et al.* TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J. Exp. Med.* **206**, 655–667 (2009).
40. Oboki, K. *et al.* IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18581–18586 (2010).
41. Negishi, H. *et al.* Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nat. Immunol.* **13**, 659–666 (2012).
42. Polumuri, S. K. *et al.* Transcriptional Regulation of Murine IL-33 by TLR and Non-TLR Agonists. *J. Immunol.* **189**, 50–60 (2012).
43. Negishi, H. *et al.* Essential contribution of IRF3 to intestinal homeostasis and microbiota-mediated Tslp gene induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 21016–21 (2012).
44. Deane, J. a. & Bolland, S. Nucleic Acid-Sensing TLRs as Modifiers of Autoimmunity. *J. Immunol.* **177**, 6573–6578 (2006).
45. Kahlenberg, J. M. & Kaplan, M. J. Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease. *J. Immunol.* **191**, 4895–901 (2013).
46. Palaniyar, N. *et al.* Innate immune collectin surfactant protein D enhances the clearance of DNA by macrophages and minimizes anti-DNA antibody generation. *J. Immunol.* **174**, 7352–7358 (2005).
47. Lande, R. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* **449**, 564–569 (2007).
48. Niyonsaba, F. *et al.* A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology* **106**, 20–26 (2002).
49. Lande, R. *et al.* Neutrophils Activate Plasmacytoid Dendritic Cells by Releasing Self-DNA-Peptide Complexes in Systemic Lupus Erythematosus. *Sci. Transl. Med.* **3**, 73ra19–73ra19 (2011).
50. Otte, J. M. *et al.* Effects of the cathelicidin LL-37 on intestinal epithelial barrier integrity. *Regul. Pept.* **156**, 104–117 (2009).
51. Nakagawa, Y. & Gallo, R. L. Endogenous Intracellular Cathelicidin Enhances TLR9 Activation in Dendritic Cells and Macrophages. *J. Immunol.* **194**, 1274–1284 (2014).
52. Gaunsbaek, M. Q., Rasmussen, K. J., Beers, M. F., Atochina-Vasserman, E. N. &

- Hansen, S. Lung surfactant protein D (SP-D) response and regulation during acute and chronic lung injury. *Lung* **191**, 295–303 (2013).
53. Saka, R. *et al.* The Expression of Surfactant Proteins A and D in the Intestines and Pancreas of Murine Fetuses. *Open J. Pediatr.* **04**, 12–20 (2014).
  54. Tanaka, M. *et al.* Genetic variants in surfactant, pulmonary-associated protein D (SFTPD) and Japanese susceptibility to ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 918–925 (2009).
  55. Lin, Z. *et al.* Genetic Variants and Monoallelic Expression of Surfactant Protein-D in Inflammatory Bowel Disease. *Ann. Hum. Genet.* **75**, 559–568 (2011).
  56. Felgner, P. L. *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7413–7417 (1987).
  57. Hornung, V. *et al.* Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* **11**, 263–270 (2005).
  58. Mahieu-Williame, L. *et al.* Near-field microscopy and fluorescence spectroscopy: Application to chromosomes labelled with different fluorophores. *J. Microsc.* **238**, 36–43 (2010).
  59. Iyer, G. *et al.* Reduced surface area chromatography for flow-through purification of viruses and virus like particles. *J. Chromatogr. A* **1218**, 3973–3981 (2011).
  60. Sober, H. A., Schlossman, S. F., Yaron, A., Latt, S. A. & Rushizky, G. W. Protein-Nucleic Acid Interaction. I. Nuclease-Resistant Polylysine-Ribonucleic Acid Complexes \*. *Biochemistry* **5**, 3608–3616 (1966).
  61. Vogel, P. & Lamkanfi, M. Cutting Edge: STING Mediates Protection against Colorectal Tumorigenesis by Governing the Magnitude of Intestinal Inflammation. *J. Immunol.* **193**, 4779–4782(2015).
  62. Tsuchida, T. *et al.* The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to intracellular double-stranded DNA. *Immunity* **33**, 765–776 (2010).
  63. Ablasser, A. *et al.* cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* **498**, 380–384 (2013).
  64. Gao, P. & Patel, D. J. V-cGAPs: attenuators of 3'3'-cGAMP signaling. *Cell Res.* **25**,



- 529–530 (2015).
65. Gomelsky, M. & Galperin, M. Y. Bacterial second messengers, cGMP and c-di-GMP, in a quest for regulatory dominance. *EMBO J.* **32**, 2421–3 (2013).
  66. Burdette, D. L. *et al.* STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* **478**, 515–518 (2011).
  67. Ding, Y. *et al.* Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Mol. Ther.* **22**, 1075–1083 (2014).
  68. Madsen, J. *et al.* Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues. *J. Immunol.* **164**, 5866–5870 (2000).
  69. Akiyama, J. *et al.* Tissue distribution of surfactant proteins A and D in the mouse. *J. Histochem. Cytochem.* **50**, 993–996 (2002).
  70. Liddle, R. a. Cholecystokinin cells. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 221–242 (1997).
  71. Korfhagen, T. R. *et al.* Surfactant protein-D regulates surfactant phospholipid homeostasis in vivo. *J. Biol. Chem.* **273**, 28438–28443 (1998).
  72. Mähler, M. *et al.* Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am. J. Physiol.* **274**, G544–G551 (1998).
  73. Hall, L. J. *et al.* Natural killer cells protect mice from DSS-induced colitis by regulating neutrophil function via the NKG2A receptor. *Mucosal Immunol.* **6**, 1016–26 (2013).
  74. Assi, K. *et al.* Role of epithelial integrin-linked kinase in promoting intestinal inflammation: effects on CCL2, fibronectin and the T cell repertoire. *BMC Immunol.* **12**, 42 (2011).
  75. Murphy, C. T. *et al.* Technical Advance: Function and efficacy of an  $\alpha$ 4-integrin antagonist using bioluminescence imaging to detect leukocyte trafficking in murine experimental colitis. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 1271–8 (2010).
  76. Wang, X. *et al.* Cloning and variation of ground state intestinal stem cells. *Nature* **522**, 173–178 (2015).
  77. Persson, A. *et al.* Surfactant - Associated Protein 4, 6361–6367 (1989).
  78. Crouch, E. C. Surfactant protein-D and pulmonary host defense. *Respir. Res.* **1**, 93–108 (2000).

79. Hartshorn, K. L., White, M. R. & Crouch, E. C. Contributions of the N- and C-terminal domains of surfactant protein D to the binding, aggregation, and phagocytic uptake of bacteria. *Infect. Immun.* **70**, 6129–6139 (2002).
80. Kuan, S. F., Rust, K. & Crouch, E. Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides. Surfactant protein D is an Escherichia coli-binding protein in bronchoalveolar lavage. *J. Clin. Invest.* **90**, 97–106 (1992).
81. Hartshorn, K. L. *et al.* Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria. *Am. J. Physiol.* **274**, L958–L969 (1998).
82. Ni, M. *et al.* Surfactant Protein D Is Present in Human Tear Fluid and the Cornea and Inhibits Epithelial Cell Invasion by Pseudomonas aeruginosa. **73**, 2147–2156 (2005).
83. Kurimura, Y. *et al.* Surfactant protein D inhibits adherence of uropathogenic Escherichia coli to the bladder epithelial cells and the bacterium-induced cytotoxicity: a possible function in urinary tract. *J. Biol. Chem.* **287**, 39578–39588 (2012).
84. Bauer, H., Paronetto, F., Burns, W. A. & Einheber, A. The enhancing effect of the microbial flora on macrophage function and the immune response. A study in germfree mice. *J. Exp. Med.* **123**, 1013–24 (1966).
85. Sartor, R. B. & Mazmanian, S. K. Intestinal Microbes in Inflammatory Bowel Diseases. *Am. J. Gastroenterol. Suppl.* **1**, 15–21 (2012).
86. Adolfsson, O., Meydani, S. N. & Russell, R. M. Yogurt and gut function. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 245–256 (2004).
87. Zhou, F.-X. *Lactobacillus crispatus* M206119 exacerbates murine DSS-colitis by interfering with inflammatory responses. *World J. Gastroenterol.* **18**, 2344 (2012).
88. Vahabnezhad, E., Mochon, A. B., Wozniak, L. J. & Ziring, D. A. Lactobacillus bacteremia associated with probiotic use in a pediatric patient with ulcerative colitis. *J. Clin. Gastroenterol.* **47**, 437–439 (2013).
89. Frank, D. N. *et al.* Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 13780–13785 (2007).
90. Atarashi, K. *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* **500**, 232–236 (2013).

91. Atarashi, K. *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* (80-. ). **331**, 337–341 (2011).
92. Henao-Mejia, J. *et al.* Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* **482**, 179–185 (2012).
93. Hamady, M., Lozupone, C. & Knight, R. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *ISME J.* **4**, 17–27 (2010).
94. Turque, A. S. *et al.* Environmental shaping of sponge associated archaeal communities. *PLoS One* **5**, e15774 (2010).
95. Sonnenberg, G. F., Fouser, L. a & Artis, D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat. Immunol.* **12**, 383–390 (2011).
96. Burger-van Paassen, N. *et al.* Mucin Muc2 deficiency and weaning influences the expression of the innate defense genes Reg3 $\beta$ , Reg3 $\gamma$  and Angiogenin-4. *PLoS One* **7**, 1–11 (2012).
97. Sugimoto, K. & Ogawa, A. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* **118**, 534-544(2008).
98. Naaber, P. Inhibition of *Clostridium difficile* strains by intestinal *Lactobacillus* species. *J. Med. Microbiol.* **53**, 551–554 (2004).
99. Tang, C. *et al.* Inhibition of Dectin-1 Signaling Ameliorates Colitis by Inducing *Lactobacillus*-Mediated Regulatory T Cell Expansion in the Intestine. *Cell Host Microbe* **18**, 183–197 (2015).
100. Devkota, S. *et al.* Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in *Il10*<sup>-/-</sup> mice. *Nature* **487**, 104-108(2012).
101. Thomas, C., Pellicciari, R., Pruzanski, M., Auwerx, J. & Schoonjans, K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 678–693 (2008).
102. Kobayashi, K., Kan, M., Yamane, I., Ishii, M. & Toyota, T. Primary culture of human gallbladder epithelial cells. *Gastroenterol. Jpn.* **26**, 363–369 (1991).