

論文の内容の要旨

論文題目 腸管内微生物による免疫応答調節機構の解析

氏名 三木 祥治

生体は外部から侵入した病原体を非自己として認識し、排除する機構として免疫系を有している。免疫系は脊椎動物を始め無脊椎動物や植物など様々な生物に保持されている自然免疫系と、脊椎動物と無顎類のみが有する獲得免疫系の大きく二つの機構に分けられる。自然免疫系は感染初期の応答として迅速に働く比較的特異性の低い応答である一方、獲得免疫系は感染後期に働き、抗原特異的な応答を担っている。自然免疫系においては、特にマクロファージや樹状細胞等の抗原提示細胞において高発現している Toll 様受容体をはじめとしたパターン認識受容体 (pattern recognition receptor : PRRs)が、応答の惹起に重要な役割を果たすことが分かっている。PRRs はウイルスやバクテリアなどの病原体に特徴的な分子パターン (pathogen associated molecular pattern : PAMP)を認識することで下流のシグナル経路を活性化し、抗ウイルス応答に必須とされる I 型インターフェロン (IFN)や様々な炎症性サイトカインの遺伝子発現を誘導することで、病原体に対する生体防御応答を活性化する。また、自然免疫応答の活性化は様々なサイトカインの産生に加えて樹状細胞の成熟化等をも引き起こし、適応免疫応答の活性化にも重要な役割を果たしている。そのような PRRs の一種として、retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptor (RLR)経路が知られており、この経路は細胞質内の非自己由来の核酸を認識することで抗ウイルス応答に重要な I 型 IFN を強力に誘導することなどが知られている。

こうした自然免疫応答の解析は外来の非自己である病原体を対象に発展してきたが、近年は生体に内在する非自己である腸内細菌叢に対する応答に注目が集まっている。腸内細菌叢は主に細菌を中心とした常在微生物の集団であり、ヒトでは約 10^{12} 個の細菌が腸内に存在すると考えられている。一方で、腸管は生体内で最も多くの免疫細胞を保持する重要な器官でもあり、全身の 70-80%もの免疫細胞が腸内に存在している。そのため、腸管内では細菌叢と免疫系の大規模な

相互作用が定常的に引き起こされながら恒常性が保たれており、このようなバランスが崩れると腸管内の炎症や傷害に止まらず、全身性の免疫応答に異常をきたし、疾患の発症に繋がるということが分かっている。

このような腸管内の恒常性維持において、自然免疫系が重要な役割を果たすことが最近の研究で明らかにされている。すなわち、腸管の管腔内には腸内細菌、食物、死細胞由来の免疫原性を持つ成分が大量に存在するため、大腸の上皮細胞や Lamina Propria (LP) 中の抗原提示細胞は腸内容物に由来する PAMPs 及び Damage-associated molecular patterns (DAMPs) に暴露され、PRRs 経路を活性化させると考えられる。中でも腸管内核酸成分の認識が腸内の恒常性維持に寄与することが示唆されており、dsRNA 等の認識受容体である RIG-I やそのアダプター分子である mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) の遺伝子欠損マウスにおいて、Dextran Sulfate Sodium (DSS) 誘導性の大腸炎が増悪することが報告されている。しかしながら、これら核酸認識受容体の大腸炎抑制における重要性はわかっているものの、その核酸リガンドの由来や下流で引き起こされる抗炎症機構についての詳細な解析はなされていない。一方で、樹状細胞やマクロファージから産生されるサイトカインの中には TSLP、IL-33、I 型 IFN 等の大腸炎を抑制する分子が存在することが報告されている。

そこで本研究はまず、腸内容物による腸炎抑制性サイトカイン遺伝子の発現機構の解明を推進した。

TSLP、IL-33、I 型 IFN はそれぞれ RLR 経路下流で誘導されることが知られていることから、これらの腸炎抑制に関わるサイトカインの発現制御機構について、RLR 下流の遺伝子発現に最も重要な役割を果たす転写因子の一つである IRF3 (interferon regulatory 3) に着目し、解明を試みた。すると腸管内容物による刺激および、核酸刺激により、TSLP 及び IL-33 の遺伝子誘導が IRF3 依存的に生じることが明らかになった。また、IRF3 を介した遺伝子誘導機構の大腸炎における生理的重要性を確認するため、DSS 誘導性大腸炎モデルを用いて、*Irf3* 欠損マウスの感受性を検証したところ、*Irf3* 欠損マウスは野生型マウスと比較して DSS 誘導性大腸炎に強い感受性を示すことを明らかにした。このような結果から、腸内には細胞質内核酸認識経路を活性化する核酸成分が存在しており、IRF3 を介して TSLP 及び IL-33 の遺伝子誘導を活性化することで、大腸炎を抑制することが示唆された。

次に、このような腸炎抑制機構の全貌を解明するため、核酸認識受容体経路を

活性化する腸内因子の探索を行った。腸管に常在細菌のいない Germ Free (GF) マウスの腸管内容物を用いて細胞を刺激し、TSLP 及び IL-33 の誘導を解析したところ、いずれの遺伝子誘導も確認できなかったことから、これら遺伝子の誘導には、腸内細菌またはそれに付随して存在する微生物が必要であることが示唆された。

近年の研究では、腸管内で特定の免疫応答を惹起する腸内細菌の同定が勢力的に進められており、腸炎の抑制に寄与する細菌の存在も明らかにされている。特定の腸内細菌が獲得免疫系を介して腸炎の制御に関わることが報告される一方で、特定の自然免疫応答を制御する腸内細菌の探索、研究はあまりなされていない。

そのため、まず腸内細菌に着目し、腸炎抑制性サイトカインの遺伝子発現を活性化する菌の探索し、単離に成功した。さらに、これらの菌による遺伝子誘導能が、菌の plating、培養を重ねることで変動することが分かった。

上述の検討で示した、GF マウスの糞で TSLP 等の遺伝子誘導が起きない原因としては、腸内細菌だけでなく、それに付随する微生物の不在が原因である可能性も考えられる。すなわち、無菌マウスの腸内では細菌の除去に伴い、それを宿主とするファージも排除されることから、次に私は核酸認識受容体経路を活性化する可能性のある腸内因子として、ファージをその候補と考え探索を行った。

細菌に対するウイルスであるバクテリオファージ(ファージ)については、ヒトの腸内に存在することが報告されており、宿主を害さない形で常在していることが報告されている。ファージの生理的意義については未だ不明であり、宿主の免疫系に対して影響を与えることを示した報告はないが、マウスへのファージの大量投与がファージの標的細菌を減少させることが報告されており、そのような細菌量の変動を介して、間接的に免疫応答を制御する可能性は示唆されている。さらに、ヒト大腸炎患者の腸内で増加しているファージの存在も報告され、一方では、ファージに由来する核酸が核酸認識受容体経路を活性化する可能性も議論されている。このように腸内の恒常性維持にファージが関与する可能性が示唆され、注目を集めつつあることから、常在ファージの研究は腸管免疫研究分野において次に取り組むべき重要な課題の一つであると考えられるが、実際にファージの生理的重要性を証明した報告はない。

そのため、私はファージの免疫応答における生理的意義を解析するため、実際にマウスに常在しているファージとその宿主である常在細菌の単離を行った。

すると、マウス糞便から、*Enterococcus gallinarum* (En.G)及び *E. gallinarum* に感染可能な新規ファージ(E.G.ファージ)の単離に成功した。

次にこれらを用い、免疫細胞を刺激したところ、En.G と E.G.ファージで共刺激した際の IL-6 等の炎症促進に寄与するサイトカインの遺伝子誘導が、En.G 単独および E.G.ファージ単独刺激と比較して、顕著に亢進することが明らかになった。また、菌を溶菌させるような薬剤と En.G による共刺激による IL-6 の遺伝子発現誘導の解析から、この遺伝子誘導の増強が En.G の溶菌により増強されることが示唆された。

最後に En.G と E.G.ファージの共在が、*in vivo* における大腸炎に寄与する可能性について検討を行った。DSS 投与による大腸炎誘導時の糞便中の En.G 数および E.G.ファージ数を観測したところ、control 群と比較して、DSS 投与群において優位に増加しており、また、DSS 投与群における体重減少や大腸での IL-6 遺伝子誘導と En.G 数及び E.G.ファージ数に相関があることが明らかになり、En.G 及び E.G.ファージが腸炎を増悪させる可能性が強く示唆された。さらに、En.G を持つようなマウスに E.G.ファージの投与したところ、E.G.ファージ投与群において、著明な DSS 誘導性大腸炎の増悪が見られた。これらの結果から、E.G.ファージが腸炎の増悪を引き起こすことが示された。

本研究は今後、バクテリオファージによる腸管免疫制御法の開発に貢献できる可能性がある。