

## 論文の内容の要旨

### 論文題目: マクロファージガラクトース型 C 型レクチン (MGL) 1 を介した大腸炎抑制機構の解明

氏 名: 佐波 謙吾

#### [序論]

マクロファージガラクトース型 C 型レクチン(MGL)はII型膜貫通型のレクチンで、C末端にある糖認識ドメインを介してカルシウム依存的に、単糖としてはガラクトースや N-アセチルガラクトサミンに結合する。マウスにおいては11番染色体上に二つの相同遺伝子 *Mgl1* および *Mgl2* が存在し、広範なオリゴ糖による解析により、MGL1はルイスX、MGL2はグロボシンド4に強く結合し、これらは互いに異なる糖鎖認識特異性を持つことが明らかとなっている。MGL1およびMGL2はマクロファージや未成熟樹状細胞上に発現することが明らかとなっており、マウス生体内では皮膚、大腸、肺などの結合組織に陽性細胞が観察されている。

大腸においてはMGL1およびMGL2陽性細胞は粘膜固有層および粘膜下層に観察され、これらの細胞はCD11b陽性、CD11c弱陽性、F4/80強陽性、MHCクラスII強陽性のマクロファージであった。大腸を含む消化管は食物抗原や常在性細菌に常に暴露されている組織であるが、通常、これらの抗原に対して免疫応答は起こらないように制御されている。この免疫制御機構が破綻するとクローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患(IBD)が発症すると考えられているが、その詳細な発症機構は不明であり、根本的な治療法も確立されていない。IBDの動物モデルとして、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導大腸炎が知られている。この大腸炎モデルにおいて *Mgl1*-KOは野生型マウスに比べて重篤な炎症を起こすことから、MGL1が大腸の炎症を抑制する機能を持つことが示唆された(図1)。これより、MGL1を介する大腸炎抑制の分子機構を明らかにし、それに基づいた大腸炎の治療を行うことを目的として研究を行った。

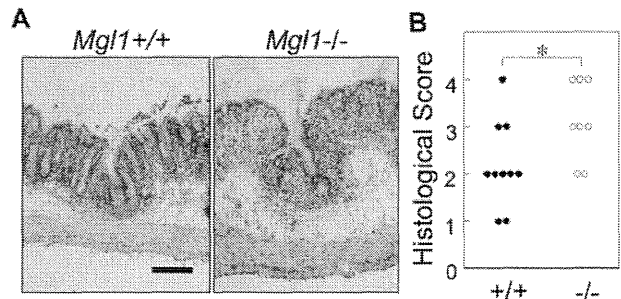


図1 DSS投与開始後7日目における *Mgl1*<sup>+/+</sup> マウスと *Mgl1*<sup>-/-</sup> マウスの大腸組織(A)と組織学的評価(B)。スケールバーは200  $\mu$ m。\*  $p < 0.05$

## [第1章] MGL1による大腸炎制御の分子機構

### 1.1 大腸炎の進行と大腸マクロファージの IL-10 産生

腸管のマクロファージは他の臓器のマクロファージよりも抑制性サイトカイン IL-10 の産生量が高いことが知られている。また、IL-10 を欠損するマウスは自発的に大腸炎を発症することから、IL-10 は大腸での免疫反応の制御に大きく寄与していると考えられている。そこで、

DSS 投与による大腸炎発症前(day 0)と炎症初期(day 2)における野生型マウスと *Mgl1*-KO 由来の MGL1 陽性大腸マクロファージを単離し、IL-10 mRNA 量を定量的 PCR によって比較した。その結果、大腸炎発症前は両者に差は見られなかったが、炎症初期では *Mgl1*-KO 由来の細胞は野生型よりも IL-10 mRNA 量が少なかった(図 2)。

これより、*Mgl1*-KO において、侵襲が発生した時に IL-10 の産生量が少ないことが大腸炎をより重篤にする要因であると考えられ、MGL1 が IL-10 の発現を正に制御する因子であることが示唆された。

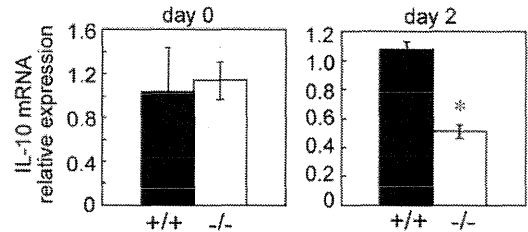


図 2 DSS 投与前(左)および投与開始後 2 日目(右)における大腸マクロファージの IL-10 mRNA 量。いずれも  $\beta$ -actin mRNA に対する相対量。  
\*  $p < 0.05$

### 1.2 MGL1 による常在性細菌の認識

DSS による大腸炎の発症には常在性細菌が大きく寄与することが報告されている。このことから、炎症時に腸管壁から浸潤する常在性細菌の中に MGL1 によって認識される細菌があると仮説を立てた。実際に大腸に浸潤した菌を単離するため、大腸炎を発症したマウスの腸管膜リンパ節をホモジェナイズし、培養を行った。単離された菌はグラム染色性、形態、選択培地上の生育より、*E. coli*、*Enterococcus*、*Streptococcus*、*Lactobacillus* であると考えられた。これらのうち、*Streptococcus* および *Lactobacillus* が MGL1 および MGL2 に結合性を示した。さらに 16S rRNA 配列解析の結果、前者は *S. thermophilus* に近縁の種であることが明らかとなった。

### 1.3 細菌認識による大腸マクロファージの応答

MGL1 を介する IL-10 産生誘導が、上皮細胞の傷害により浸潤してきた常在性細菌と MGL1 陽性細胞との相互作用によるという仮説を立て、それを検証することとした。マウスから単離された *Streptococcus* が MGL1 に結合することから、*Streptococcus* 加熱死菌体を加えて大腸マクロファージを 16 時間共培養し、IL-10 mRNA の産生を定量的 PCR 法により測定した。その結果、野生型マウス由来の大腸マクロファージは *Streptococcus* との共培養により IL-10 mRNA 量が増加したが、*Mgl1*-KO 由来の細胞ではその増加は見られなかった(図 3 A)。同様にして刺激した細胞を、抗 IL-10 モノクローナル抗体を用いて細胞染色を行い、タンパク質レベルでの検出を試みたところ、野生型マウス由来の細胞では染色強度が増加し、*Mgl1*-KO 由来の細胞では増強は見られなかった(図 3 B)。以上より、MGL1 と常在性細菌の相互作用により、抑制性サイトカイン IL-10 産生が亢進し、炎症の抑制に寄与していると考えられた。

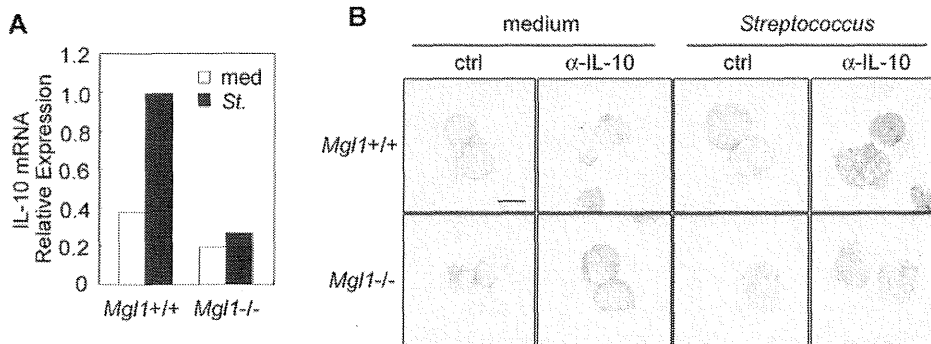


図 3 (A) *Streptococcus* 死菌体の存在下(St.)または非存在下(med)で *Mgl1*+/+ および *Mgl1*-/-マウス由来の大腸マクロファージを 16 時間培養後の IL-10 mRNA 量を  $\beta$ -actin mRNA に対する相対量で比較。(B) 抗 IL-10 抗体を用いた細胞染色による検出。ctrl はアイソタイプコントロールを示す。スケールバーは 10  $\mu$ m

## [第2章] 腸内細菌上の MGL1 結合成分の探索

### 2.1 MGL1 結合分子の検出

*Streptococcus* 上の MGL1 結合分子を同定するために、表面タンパク質を変成、遊離させる 2 M グアニジン塩酸(GuHCl)に加熱死菌体を懸濁し、37°C で 2 時間反応させた。その結果、グアニジン塩酸で処理した菌体は MGL1 に対する結合性が失われた(図 4 A)。さらに、菌体可溶化物とグアニジン塩酸抽出物を SDS-PAGE で展開し、MGL1 に対する結合をレクチンブロッティングで検討したところ、無処理の菌体可溶化物には MGL1 に結合する 15 kDa および 17 kDa の成分が確認されるのに対して、グアニジン塩酸処理後の菌体可溶化物にはその成分は消失していた(図 4 B, C)。同時に、グアニジン塩酸抽出物にその成分が検出されたことから、処理によって菌体表面から解離したと考えられた(図 4 C)。これらの成分に対して他のレクチンの結合性を検討した結果、ガラクトースまたは *N*-アセチルガラクトサミンに結合性を有するレクチン(PNA および VVA-B4)の結合が確認されたことから、15 kDa および 17 kDa の成分はこれらの糖または類似の糖が末端にある糖鎖を持ち、MGL1 に対する結合性を有する糖タンパク質であることが示唆された(図 4 D)。

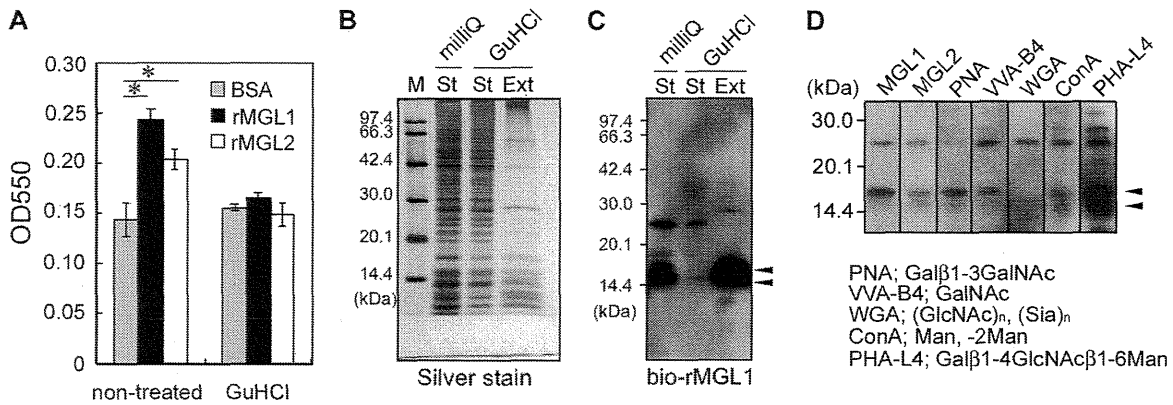


図 4 (A) グアニジン塩酸処理(GuHCl)による rMGL1/2 に対する結合への影響。\*  $p < 0.05$  (B) 精製水処理(milliQ)および GuHCl 処理後の菌体(St)および処理上清(Ext)の SDS-PAGE 展開。(C) ビオチン化組み換え MGL1 を用いたレクチンブロットによる結合タンパク質の検出。(D) ビオチン化組み換え MGL1、MGL2 およびビオチン化植物レクチンの GuHCl 抽出画分への結合。

### 2.2 *Streptococcus* の IL-10 誘導活性における表面タンパク質の寄与

*Streptococcus* による大腸マクロファージの IL-10 誘導における菌体表面タンパク質の寄与を評価するため、グアニジン塩酸処理をして MGL1 に対する結合性を失った *Streptococcus* を用いて野生型マウス由来の大腸マクロファージを刺激し、IL-10 mRNA 量を定量的 PCR 法により測定した。その結果、グアニジン塩酸処理後の死菌体による IL-10 誘導は精製水処理の菌体による誘導よりも有意に低かった(図 5 A)。それに対して、グアニジン塩酸抽出物を 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のタンパク質濃度(BCA 法による)で加えたものは IL-10 の誘導活性を示した(図 5 B)。これより、*Streptococcus* による大腸マクロファージの IL-10 転写誘導には、MGL1 と菌体表面糖タンパク質の相互作用が寄与していることが示唆された。

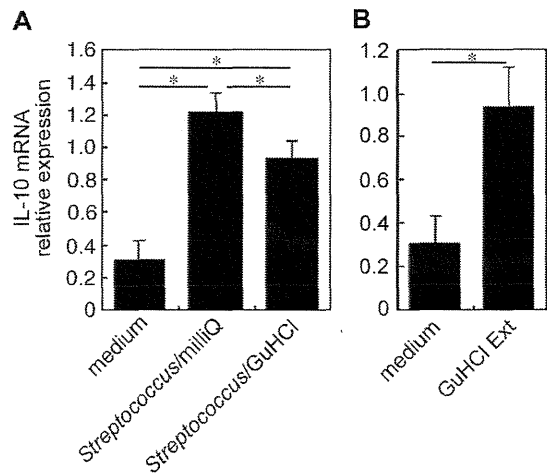


図 5 精製水(milliQ)または GuHCl で処理した死菌体 (*Streptococcus*)、GuHCl 抽出物(Ext)を加えて大腸マクロファージを 16 時間培養した後の IL-10 mRNA 量を  $\beta$ -actin mRNA に対する相対量で比較。\*  $p < 0.05$

### [第3章] MGL1/2 による乳酸菌群の認識と抗炎症効果

#### 3.1 乳酸菌に対する MGL1/2 の結合とサイトカイン誘導活性

プロバイオティクスとして知られる乳酸菌 8 株 (*L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. zeae*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. plantarum*) について、加熱死菌体に対する MGL1、MGL2 の結合性を解析した。その結果を表に示した。

これら 8 種類の乳酸菌株を加えて腹腔浸潤マクロファージを刺激し、そのサイトカイン産生を調べた。野生型マウス由来の細胞を用いたところ、IL-10、IL-12、NO 産生は表のような産生パターンを示した。IL-10 の産生量と、MGL1/MGL2 の結合強度の相関を調べた結果、これらの間には相関係数 0.80 を超える相関が見られた。しかし、*Mgl1*-KO、*Mgl2*-KO 由来の細胞を用いても、同様のサイトカイン産生を示したことから、これらの菌体の認識に伴うサイトカイン産生における MGL1/MGL2 の分子寄与は小さいと考えられた。

Species	binding		cytokine		
	MGL1	MGL2	IL-10	IL-12	NO
<i>L. casei</i>	±	±	±	++	++
<i>L. rhamnosus</i>	-	-	±	±	+
<i>L. zeae</i>	-	-	±	++	+
<i>L. gasseri</i>	+	-	+	±	+
<i>L. johnsonii</i>	+	-	±	±	-
<i>L. delbrueckii</i>	+	+	++	±	±
<i>L. helveticus</i>	-	-	±	-	-
<i>L. plantarum</i>	+	+	++	±	-

表 乳酸菌に対する MGL1/MGL2 の結合とサイトカイン産生  
結合は、+：結合した、-：結合しない。サイトカイン産生は、IL-10 ++: ≥ 300 pg/mL, +: ≥ 150 pg/mL, ±: ≥ 50 pg/mL、IL-12 ++: ≥ 1000 pg/mL, ±: ≥ 100 pg/mL、NO ++: ≥ 25 μM, +: ≥ 10 μM, ±: ≥ 5 μM。

#### 3.2 乳酸菌による大腸炎抑制効果

乳酸菌 4 種類 (*L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii*) を野生型マウスおよび *Mgl1*-KO に投与して、DSS 誘導大腸炎に対する軽減効果を評価した。その結果、高い炎症抑制効果をしめしたのは *L. rhamnosus* および *L. delbrueckii* 投与群で、*L. casei*, *L. gasseri* 投与群も下痢症状については軽減効果を示した。これらの効果は *Mgl1*-KO でも同様に見られ、軽減効果への MGL1 の寄与は見られなかった。

#### [結語]

本研究により、糖鎖認識分子 MGL1 と常在性細菌の相互作用により抑制性サイトカイン産生を通して大腸炎が軽減することが明らかとなった。常在性細菌を認識する受容体はこれまでに報告がなく、新しい概念による大腸炎の治療の可能性が見出された。MGL1 が認識する細菌上の成分として、糖タンパク質の存在が候補として挙げられ、この成分の作用により大腸細胞の抗炎症作用を増強させる可能性が示唆された。これまでも、乳酸菌をはじめとした細菌を利用した治療効果が報告されているが、その作用機序は不明であった。これらの菌に対して、MGL1 および MGL2 の結合性と腹腔浸潤マクロファージの IL-10 誘導活性に正の相関が見られたが、マウスへの投与実験では治療効果への MGL1 の寄与は確認されなかった。

#### [文献]

Saba, K., Denda-Nagai, K., Irimura, T., *Am J Pathol.*, 2009 Jan; 174(1):144-52., A C-type lectin MGL1/CD301a plays an anti-inflammatory role in murine experimental colitis.