

論文の内容の要旨

論文題目: 大腸マクロファージによる腸内常在細菌の認識と炎症応答の抑制

氏名: 藏品 良祐

【序章】

腸管では、病原性寄生体と常在性細菌に対する宿主による認識と応答のバランスによって恒常性が保たれている。マクロファージガラクトース C 型レクチン 1 (MGL1) 遺伝子を欠損するマウス (*Mgl1*-KO マウス) では、実験的大腸炎が野生型マウスより重篤になる。腸管において MGL1 を発現している細胞は F4/80 および CD11b を高発現し、高い貪食能、非特異的エステラーゼ活性を有するマクロファージである。野生型マウス由来大腸マクロファージを腸内常在細菌である *Streptococcus sp.* の死菌体と培養すると抗炎症性サイトカインであるインターロイキン 10 (IL-10) の遺伝子発現が誘導されたが、*Mgl1*-KO マウス由来大腸マクロファージでは IL-10 の遺伝子発現が誘導されなかった。IL-10 の遺伝子発現を誘導する菌体の表面分子の実体は不明であり、シグナルを伝える経路も不明であった。

本研究は、MGL1 と結合する菌体分子の解明、MGL1 とそれに結合する分子の相互作用の重要性の確立、シグナル伝達を担う分子の解明を長期的目標とした。具体的には、MGL1 と相互作用する分子の精製方法を確立し、単一分子で IL-10 の産生誘導が起こるかを検証することを試みた。また、IL-10 の発現誘導に至るシグナル伝達経路を解明した。さらに乳酸菌の場合でも類似の結合性や IL-10 の産生誘導効果が見られるかを検証した。

第1章 MGL1による腸内常在細菌の認識およびMGL1結合性の分子の同定

1-1 大腸マクロファージのMGL1を介した腸内常在細菌 *Streptococcus sp.* の表面分子の認識によるIL-10の発現誘導

*Streptococcus sp.*の菌体刺激による大腸マクロファージのIL-10の遺伝子発現誘導が、菌体の表面分子と大腸マクロファージのMGL1との直接の相互作用の結果であるかを検討した。野生型マウス由来大腸マクロファージを抗MGL1モノクローナル抗体(LOM-8.7)、およびアイソタイプコントロール抗体の共存下で、菌体により刺激してIL-10の遺伝子発現に影響があるか否かを検討した。その結果、菌体刺激によるIL-10の遺伝子発現誘導はLOM-8.7の共存下で阻害された(図1)。以上の結果から、大腸マクロファージのMGL1が菌体の表面分子を認識して、IL-10の発現誘導が起きていることが示された。

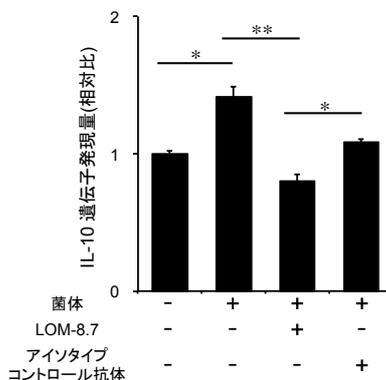


図1 大腸マクロファージのMGL1を介した腸内常在細菌 *Streptococcus sp.* の表面分子の認識によるIL-10の発現誘導
LOM-8.7を用いて野生型マウス由来大腸マクロファージのMGL1を阻害した時のIL-10の遺伝子発現 (n=2, *p<0.05, **p<0.01)

1-2 腸内常在細菌 *Streptococcus sp.*からのMGL1結合分子の同定

*Streptococcus sp.*からMGL1に結合する成分を抽出するために、菌体をグアニジン塩酸塩で処理し、抽出物中のMGL1結合成分をレクチンプロットングにより検討した。植物レクチンの中でインゲン豆レクチン(PHA-L₄)はMGL1と同様の結合パターンを示した(図2A)。この抽出物が大腸マクロファージのIL-10の遺伝子発現を誘導できるかを検討した。野生型マウス由来大腸マクロファージをこの抽出物で刺激するとIL-10の遺伝子発現が誘導された。一方、*Mgl1*-KOマウス由来大腸マクロファージではIL-10の遺伝子発現誘導の変化に有意な差はなかった(図2B)。また、この抽出中にはMGL1結合成分以外の成分も含まれているため、PHA-L₄アガロースビーズを用いてPHA-L₄に結合する成分を回収した(図2C)。その結果、回収した成分にはMGL1に結合性を示す成分が含まれることが明らかとなった(図2D)。現在、これらの成分については質量分析を行い、分子の同定および糖鎖構造の解析を行っている。

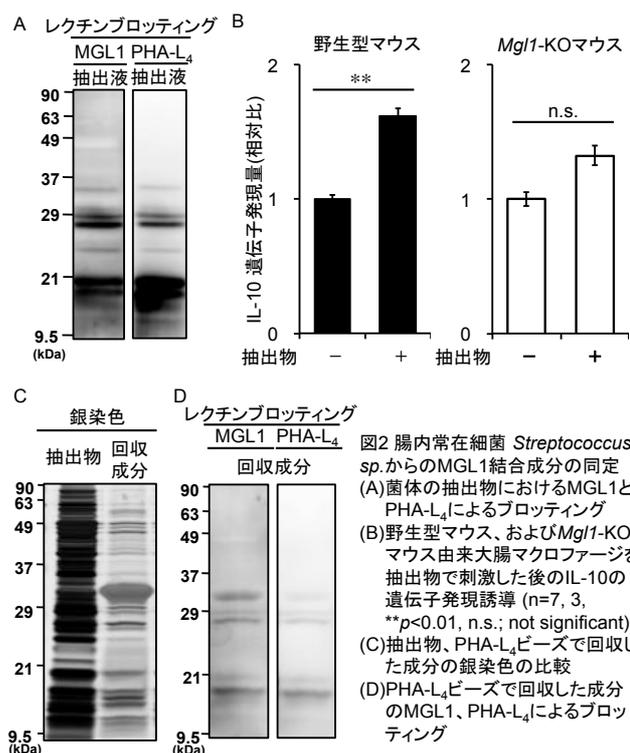


図2 腸内常在細菌 *Streptococcus sp.*からのMGL1結合成分の同定
(A)菌体の抽出物におけるMGL1とPHA-L₄によるプロットング
(B)野生型マウス、および*Mgl1*-KOマウス由来大腸マクロファージを抽出物で刺激した後のIL-10の遺伝子発現誘導 (n=7, 3, **p<0.01, n.s.; not significant)
(C)抽出物、PHA-L₄ビーズで回収した成分の銀染色の比較
(D)PHA-L₄ビーズで回収した成分のMGL1、PHA-L₄によるプロットング

第2章 腸内常在細菌によるIL-10の発現誘導に至るシグナル伝達経路の解明

MGL1は、細胞内ドメインにhem immunoreceptor tyrosine-based activation motif (hemITAM)を持つ。これまでにITAM関連受容体を介したシグナル伝達には、Spleen tyrosine kinase (Syk)を介してCaspase recruitment domain 9 (CARD9)を活性化すること

が知られている。また、菌体刺激による大腸マクロファージの IL-10 の発現誘導には、MGL1 が Toll 様受容体(Toll-like receptor, TLR)等と共役して働く可能性がある。そこで、これらの可能性を検証するために、TLR のアダプター分子である MyD88 の遺伝子を欠損したマウス(MyD88-KO マウス)や Card9 遺伝子を欠損したマウス(Card9-KO マウス)の大腸マクロファージを用いて、菌体刺激による IL-10 の遺伝子発現誘導が起こるか否かを検討した。その結果、MyD88-KO マウス由来大腸マクロファージでは菌体刺激により

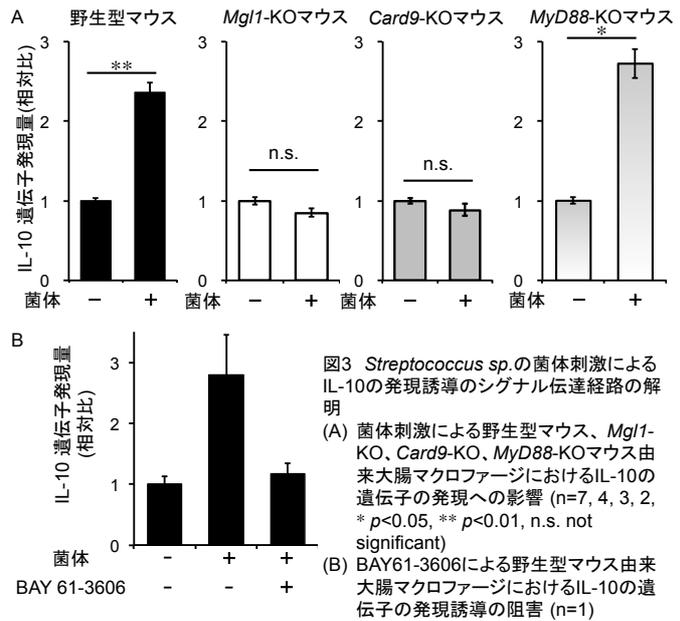


図3 *Streptococcus sp.*の菌体刺激によるIL-10の発現誘導のシグナル伝達経路の解明
(A) 菌体刺激による野生型マウス、Mgl1-KO、Card9-KO、MyD88-KOマウス由来大腸マクロファージにおけるIL-10の遺伝子の発現への影響 (n=7, 4, 3, 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. not significant)
(B) BAY61-3606による野生型マウス由来大腸マクロファージにおけるIL-10の遺伝子の発現誘導の阻害 (n=1)

IL-10 の遺伝子発現が誘導されたが、Card9-KO マウス由来大腸マクロファージでは菌体刺激により IL-10 の遺伝子発現が誘導されなかった(図 3A)。さらに、野生型マウス由来大腸マクロファージに BAY61-3606(Syk 阻害剤)を添加した後、菌体刺激を行い、IL-10 の発現誘導が阻害されるか否かを検討した。その結果、BAY61-3606 で前処理した場合には菌体刺激による IL-10 の遺伝子発現誘導が阻害された(図 3B)。以上の結果から、菌体刺激による IL-10 の遺伝子発現の誘導は MGL1 依存的にシグナルを伝え、Syk、CARD9 のシグナル伝達経路を介して起きており、MyD88 を介する TLR からのシグナル伝達は関与しないことが示された。

第3章 各乳酸菌株の MGL1 に対する結合と IL-10 の発現誘導活性

乳酸菌の投与によりヒトの大腸炎の改善効果が報告されている。乳酸菌 (*L.casei*、*L.rhamnosus*、*L.gasseri*、*L.delbrueckii subsp. brugaricus*) が、MGL1 に結合するか否かを組換え MGL1(recombinant MGL1: rMGL1)を用いて検討した。その結果、*L.casei*、*L.gasseri*、*L.delbrueckii subsp. brugaricus* は MGL1 に結合したが、*L.rhamnosus* は MGL1 に結合しなかった(図 4A)。次に MGL1 に対する結合性と大腸マクロファージの IL-10 の遺伝子発現に対する誘導活性に相関があるか否

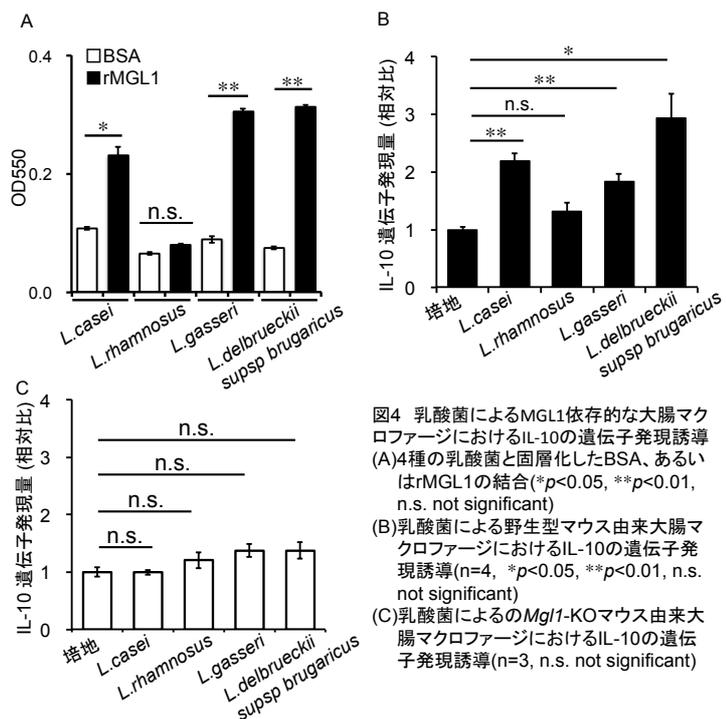


図4 乳酸菌によるMGL1依存的な大腸マクロファージにおけるIL-10の遺伝子発現誘導
(A)4種の乳酸菌と固層化したBSA、あるいはrMGL1の結合(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. not significant)
(B)乳酸菌による野生型マウス由来大腸マクロファージにおけるIL-10の遺伝子発現誘導(n=4, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. not significant)
(C)乳酸菌によるMgl1-KOマウス由来大腸マクロファージにおけるIL-10の遺伝子発現誘導(n=3, n.s. not significant)

かを検討した。野生型マウス、および *Mgl1*-KO マウス由来大腸マクロファージに、これらの乳酸菌を添加して IL-10 の遺伝子発現が誘導されるかを検討した。その結果、野生型マウス由来大腸マクロファージを *L.casei*、*L.gasseri*、*L.delbrueckii subsp. Brugarius* と培養した場合には IL-10 の遺伝子発現が誘導された。一方、*L.rhamnosus* と培養した場合には、IL-10 の遺伝子発現誘導が起こらなかった(図 4B)。 *Mgl1*-KO 由来大腸マクロファージでは、乳酸菌による IL-10 の遺伝子発現誘導は起こらなかった(図 4C)。以上の結果から、これらの乳酸菌は大腸マクロファージにおいて MGL1 依存的に IL-10 の遺伝子発現を誘導し、乳酸菌による大腸炎の改善効果に大腸マクロファージの MGL1 を介する IL-10 の発現誘導が関与している可能性を示した。

【結語】

腸内常在細菌による大腸マクロファージの IL-10 の発現誘導は大腸マクロファージの MGL1 が菌体表面に存在する分子を認識して、Syk, CARD9 を介したシグナルを介して起こることを示した。MGL1 を発現する細胞が、これに対するリガンドとの結合によってサイトカイン遺伝子の転写活性化を誘導した初めての例であり、その機構を解明した意義は大きい。乳酸菌によっても MGL1 依存的に大腸マクロファージの IL-10 の遺伝子発現が誘導されることを示した。これらの知見は炎症性腸疾患の詳細なメカニズムの解明と治療法の開発に役立つと考える。