

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 永野 勇治

本研究の第一部においては、粘膜バリアの恒常性維持において重要な役割を果たす Th17 細胞の誘導機構を明らかにするために、無菌マウスに特定の微生物を投与する系にて、微生物の上皮への接着が Th17 細胞誘導のトリガーとなるか解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 無菌マウスに、野生株または *eae* を欠損した株 (Δeae) の *C. rodentium* を感染し 5 日後において、野生株 *C. rodentium* 感染マウスでは細菌の大腸上皮への接着が観察されたのに対し、 Δeae 株 *C. rodentium* 感染マウスでは細菌の大腸上皮への接着が観察されなかった。また、大腸粘膜固有層における Th17 細胞は、 Δeae 株 *C. rodentium* 感染マウスに対し、野生株 *C. rodentium* 感染マウスで有意に誘導されていた。これにより、*C. rodentium* 感染においては細菌の接着によって Th17 細胞が誘導されることが示された。
2. 野生株または Δeae 株 *C. rodentium* を無菌マウスに感染し 5 日後の大腸上皮細胞を用い、RNA-seq 法で解析を行ったところ、野生株 *C. rodentium* 感染マウスでは活性酸素種や活性窒素種 (ROS) の発生に関与する *Duox2*、*Duoxa2*、*Nos2* の発現が上昇していた。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。
3. 無菌マウスに、志賀毒素 *stx1*、*stx2* 欠損 $\Delta stx1\Delta stx2$ 株 ($\Delta stx1\Delta stx2$ 株) または *stx1*、*stx2*、*eae* 欠損株 ($\Delta stx1\Delta stx2\Delta eae$ 株) の腸管出血性大腸菌 O157:H7 (O157) を感染し 3 週間後において、 $\Delta stx1\Delta stx2$ 株 O157 感染マウスでは細菌の大腸上皮への接着が観察されたのに対し、 $\Delta stx1\Delta stx2\Delta eae$ 株 O157 感染マウスで

は細菌の大腸上皮への接着が観察されなかった。また、大腸粘膜固有層における Th17 細胞は、 $\Delta stx1\Delta stx2\Delta eae$ 株 O157 感染マウスに対し、 $\Delta stx1\Delta stx2$ 株 O157 感染マウスで有意に誘導されていた。このことから、O157 感染においても細菌の接着により Th17 細胞が誘導されることが支持された。

4. 無菌マウスに、細胞内寄生菌 *L. monocytogenes* を感染し 5 日後では、無菌マウスと比較して、大腸粘膜固有層において Th17 細胞が誘導されていなかったのに対し、Th1 細胞が誘導されていた。これらの結果から、細胞内寄生細菌の感染においては Th1 細胞の誘導が見られるのに対し、細胞外寄生細菌の感染においては細菌の上皮への接着がトリガーとなり、ROS の産生を介して、Th17 細胞が誘導されることが示された。

また、本研究の第二部においては、常在細菌や食事成分が大腸に存在する 2 型自然免疫リンパ球 (ILC2) に及ぼす影響を明らかにするために、特殊飼料をマウスに給餌する系や無菌マウスを用いて解析を試みており、以下の結果を得ている。

1. 定常時の大腸または肺の ILC2 をフローサイトメトリー法で比較すると、大腸 ILC2 では IL-4 の産生が高かった。また、大腸 ILC2 と肺 ILC2 の遺伝子発現の比較を RNA-seq 法で行うと、大腸 ILC2 で *Il4* の発現が高かった。次に、2 週令または 4 週令、9 週令のマウスの ILC2 をフローサイトメトリー法で比較すると、2 週令マウスの大腸 ILC2 は IL-4 低産生性であったのに対し、4 週令及び 9 週令マウスの大腸 ILC2 は IL-4 高産生性であった。これらの結果から、組織間の違いや週令間の違いによって ILC2 の IL-4 産生能が異なることが判明した。
2. 無菌マウスと SPF マウスの大腸 ILC2 の遺伝子発現を RNA-seq 法で比較すると、*Il4* の発現に有意な差はなかった。また、フローサイトメトリー法を用いた解析において、無菌マウスでは大腸 ILC2 の IL-4 産生が減少傾向にあった。これらの結果から、腸内細菌が大腸 ILC2 の IL-4 産生に及ぼす影響は低いことが明らかとなった。

3. コントロール食またはビタミン B1 欠乏食を給餌したマウスの大腸 ILC2 をフローサイトメトリー法で比較すると、ビタミン B1 欠乏食群では大腸 ILC2 の IL-4 産生が減少していた。また、RNA-seq 法を用いて、コントロール食群及びビタミン B1 欠乏食群の大腸 ILC2 の遺伝子発現を比較すると、ビタミン B1 欠乏食群では大腸 ILC2 の *Il4* の発現が有意に減少していた。これらの結果から、食餌由来のビタミン B1 が大腸 ILC2 の IL-4 産生に影響を及ぼすことが示唆された。
4. 大腸 ILC2 を Ionomycin のみで刺激すると、ILC2 からの IL-4 産生が確認された。また、CNS2 領域欠損マウスと HS2 領域欠損マウスの大腸 ILC2 をフローサイトメトリー法を用いて解析したところ、ILC2 からの IL-4 産生が減少していた。これらの結果から、大腸 ILC2 からの IL-4 の産生にはカルシウムシグナル、CNS2 領域、HS2 領域が関与することが示唆された。

以上、本論文は第一部において、細菌が腸管上皮細胞に接着すると、ROS の産生が促進し、粘膜固有層において Th17 細胞が誘導されることを見出した。また、第二部において、定常時の大腸 ILC2 は食事由来のビタミン B1 の影響を受けて、IL-4 の産生が促進することを見出した。よって、この研究は環境中の細菌や食事成分が宿主免疫系に及ぼす影響の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。