

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860507

研究課題名(和文)肝免疫の恒常性維持と破綻に及ぼす腸内環境因子の同定

研究課題名(英文)Analysis of the involvement of intestinal bacteria in the liver immune tolerance

研究代表者

恩地 正浩 (ONJI, Masahiro)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：20727391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓は免疫寛容を特徴とする臓器である。肝免疫寛容における自然免疫の役割を腸内細菌の関与という観点から明らかにすることを目的とした。肝臓の免疫担当細胞における抗原提示能が他臓器の免疫細胞と比較して低下していると共に、自然免疫応答に関わる受容体の発現も低下しており、自然免疫と獲得免疫への活性化の両側面において機能が抑制されていることが分かった。肝免疫寛容への腸内細菌の関わりを明らかにするために脂肪負荷による肝臓の炎症モデルマウスを作成し門脈血の代謝産物を網羅的に解析したが、水溶性代謝物および血清短鎖脂肪酸の濃度に有意な差は見られなかった。脂溶性代謝産物を含めたさらなる解析が今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：The liver is an immunological organ with unique properties of immune tolerance. The aim of this study is to dissect the molecular mechanism underlying this event in terms of gut bacterial involvement. Liver antigen presenting cells showed low expression of an innate immune receptor as well as co-stimulatory molecules in contrast to splenic immune cells, suggesting that both innate immune response and activation of acquired immune response were suppressed. Although there was no significant difference in concentration of water soluble metabolites and short-chain fatty acids in the portal vein between mice loaded with high-fat diet and control mice, further study will be needed for understanding the role for intestinal bacterial in liver immune system.

研究分野：医歯薬学

キーワード：自然免疫 肝免疫 免疫寛容 腸内細菌叢 代謝産物

1. 研究開始当初の背景

Toll-like receptor (TLR) は、細菌やウイルスなど病原体に由来する構成分子のパターンを認識して応答する自然免疫系の受容体である。TLR9 は病原体由来の DNA を認識する受容体であるが、リガンドである核酸は宿主にも共通するため、宿主に応答する危険性をはらんでいる。生体では種々の分子メカニズムにより認識応答が制御されている。最近の報告によると細胞表面の TLR は多くの内因性リガンドを定常時も含めて認識することがわかってきた。脂肪酸など定常時にも存在する代謝産物から組織傷害に伴って放出される物質まで幅広い物質が候補として挙げられている。内因性リガンドの中には、非感染性の慢性炎症「自然炎症 (homeostatic inflammation)」を引き起こすものもあり、自己免疫疾患、生活習慣病などへの関わりも注目されている。一方で、腸内細菌由来の乳酸菌由来の 2 本鎖 RNA は TLR3 を介して粘膜免疫の恒常性維持に寄与している (Kawashima T et. al., *Immunity* 2013)。また、TLR9 においても腸炎の発症抑制、炎症修復に重要であることがわかってきた (Rose WA et. al., *Sci Rep* 2012)。すなわち、常に外来因子に暴露している環境では TLR のシグナルが、炎症を抑え、免疫寛容に寄与しているケースが報告された。このように、内因性リガンドと外来因子双方が、種々の細胞に作用して、炎症を惹起したり、逆に免疫寛容を誘導する可能性があることを示唆している。肝臓は免疫寛容が働く臓器として知られているが、免疫寛容が肝臓特異的に働く機序と肝臓における免疫寛容の破綻と炎症が誘起されるメカニズムについては不明な点が多い。また、肝免疫寛容における自然免疫系の役割についても不明な点が多い。腸内細菌叢は小腸上皮の機能や粘膜免疫によって恒常性が保たれている一方、腸内細菌

菌の抗原性や腸内細菌が産生する代謝産物が腸管免疫の恒常性に貢献していることが知られている。さらに、特定のアミノ酸欠乏による抗菌ペプチド合成能の低下や粘膜免疫の破綻、食餌の変化などにより腸内細菌叢が変化することが知られている。このように腸管における恒常性維持の役割を果たす腸内細菌叢の抗原性や代謝産物が、門脈を介して肝免疫の恒常性に影響を与えているのではないかという可能性が考えられた。現在のところ、このテーマに対する知見は未知な点が多く、また細菌叢の変化が肝臓にどのような影響を与えるかについても不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝免疫寛容や肝臓における炎症に影響をあたえる腸内環境の役割について解明することである。異なる腸内環境下において門脈から流入する物質の変化を解析し、肝臓における自然免疫系への影響を検討する。同時に、肝臓の免疫寛容に関わる樹状細胞における自然免疫機構を他臓器の樹状細胞と比較することでその特殊性を検討する。

(1) マウスで肝免疫寛容に関わる免疫担当細胞における機能を解析し、他臓器の免疫細胞と比較することで免疫寛容に関わる自然免疫の役割を解明する。

(2) 異なる腸内細菌叢下での門脈血内の物質の同定と解析を行い、自然免疫担当細胞への影響を調べることで肝免疫寛容とその破綻機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 肝免疫の特殊性を特徴づける因子として樹状細胞などの自然免疫担当細胞に着目し肝免疫寛容への役割を検討した。

まず、肝免疫の中心的な役割を果たす免疫担当細胞についての解析を行った。肝臓に

において、自然免疫応答と抗原提示などにより獲得免疫の活性化を司る肝樹状細胞 (conventional dendritic cells (cDCs) and plasmacytoid dendritic cells (pDCs)) やマクロファージ、単球における CD80,86, MHC class II の細胞表面発現をフローサイトメトリーにて検討した。また、自ら作成した抗マウス TLR9 抗体 (クローン: J15A7) (Onji et al., Nature communications 2013) を用いて、肝樹状細胞における TLR9 の発現をフローサイトメトリーにて確認した。

(2) 本来肝免疫寛容が働いているが、ある特殊な環境において、なんらかの因子によって免疫寛容が働かなくなり、肝臓に炎症が引き起こされるのではないかという仮説を立てた。まず肝臓の炎症のモデルマウスを作成し、コントロールと比較して、肝臓の免疫寛容および炎症を評価し、さらにその炎症を引き起こす因子を探索することとした。肝炎症モデルの一つとして脂肪負荷モデルを選択したが、非アルコール性脂肪肝炎においても自己抗体の陽性率が上昇していることから、何らかの免疫学的な機序が疾患形成に働いている可能性が示唆されている。また、腸内細菌叢の変化と自然免疫応答が疾患形成に関与していることがマウスモデルにおいて証明されており、腸内細菌叢の変化が起因として起こる免疫反応の破綻を起因とする肝炎症モデルとして選択した。

超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料をマウスに負荷して肝臓の炎症、発癌モデルの作成を試みた。さらに門脈血を採取し、門脈血中の代謝産物の解析を行った。

4. 研究成果

(1)

肝樹状細胞 cDC は脾樹状細胞に比較して CD11c の発現が弱く、既知の報告のごと

く CD80,86, MHC class II が低下していただけでなく、細胞表面の TLR9 の発現が低下していた。pDC は regulatory T cell の誘導、アナジーなどで末梢免疫寛容に働いているとされているが、肝 pDC では細胞表面の CD80,86, MHC class II, TLR9 の発現が低下していた。

以上のことから肝臓に存在する樹状細胞は自然免疫応答が抑制されている可能性が示唆された。このことが組織特異的免疫寛容に働いているかについて、今後の課題と考えている。

脾臓では、 $CD11b^+CD11c^-F4/80^{int}Ly6G^{low}Ly6C^{low}$ classical monocytes が $CD11b^+CD11c^-F4/80^{int}Ly6G^{low}Ly6C^{high}$ inflammatory monocytes よりも優位に存在していたが、肝臓では逆に classical monocyte よりも inflammatory monocytes が優位に存在していた。

肝臓では $CD11b^+CD11c^-F4/80^{int}Ly6G^{low}Ly6C^{low}$ cells を resident Kupffer cells とし、 $CD11b^+CD11c^-F4/80^{int}Ly6G^{low}Ly6C^{high}$ cells を M-MDSC とされる報告があるが、これらの細胞は肝臓では脾臓細胞に比較して、その TLR9, CD80, CD86, MHC class II の発現が弱いことが分かった。

以上より、肝臓では、樹状細胞だけではなく、組織由来のマクロファージおよび組織に流入する単球も含めて自然免疫と獲得免疫への活性化の両方の側面において機能が抑制されていることが免疫寛容に寄与している可能性が示唆された。さらに免疫寛容は細胞特異的でないことから組織特異的な液性因子が免疫寛容に関わっている可能性が示唆された。

(2) コントロールとして用いたコリン欠乏メチオニン減量飼料投与マウスでは、脂

肪肝，肝の腫大化が見られ，一部に発癌したマウスが存在したが，超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料を投与したマウス群では肝の腫大と脾腫が顕著であり，さらに8-12 か月後には肝臓に癌を伴うマウスがコントロールに比較して増加した（一部では可視性黄疸が見られた）.この結果より，アミノ酸置換負荷下において高脂肪食が発癌を促進することが分かった .なお ,TLR2 , TLR4 , TLR9 各ノックアウトマウスでも超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料の投与によって C57BL/6J マウスと同様に肝腫大と発癌が見られた .TLR4 はグラム陰性の細菌構成成分の LPS やパルミチン酸などの飽和脂肪酸を認識して炎症を引き起こすことが知られているが，このモデルにおいて各自然免疫応答受容体のリガンドである菌体成分や脂肪酸などが門脈を経由して肝臓流入し，肝臓内の免疫担当細胞に発現している単独の受容体を刺激して発癌等に関与することは否定的と考えられた .そこで，肝臓に炎症と発癌を引き起こす因子として，高脂肪食により変化した腸内細菌叢が産生する代謝産物に着目し，どのような腸内細菌による代謝産物が門脈を経由して肝臓に流入するか，門脈血の血清を用いて網羅的にメタボローム解析を行った .各群間における門脈血清中水溶性代謝物および血清短鎖脂肪酸の濃度に有意な差は見られなかったが，今後，脂溶性代謝産物も含めた解析を検討している .

今後は，脂肪負荷による肝腫大や発癌を起こしたマウス内の肝臓の免疫担当細胞の機能を解析することを検討している .さらに，メタボローム解析結果をもとに，各負荷マウスの腸内細菌叢の変化を解析することが必要と考えている .

5 . 主な発表論文等

なし

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

恩地 正浩 (ONJI Masahiro)

岡山大学 医学部 客員研究員

研究者番号：20727391

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし