

## 審査の結果の要旨

氏名 佐波 謙吾

「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」と題する本論文は、大腸固有層に分布するマクロファージ様細胞がその表面に発現するレクチンである MGL によって、上皮組織が傷害を受けることによって侵入した共生細菌を認識し、細菌に対する応答として起る炎症応答を抑制し、大腸炎の発症を回避している事を明らかにした経緯が述べられている。

MGL は 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糖鎖を認識結合するレクチンである。免疫細胞に発現する多様なカルシウム依存型の内在性レクチンの内で、単糖としてガラクトースや N-アセチルガラクトサミンに結合する性質を持つのは MGL が唯一のものである。学位申請者は大腸においては相同性の高い MGL1 と MGL2 を発現する細胞が粘膜固有層および粘膜下層に分布する事を見出し、これらの細胞が 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ることを明らかにした。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り、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が、その機構の全容は明らかでなかった。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、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かった。学位申請者は MGL1 を欠損するマウスを駆使し、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導大腸炎を IBD のモデルとして用いて、MGL1 が大腸の炎症を抑制する機能を持つことを明らかにした。MGL1 を介する大腸炎抑制の分子機構を明らかにできれば、それに基づいた新しい炎症性大腸炎の予防法と治療法を開発できると期待できる。

第 1 章では MGL1 遺伝子欠損マウスで炎症性大腸炎がより重篤になる原因を分子レベルで追求した結果が述べられている。学位申請者は先ず、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。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。次に、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ので、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、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。次に、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。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。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。

第 2 章では、腸内細菌である *Streptococcus* 上の MGL1 結合成分の探索を行った。

*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。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。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。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蛋白質であることが示唆された。

*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。それに対して、グアニジン塩酸抽出物を 10  $\mu$ g/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。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。

第 3 章では、MGL1/2 による乳酸菌群の認識と抗炎症効果について、特に乳酸菌に対する MGL1/2 の結合とサイトカイン誘導活性に注目して解析した結果が述べられている。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 の分子的な寄与は小さいと考えられた。さらに、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の評価した。その結果、高い炎症抑制効果を示したのは *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。

以上のように、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。これらの成果は免疫学、病態生化学に資するところが大きく、本研究を行った佐波謙吾は博士 (薬学) の学位を得るにふさわしいと判断した。