

論文の内容の要旨

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

【背景・目的】

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で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。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知られている。

近年、腸内細菌叢は全身の免疫応答を制御する重要な内在性因子として注目され、特に炎症性腸疾患との関連が強く示唆されている。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、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。腸内細菌由来の分子は宿主の細胞に発現するパターン認識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ており、これまでの研究から腸炎の抑制に関わる種々のパターン認識受容体やサイトカインが特定されてきたが、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。

当研究室では I 型インターフェロン (I 型 IFN) および IL-33 を誘導することが分かっていた Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors (RLRs) 経路に着目し、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、腸炎の制御機構を解析した。その結果、IRF3 欠損マウスでは dextran sodium sulfate (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 thymic stromal lymphopoietin (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 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、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 stimulator of IFN genes protein (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分かった。これらの検討より、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 Toll-like receptor (TLR) 等を活性化することは知られているが、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。そのため、上記の結果は腸内に非常に興味深い未知の核酸輸送機構が存在することを示唆している。

そこで本研究では、未知の腸内核酸取り込み機構に着目し、腸内細菌由来の核酸が腸炎を抑制する機構を解明することを目的とした。

【結果】

はじめに、糞便中の核酸が IRF3 を介した遺伝子誘導を引き起こすかどうかを検討した。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 を刺激したときの *Tslp* mRNA と *Il33* mRNA の発現誘導を解析したところ、いずれのヌクレアーゼ処理もこれらの発現誘導を完全に抑制できないことが明らかになった。この結果より、糞便中の核酸は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繋がっている可能性が示唆された。また、マウスの糞便から抽出した核酸単独では *Tslp* mRNA と *Il33* 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これらの遺伝子が誘導されることも明らかになった。以上の結果より、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。

そこで、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報告されていたサーファクタントプロテイン D (surfactant protein D, SP-D) に着目し、さらに解析を行った。細菌が産生するセカンドメッセンジャーで、STING のリガンドである c-di-GMP と 3'-3' cGAMP を用いてマウスの腹腔滲出細胞 (PEC) への刺激を行ったところ、SP-D の共刺激は 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明らかとなった。

続いて、SP-D によるこのような核酸取り込み機構の生理的重要性について解析を行った。まず、消化器系における *Sftpd* mRNA の発現を qRT-PCR にて解析した。続いてマウスの糞便懸濁液を解析したところ、WT マウスの糞便からは SP-D が検出されたことから、SP-D は腸管へ分泌

していることも示唆された。さらに、SP-D 欠損マウスは WT マウスと比較して DSS 誘導性大腸炎が有意に悪化することも明らかとなったが、両マウスの腸管における *Tslp* mRNA、*Il33* mRNA、*Ifnb* mRNA の発現レベルには有意差が見られなかった。これらの結果から、今回観察された SP-D 欠損マウスにおける大腸炎の悪化は、少なくとも STING-IRF3-TSLP/IL-33/IFN β シグナルの異常によるものではないことが示唆された。すなわち、SP-D 欠損マウスで見られる大腸炎の悪化と SP-D による核酸の取り込み機構との間には関連がないことが示唆され、SP-D の別の機能が大腸炎を抑制していると考えられた。

核酸の取り込み以外の SP-D の機能としては、細菌の増殖制御が知られている。そのため次に SP-D が腸内細菌叢の構成に与える影響について検討した。その結果、WT マウスと SP-D 欠損マウスは腸内細菌叢の構成に差があることが明らかになり、特に SP-D 欠損マウスにおける *Lactobacillus murinus* の増加と *Clostridium* 属細菌の減少が顕著であった。系統樹解析の結果から、SP-D 欠損マウスで減少していた *Clostridium* 属細菌はすべて、制御性 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) の誘導に関与する cluster 4 あるいは cluster 14a のいずれかに属することも明らかとなり、SP-D 欠損マウスでは定常状態における Treg の割合も減少していることが示された。さらに、*Clostridium* 属細菌によって誘導され腸炎を抑制することが知られている IL-22 や、抗菌ペプチドである RegIII β の産生についても、SP-D 欠損マウスの大腸において減弱していることが示された。以上の結果より、SP-D は腸内細菌叢を介して Treg の誘導や IL-22、RegIII β の産生を引き起こし、腸炎の抑制に寄与していることが示唆された。

【考察】

本研究では SP-D の産生細胞を同定し、SP-D が腸管へ分泌されていることを明らかにした。さらに消化管において SP-D が果たす全く新しい生理的機能として、SP-D による腸内細菌叢の制御を介した腸炎抑制機構を発見した。腸内細菌叢は全身の免疫応答の制御に深く関与することから、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ことが期待される。