

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 Th17 細胞及び ILC2 の誘導機構の解明

氏名 永野 勇治

消化管は栄養分や水分を吸収する器官としての役割をもつ一方で、異物の侵入に対して生体防御の第一線的バリアとして働く。日常的に様々な微生物が侵入する危険にさらされているため、消化管粘膜免疫系は侵入してくる病原体を即座に排除するために、常に活性化状態に保ち備えている。一方、腸管は約 1000 種 100 兆個の腸内細菌や食事由来の外來抗原に常にさらされており、腸内細菌や食事由来成分が様々な慢性疾患と密接な関係にあることが明らかになっている。しかし、これら環境因子と宿主免疫系の関係について、その詳細は明らかになっていない。そこで、本研究において、第一部ではマウス腸管におけるヘルパーT 細胞誘導メカニズムについて解析を行った。また、第二部では食事成分による自然リンパ球に及ぼす影響について解析を行った。

#### 第 1 部 Th17 細胞の誘導

Th17 細胞はインターロイキン (IL) -17 を産生するヘルパーT 細胞であり、肺炎桿菌や病原性大腸菌、黄色ブドウ球菌などの感染防御に必須の役割を果たす。一方で、Th17 細胞の過剰な活性化は多発性硬化症や関節リウマチ、慢性炎症疾患など自己免疫疾患の発症や増悪につながる。所属研究室では、これまでにセグメント細菌 (SFB、segmented filamentous bacteria) が Th17 細胞の分化を強力に誘導することを示した。SFB は腸管上皮細胞に強く接着して生存することを特徴としており、この接着により血清アミロイド A など炎症性タンパク質の産生を誘導し、それが Th17 細胞の分化につながると考えられている。そこで、本章では微生物の接着が Th17 細胞誘導をひき起こすという仮説のもと、様々な微生物を用いて検討を行った。

病原性大腸菌 *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) は、ヒト腸管病原性・腸管出血性大腸菌に類似したマウスの腸管病原細菌で、腸管の粘膜に接着・増殖し、Th17 細胞を誘導する。無菌マウスに野生株と上皮細胞接着に必須の因子であるインチミンをコードする *eae* 遺伝子を欠損した  $\Delta eae$  株の *C. rodentium* を経口投与で感染させた。投与 5 日後において、野生株感染マウスでは、細菌の大腸上皮への接着及び大腸粘膜固有層における Th17 細胞の誘導が見られたのに対し、 $\Delta eae$  株感染マウスでは、細菌が大腸上皮に接着しておらず、Th17 細胞の誘導が見られなかった。これにより、病原細菌の接着によって Th17 細胞が誘導されることが示唆された。

*C. rodentium* による Th17 細胞誘導機構を探るために、野生株または  $\Delta eae$  株を無菌マウスに投

与し 5 日後のマウスから大腸上皮細胞を回収し、RNA-seq 法で遺伝子発現解析を行った。 $\Delta eae$  株感染マウスに対し、野生株感染マウスでは活性酸素種 (ROS) 産生に関わる *Duox2*、*Duoxa2*、*Nos2*、抗菌ペプチド *Reg3 $\beta$* 、*Reg3 $\gamma$*  の発現が顕著に高くなっていた。これらの結果から ROS によって Th17 細胞が誘導されることが示唆された。

腸管出血性大腸菌 O157:H7 (O157) は、腸管の粘膜に接着・増殖し、志賀毒素を産生することで溶血性尿毒症症候群を引き起こす大腸菌であり、公衆衛生の観点から世界的に関心の高い細菌である。細菌接着による Th17 細胞誘導の検証のために、Shiga toxin 1 (*stx1*)、Shiga toxin 2 (*stx2*) を二重欠損した  $\Delta stx1/\Delta stx2$  株または *stx1*、*stx2*、*eae* を三重欠損した  $\Delta stx1/\Delta stx2/\Delta eae$  株の O157 を無菌マウスに投与し、投与 3 週間後に解析を行った。 $\Delta stx1/\Delta stx2$  株感染マウスでは、細菌の大腸上皮への接着及び大腸粘膜固有層における Th17 細胞の誘導が見られたのに対し、 $\Delta stx1/\Delta stx2/\Delta eae$  株感染マウスでは、細菌が大腸上皮に接着しておらず、Th17 細胞の誘導が見られなかった。このことから、病原細菌が腸管上皮細胞に接着することによって、Th17 細胞が誘導されることが支持された。

*Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) は、感染した宿主の細胞内に寄生することが知られている細菌である。*L. monocytogenes* を無菌マウスに投与し、5 日後に解析した結果、Th17 細胞の誘導は見られないのに対し、Th1 細胞の誘導が見られた。このことから、細菌の組織への侵入では Th1 細胞が誘導されることが示唆された。

以上の結果から、病原微生物が腸管上皮細胞に接着することによって、腸管上皮における活性酸素種及び活性窒素種の発生を介して、粘膜固有層において Th17 細胞が誘導されることが示唆された。本研究の成果は、Th17 細胞の関与が知られている炎症性腸疾患などの自己免疫疾患の予知、また腸管粘膜面で効率的に Th17 細胞を誘導するワクチンの設計、さらには感染症治療に対するプロバイオティクス開発において医学的意義は高いと考えられる。

## 第 2 部 ILC2 の誘導

近年、自然リンパ球 (innate lymphoid cells、ILC) と呼ばれる細胞群が注目されている。ILC は腸管、肺、皮膚、肝臓、脂肪組織、腸間膜リンパ節といった組織で重要な役割を果たすことが知られており、リンパ組織よりも腸管や肺といった粘膜面に多く存在する。ILC はサイトカインの産生能や発達に必要な転写因子にもとづき、ILC1、ILC2、ILC3 の 3 グループに分類されている。2 型ヘルパー T (Th2) 細胞の生物学的役割と同様に、ILC2 は寄生虫感染に対する防御やインフルエンザウイルス感染後の組織修復に関わっている。しかし、定常時の腸管における ILC2 の詳細や環境因子による ILC2 への影響については未だ明らかになっていない。そこで、本章では、大腸 ILC2 の特性の理解を通じて、食事成分や腸内細菌による ILC2 への影響の検討を行った。

定常時の腸管 ILC2 の特徴を解析するために、大腸及び肺の ILC2 の比較を行った。ILC2 からの IL-5 産生は大腸と肺の間で顕著な差は見られなかったが、肺 ILC2 と比較して大腸 ILC2 は

KLRG1 陽性で、IL-4 産生が高かった。ILC2 の遺伝子発現の比較を行うために、大腸と肺の ILC2 を回収し、RNA-seq 法で検討した。肺 ILC2 と比較して、大腸 ILC2 で有意に発現が高く ILC2 に関連した遺伝子は *Il17rb*、*Il4*、*Klrg1* であった。これまでに、炎症によって KLRG1 陽性の ILC2 が誘導されるという報告があることから、定常時において肺の ILC2 はナイーブ型（肺型）であり、大腸粘膜固有層の ILC2 は炎症型（大腸型）であることが示唆された。次に、個体の成長過程における ILC2 の解析を行った。2 週令の大腸 ILC2 は KLRG1 が陰性で IL-4 が低産生であるのに対し、4 週令及び 9 週令の大腸 ILC2 は KLRG1 陽性で IL-4 が高産生であった。これらの結果から、大腸 ILC2 は、2 週令では肺型の傾向を示すのに対し、4 週令及び 9 週令では大腸型であることが示唆された。

大腸 ILC2 の大腸型化は、2 週令と 4 週令の間に起こるイベント、または大腸と肺の違いによって引き起こされることが予想された。すなわち、大腸 ILC2 の大腸型化は離乳に伴う摂食や腸内細菌による影響をうけると考えられた。そこで、まず腸内細菌の存在しない無菌マウスと特定病原体は存在しないが常在細菌は存在する Specific Pathogen Free(SPF)マウスを用いて腸内常在細菌による大腸 ILC2 への影響の検討を行った。SPF マウスと無菌マウス間で大腸 ILC2 の KLRG1 の発現強度に顕著な差は見られなかったが、無菌マウスでは大腸 ILC2 からの IL-4 の産生が減少傾向であった。次に、SPF マウスと無菌マウスの大腸 ILC2 を RNA-seq 法で遺伝子発現の比較検討を行った。SPF マウスと GF マウスの ILC2 間で、特徴的な ILC2 に関連する遺伝子はなかった。以上の結果から、腸内細菌による ILC2 の分化・誘導、機能への影響は低いと考えられた。

次に、食事による影響の検討を行うために、様々な食事成分を含まない餌を作製し、それらをマウスに給餌させ、4 週間後に解析を行った。コントロール食群と比較して、全ビタミン欠乏食群で大腸 ILC2 からの IL-4 産生が減少していた。また、全ビタミン欠乏食群にビタミン B1 を飲水投与することで、大腸 ILC2 からの IL-4 産生が一部回復した。ビタミン B1 による大腸 ILC2 の IL-4 産生に及ぼす影響を評価するために、ビタミン B1 欠乏食を作製し、マウスに給餌させ、4 週間後に解析を行った。コントロール食群と比較して、ビタミン B1 欠乏食群では著明に大腸 ILC2 からの IL-4 産生が減少していた。以上の結果から、大腸 ILC2 の大腸型化に食事由来のビタミン B1 が関与することが示唆された。

以上の結果から、定常時において大腸 ILC2 は KLRG1 高陽性、IL-4 高産生であった。これらの特性から、定常時においても大腸 ILC2 が炎症型（大腸型）であることが示唆された。また、食事成分の 1 つであるビタミン B1 が大腸 ILC2 の大腸型化に関わることが示唆された。ビタミン B1 は他のビタミンと協調して、様々な代謝経路に関わることが知られており、これらの観点も踏まえて、様々な食事成分や腸内細菌による代謝産物を介した宿主免疫系の恒常性維持機構を明らかにすることは、食物アレルギーに対する新規治療法の開発に向けた分子基盤の確立に繋がるものと考えられる。