

令和元年5月29日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09327

研究課題名(和文)小腸粘膜防御因子DAOの腸内細菌と宿主による制御機構の解明

研究課題名(英文)Host-microbe interaction through innate immune factor DAO

研究代表者

笹部 潤平 (Sasabe, Jumpei)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：10398612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、小腸の粘膜防御因子であるD-アミノ酸化酵素DAOの制御機構、およびDAOによる宿主免疫調節機構について明らかにした。DAOは腸内細菌叢によって誘導され、MyD88やRIPK2などの一般的なパターン認識受容体の下流分子は誘導には関与しないことを見出した。また、DAOは細菌のD-アミノ酸を代謝することにより、(1) DAO感受性細菌によるT細胞依存的な獲得免疫系の賦活化、(2) 細菌性D-アミノ酸によるT細胞非依存的な獲得免疫系の容量増加、の2種類のメカニズムで宿主免疫の調節を行っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

D-アミノ酸は共生細菌によって産生される代謝物で、我々の腸内でも多く産生されている。小腸DAOはD-アミノ酸制御を介して腸内細菌の制御に関与していることが知られており、本研究では宿主獲得免疫調節に関与することを明らかにした。DAOの制御機構も本研究で一部明らかにし、DAOの制御やD-アミノ酸調節が腸内細菌や免疫調節に将来的に利用できる可能性があることを示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated expressional regulation of the mucosal innate defense factor D-amino acid oxidase, DAO, and immune modulation by DAO in mammals. We have shown that DAO expression was induced by commensal microbiota through non-canonical pathway that does not involve canonical signaling molecules, MyD88 or RIPK2. We have also found that D-amino acid metabolism by DAO regulates adaptive immune system: (1) activation of immune responses through T-cell dependent signals triggered by DAO-sensitive microbiota, and (2) increase capacity of the responses through T-cell independent signals.

研究分野：腸内細菌

キーワード：D-アミノ酸 共生細菌 小腸上皮 獲得免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の腸内は多様な外部環境に晒され、多種多様な微生物が共生している。腸管上皮は、微生物の構成成分など微生物特異的なパターンを認識し、免疫系を賦活化させることで、微生物との共生や病原性微生物の排除を行なっている。研究代表者らは、細菌細胞壁に含まれる D-アミノ酸の多くが細菌に特異的な分子であることを明らかにし、宿主の D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) による D-アミノ酸代謝が細菌叢調節に重要であることを明らかにしてきた。しかし、このように細菌-宿主相互関係に重要な DAO の調節機構および宿主免疫における役割は未解明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1) 腸管 DAO の発現調節機構、および(2) 宿主免疫構築における役割を明らかにすることが目的である。

## 3. 研究の方法

(1) 抗生剤投与モデル、無菌マウス、無菌マウスに対する細菌叢移植、によって DAO が細菌成分によって誘導されているか否かを明らかにした。さらに、その誘導メカニズムを明らかにするため、一般的なパターン認識機構の下流である MyD88 および RIPK2 KO マウスを用いて DAO 誘導機構を検討した。

(2) DAO 欠損マウスにおける免疫表現型を明らかにするために、DAO<sup>G181R/G181R</sup> マウスの腸管・骨髄・脾臓を解析した。また DAO に感受性・非感受性細菌叢の2種類を使って、免疫表現型が変化するか否かを解析した。さらに、変化を認めた表現型が T 細胞依存的吗否かを明らかにするため、T 細胞受容体 beta/delta 欠損 / DAO<sup>G181R/G181R</sup> マウスを作成し、表現型がどのように変化するかを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) DAO は腸内細菌誘導性

小腸 DAO は、ampicillin, neomycin, vancomycin の3剤混合投与によって発現は著しく低下し、また無菌マウスにおいても小腸 DAO は SPF マウスと比較して顕著に発現低下していた。ここに SPF マウスの菌叢を移植すると DAO 発現は野生型レベルまで誘導された。さらに、どのような菌種が DAO を誘導するのかを検討するため、streptomycin, vancomycin, ampicillin, neomycin それぞれ単剤で SPF マウスに投与したところ、いずれの抗生剤でも DAO 発現を抑制した。このことから、DAO 誘導には特定の菌種ではなく、細菌に共通した成分が作用している可能性が示唆された。無菌マウスに細菌成分である D-アミノ酸および、コントロールとして L-アミノ酸を投与したところ、L-アミノ酸にも軽度 DAO 誘導作用を認めたものの、D-アミノ酸は優位に DAO 発現を誘導した。

宿主側の DAO 誘導シグナル伝達機構を明らかにするため、まず菌体成分による DAO 誘導を想定してパターン認識機構 (特に TLR および NOD) による細菌認識シグナルが NF- $\kappa$ B を核移行させる過程に重要な MyD88 および RIPK2 に着目した。MyD88 KO マウスおよび RIPK2 KO マウスの腸管上皮の DAO 発現を確認したものの、野生型の発現レベルと同等であったことから、細菌による DAO 誘導には標準的なパターン認識機構を介さないことが示唆された。

## (2) DAO は宿主粘膜免疫調節分子

DAO<sup>G181R/G181R</sup> マウスは DAO 活性を全身性に欠損する。このマウスを用いて、腸管および骨髄、脾臓中の免疫細胞を FACS 解析したところ、DAO 欠損マウスでは腸管のみにおいて獲得免疫構築に異常を認めた。その際、小腸管腔内の細菌叢は野生型と比較して 100 倍程度増加しており、細菌の beta 多様性も変化していた。一方で、骨髄、脾臓には明らかな変化を認めなかった。次に、DAO 感受性の低い細菌叢をこの DAO 欠損マウスに移植したところ、このような獲得免疫構築には異常を認めなかった。したがって、DAO 感受性細菌は獲得免疫構築に重要な働きを有すると考えられる。一方、興味深いことに DAO 非感受性細菌を移植した DAO 欠損マウスは獲得免疫系の前駆細胞に有意な増加を認めたことから、DAO の代謝物は前駆細胞の増殖に関与している可能性が考えられた。

次に、このような DAO 感受性細菌による獲得免疫構築と DAO 代謝物による免疫前駆細胞の増殖が、T 細胞依存的に起こるか否かを明らかにするため、T 細胞受容体 beta/delta を欠損させた DAO 欠損マウスを作成した。T 細胞受容体欠損 DAO 欠損マウスに DAO 感受性細菌を移植したところ、DAO 欠損マウスで認められた獲得免疫構築異常が 90% 減弱したことから、DAO 感受性細菌は T 細胞シグナルを優位に利用して獲得免疫を制御していることが示唆された。一方で、T 細胞受容体欠損 DAO 欠損マウスに DAO 非感受性細菌を移植したところ、やはり獲得免疫構築異常は認めなかったものの、DAO 欠損マウスで認めた獲得免疫系の前駆細胞に有意な増加を認めた。これらのことから、DAO による細菌性 D-アミノ酸代謝は、T 細胞依存的および非依存的の 2 つの経路で獲得免疫の構築および前駆細胞制御に関与していることが示唆された。

さらに、DAO の代謝物による T 細胞非依存的な前駆細胞の制御メカニズムを明らかにするため、T 細胞受容体欠損 DAO 欠損マウスと T 細胞受容体欠損 DAO 野生型マウスの腸管上皮組織の遺伝子発現プロファイルを調べたところ、T 細胞受容体欠損 DAO 欠損マウスでは免疫応答に関連する遺伝子群が有意に増加していた。TNF-alpha、IFN-gamma、IL-1beta などの炎症性サイトカインや alarmin 遺伝子群が発現上昇していた。このようなことから DAO 代謝物は腸管上皮にサイトカインや alarmin 誘導を起こし、その結果として獲得免疫の前駆細胞の増殖を促しているものと考えられた。

以上の成果は、細菌性 D-アミノ酸に着目して、我々独自で有するマウスを用いて得られたものであり、これまでに知られていない宿主-微生物相互作用を明らかにすることができたと考えている。今後は、この D-アミノ酸を介した相互作用が免疫疾患などの病態生理学的な意義を明らかにして行きたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Sasabe Jumpei、Suzuki Masataka、Emerging role of D-amino acid metabolism in the innate defense、Frontiers in Microbiology、査読あり、9:933、2018。  
DOI:10.3389/fmicb.2018.00933.
2. Sasabe Jumpei、Suzuki Masataka、Distinctive roles of D-amino acids in the homochiral world: chirality of amino acids modulates mammalian physiology and pathology、Keio

J Med、査読あり、68:1-16、2018.

DOI: 10.2302/kjm.2018-0001-IR.

3. Suzuki Masataka, Imanishi Nobuaki, Mita Masashi, Hamase Kenji, Aiso Sadakazu, Sasabe Jumpei, Heterogeneity of D-serine distribution in the human central nervous system, ASN Neuro、査読あり、9:1759091417713905、2017.  
DOI: 10.1177/1759091417713905.

〔学会発表〕(計 9件)

1. 笹部潤平、アミノ酸のキラリティがつくる宿主-細菌相互作用、第52回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会、2019
2. 笹部潤平、アミノ酸のキラリティがつくる宿主-細菌相互作用、次世代酵素学研究セミナー徳島大学、2019
3. 笹部潤平、アミノ酸のキラリティが調節する生理機能、第178回分泌セミナー、2019
4. 笹部潤平、D-アミノ酸に着目した医学の新展開、新アミノ酸分析研究会第8回学術講演会、2018
5. 笹部潤平、腸内 D-アミノ酸代謝と腸管粘膜防御、千里ライフサイエンスセミナー、2018
6. Jumpei Sasabe、D-amino acid metabolism modifies gut microbial community and innate mucosal defense、The 3<sup>rd</sup> International Conference of D-amino acid Research、2017
7. Jumpei Sasabe、Looking into the mirror: chirality of amino acids modifies host-microbial interplay and mucosal defense、CFAI 2<sup>nd</sup> Special Seminar、2017
8. 笹部潤平、腸内環境における D-アミノ酸を介した微生物と宿主の相互作用、28<sup>th</sup> Forum in Dojin「D-アミノ酸生物学-右と左から見た生命の世界-」、2017
9. 笹部潤平、腸内細菌による D-アミノ酸合成、第16回 Awaji International Forum on Infection and Immunity、2017

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究分担者氏名：鈴木 将貴

ローマ字氏名：SUZUKI, Masataka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。