

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19386

研究課題名（和文）八工が明らかにする「病は気から」：免疫系を制御する神経細胞

研究課題名（英文）Neurons regulating immune system

研究代表者

倉田 祥一郎（Kurata, Shoichiro）

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：90221944

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：神経系による免疫制御機構を明らかにするために、細菌感染に対する抵抗性を制御するNP3253神経細胞群が、どのような制御を受け免疫系を制御しているのか解析した。そのために、ヘッジホッグ（Hh）シグナルに着目した。その結果、NP3253神経細胞群におけるHhシグナルを阻害すると、感染抵抗性が低下し、逆にHhシグナルを活性化すると、感染抵抗性が上昇した。このことから、感染抵抗性の発現における、NP3253神経細胞におけるHhシグナルの関与が示唆された。さらに、NP3253神経細胞群の投射先の腸管において、神経活動依存的に発現が変動する遺伝子として、1141遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、感染抵抗性の発現にNP3253神経細胞群におけるHhシグナルが関与することが示唆された。今後は、どのような局面においてHhシグナルを介してNP3253神経細胞群が制御されているのか、また、今回行った遺伝子発現解析をもとに、どのようにしてNP3253神経細胞群が感染抵抗性を調節しているのか、などを明らかにすることで神経系による免疫制御の解明が進むことが期待できる。また、NP3253神経細胞群と同等の神経が哺乳動物にも存在するのか、さらには、同様の神経支配機構が哺乳動物でも腸管感染防御を制御しているのかなど、免疫系の神経支配による恒常性維持機構の解明が進むことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of immune regulation by the nervous system, we analyzed how NP3253 neurons, which regulate resistance to bacterial infection, regulate the immune system. To do so, we focused on the hedgehog (Hh) signal. The results showed that inhibition of Hh signaling in the NP3253 neurons reduced infection resistance, and conversely, activation of Hh signaling increased infection resistance. This suggests the involvement of Hh signaling in NP3253 neurons in host defense. In addition, we identified the 1141 gene as a gene whose expression fluctuated in a neural activity-dependent manner in the gut.

研究分野：生物系薬学

キーワード：神経-免疫関連 腸管 ショウジョウバエ 恒常性維持

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「病は気から」のことわざにもあるように、生体の多様な反応を調節する神経系が、病に對抗する免疫系に影響を与えていると考えられる現象は、誰もが経験している。今から 100 年ほど前の 1924 年、フランス パスツール研究所のメタルニコフは、昆虫の中樞神経である腹側神経索が透けて見えるハチミツガの幼虫の表皮の上から焼きごてを当て、特定の神経節を麻痺させると、その幼虫はピブリオ菌の感染から防御できなくなることを報告している (*Ann. Inst. Pasteur* 38, 787-826)。神経系が免疫系を制御していることを示唆する初めての知見である。その後、神経系と免疫系のクロストークは様々な生物や局面で指摘されているが、神経系による免疫制御に関する研究はあまり進展しておらず、どの神経細胞が、どのような制御を受けて、どのように免疫系を制御し、生体の恒常性を維持しているのかについては、比較的単純な神経系と免疫系を有する昆虫においてすら未だに明らかにされていない。ショウジョウバエは、ヒトの 10 万分の 1 足らずの神経細胞しか有さず、分子遺伝学的解析が容易なため、中枢神経系を有する生物で唯一全神経細胞のアトラス構築が進むなど、個体レベルでの神経細胞学が

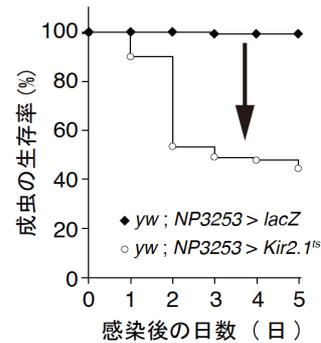


図 1. 神経抑制による感染抵抗性の低下
NP3253 神経細胞群を不活性化すると
細菌感染抵抗性が低下する (○)

発展している。一方、免疫系も獲得免疫を持たず自然免疫のみであり、その分子機構の解明が進んでいる。したがって、これまで未解明な免疫系の神経制御を明らかにできる最も適した研究材料といえる。そこで、応募者は、昆虫免疫系の神経支配についての解析の手掛かりを得るために、神経細胞学的手法を免疫研究に導入した。ショウジョウバエでは、特定の神経細胞の活性を人為的に操作して、その神経細胞の制御する事象を個体レベルで観察できる。例えば、静止膜電位の過分極作用を持つカリウムチャンネル Kir2.1 を発現させると、その神経活動を抑制できる。そこで、エンハンサートラップ系統を用いて、Kir2.1 を発現させ、系統別に異なる神経細胞群を不活性化した。そして、その際、ショウジョウバエに自然感染するものの致死性は示さない軟腐病菌の経口感染に対する抵抗性を調べた。350 系統を用いたスクリーニングの結果、ほとんどの系統で感染抵抗性に影響が見られなかったが、NP3253 系統では、Kir2.1 の発現により感染抵抗性が著しく低下した (Kenmoku et al. *J. Exp. Biol.* 2016、図 1)。NP3253 系統での Kir2.1 の発現を全神経細胞で抑制すると、感染抵抗性の低下が見られなくなることから、NP3253 系統で Kir2.1 が発現した神経細胞 (NP3253 神経細胞群と命名した) が、経口感染に対する抵抗性を制御していることが明らかとなった。したがって、NP3253 神経細胞群の理解が進むことで、同等の神経が哺乳動物にも存在するのか、また、種を越えて、同様の神経支配機構が哺乳動物でも恒常性を制御しているのかなど、免疫系の神経支配による恒常性維持を明らかにする新しい研究領域の創出が期待された。さらに将来的には、「病は気から」から導かれるこれまでにない保健医療分野、例えば、脳神経系を考慮した免疫制御や、疾病予防・対策を目指す新規方法論の確立、あるいは神経・免疫連関を標的とした革新的な医薬品の開発などに発展する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

これまでに、ショウジョウバエの神経操作技術を免疫研究に導入し、経口感染した細菌に対する抵抗性を制御している NP3253 神経細胞群を同定している。NP3253 神経細胞群は、脳から食道と中腸に投射し、細胞体は脳内と、食道下神経節に存在していた。そして、その神経終末

の一部は、腸管内側の管腔側に投射していた。このことから、NP3253 神経細胞群が、腸管内部の状況を感じ、腸管免疫系を制御していることが予想された。実際、NP3253 神経細胞群の不活性化により腸管のバリア機能が破綻し、経口感染した細菌が腸管内に留まらず全身に拡散していた（図 2）。そこで、本研究では、NP3253 神経細胞群に着目し、研究項目 1 では、NP3253 神経細胞群が、どのように腸管免疫系とバリア機能を制御しているのかを明らかにし、研究項目 2 では、NP3253 神経細胞群がどのような制御を受け、感染防御に働くのかを明らかにすることにした。これにより、免疫系の神経支配による恒常性維持機構の一端を解明することを目指した。



図 2. 経口感染させた細菌の分布
左：正常なハエ（細菌は腸管に留まる）
右：NP3253 神経群を不活性化したハエ（経口感染させた細菌が全身で検出される）

3. 研究の方法

研究項目 1：NP3253 神経細胞群による腸管免疫・バリア機能の制御機構の解明

NP3253 神経細胞群がどのように腸管免疫系とバリア機能を制御しているのかについて、手がかりを得るために、NP3253 神経細胞群の投射先の腸管において、NP3253 神経細胞群の活動に依存して発現が変動する遺伝子を網羅的に同定した。当初の計画では、DNA マイクロアレイを用いた解析を計画していたが、より発現量の低い遺伝子を同定するために、DNA マイクロアレイから、次世代シーケンス (RNA-Seq) 解析に方法を変更することにした。その際、科研費 新学術領域研究「学術研究支援基盤形成」：「先進ゲノム解析研究推進プラットフォーム」の公募研究に採択されたため (申請者：倉田祥一郎「免疫系を制御する神経細胞」)、その支援を受けた。

研究項目 2：NP3253 神経細胞群が受ける制御の解明

NP3253 神経細胞群が何らかの制御を受けて、感染抵抗性を調節しているのかどうか調べるために、NP3253 神経細胞群を人為的に活性化し、通常致死性を示す病原菌 (*Pseudomonas entomophila*: *Pe*) の経口感染に対する抵抗性を調べた。そのために、NP3253-GAL4 系統を用いて、陽イオンチャネルである dTrpA1 を発現し、NP3253 神経細胞群を人為的に活性化した。NP3253 神経細胞群を活性化した際に、腸管免疫系が活性化し、経口感染させた細菌が排除されるのか、それとも積極的に細菌の排除が行われないのかを明らかにするために、NP3253 神経細胞群を活性化させた際に、経口感染させた

病原菌の腸管における数を、プレート上のコロニー形成数として算出した。次に、NP3253 神経細胞群において、ヘッジホッグ (Hh) の受容体である Patched (Ptc) が特異的に発現していることに着目した。NP3253-GAL4 系統では、GAL4 遺伝子が Ptc 遺伝子座に挿入されており、そのエンハンサー

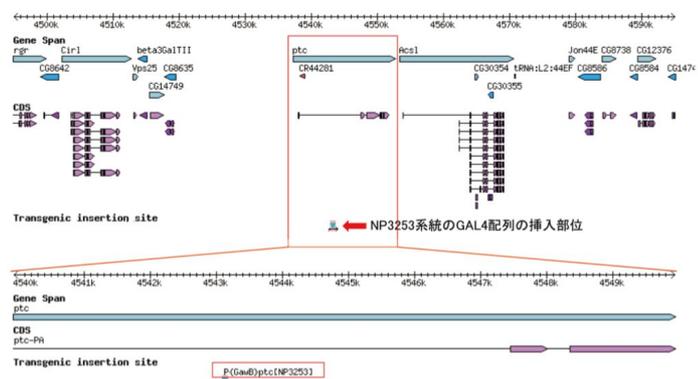


図 3. NP3253 系統での GAL4 配列の挿入部位

の影響を受けて GAL4 が発現しているものと考えられる (図 3)。Ptc は、Hh の受容体であり、Hh シグナルの伝達に重要な因子である。そこで、NP3253 神経細胞群で Hh シグナルを人為的に阻害、あるいは活性化した際の病原菌の経口感染に対する抵抗性を調べた。

4. 研究成果

研究項目 1 : NP3253 神経細胞群による腸管免疫・バリア機能の制御機構の解明

NP3253 神経細胞群の投射先の腸管において、NP3253 神経細胞群の活動に依存して発現が変動する遺伝子を同定するために、コントロール個体 (NP3253>GFP)、NP3253 神経阻害個体 (NP3253>Kir2.1)、NP3253 神経活性化個体 (NP3253>dTrpA1)、さらには、それらの個体に *Pe* 菌を経口感染させた個体について RNA-Seq 解析を行った。そして、NP3253 神経細胞群の活動と細菌感染に依存して、腸管で発現が変動する遺伝子として 1141 遺伝子を同定した。クラスタリング解析を行い、変動パターンの違いから 12 のグループに分類することが出来た (図 4)。

グループ 1 では NP3253 神経阻害個体において感染の有無にかかわらず遺伝子発現が上昇し、NP3253 神経活性化個体ではコントロールと同程度の発現を示した。このグループの遺伝子の発現上昇が感染抵抗性の低下の原因となっている可能性が考えられる。グループ 2 は NP3253 神経活性化によって発現低下し、細菌の感染によって発現上昇する遺伝子群であった。グループ 3 は NP3253 神経の阻害と活性化のどちらでも発現が上昇する遺伝子群であった。グループ 4 では NP3253 神経の活性化によって発現上昇傾向があり、さらに細菌を経口感染させることでさらなる発現上昇が認められた。このグループの遺伝子群の発現が NP3253 神経活性化個体の細菌感染時

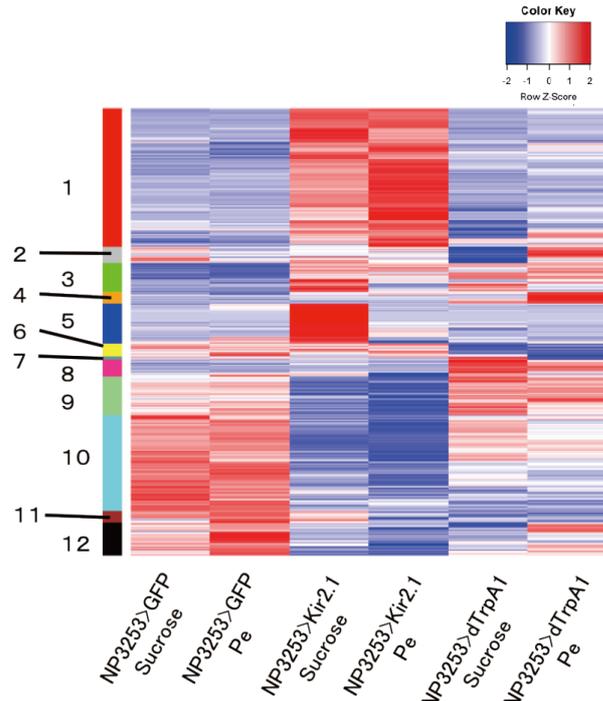


図 4. 発現変動遺伝子のクラスタリング解析
発現変動遺伝子の z-score をヒートマップに示した。

に強く誘導されることから感染防御を亢進する役割を担っている可能性が考えられる。グループ 5 は NP3253 神経の阻害個体で発現が上昇し、細菌の感染により発現上昇がキャンセルされる遺伝子群であった。グループ 6 は感染の有無にかかわらず神経活性化個体においてのみ遺伝子発現が低下する遺伝子群であった。このグループの遺伝子は、神経活性化個体の感染抵抗性の上昇に寄与することが考えられる。グループ 7 は NP3253 神経活性化によって発現上昇し、細菌の感染によって発現低下する遺伝子群であった。グループ 8 は有無にかかわらず神経活性化個体においてのみ遺伝子発現が上昇する遺伝子群であった。グループ 6 と同様に、神経活性化個体の感染抵抗性の上昇に寄与することが考えられる。グループ 9 の遺伝子群は NP3253 神経の阻害によって発現低下し、神経の活性化によって遺伝子発現が上昇した。この遺伝子群の発現の上昇と発現低下が感染抵抗性を担っており、神経活動を変化させた際の生存率の変動に関与している可能性が考えられる。グループ 10 は NP3253 神経の活性化個体と阻害個体の両方で発現低下を見せる遺伝子群であった。グループ 11 は非感染のコントロール個体と NP3253 神経阻害個体と細菌感染させたコントロール個体において発現が高い遺伝子群であった。グループ 12 はコントロール個体や NP3253 神経活性化個体において細菌感染による遺伝子発現が誘導される傾向にあり、NP3253 神経阻害個体では細菌感染によってむしろ発現が低下する遺伝子群であった。さらに NP3253 神経阻害個体においてコントロールと比較して発現が低い遺伝子群である。現在グループ 1, 9, 12 の遺伝子群について個別の機能解析を行っている。

研究項目 2 : NP3253 神経細胞群が受ける制御の解明

NP3253 神経細胞群が何らかの制御を受けて、感染抵抗性を調節しているのかどうかを検討するために、NP3253 神経細胞群を人為的に活性化し、致死性病原菌 (*Pe* 菌) に対する抵抗性が上昇するのかどうかを調べた。その結果、NP3253 神経細胞群の活性化により、致死性病原菌に対する感染抵抗性が上昇することが分かった。その際、経口感染させた病原菌の腸管における数は、NP3253 神経細胞群の活性化の有無で変動しなかった。したがって、NP3253 神経細胞群の活性化は、積極的に病原菌の排除を行う免疫応答を誘導するのではなく、病原菌に対する耐性(トランス)を上昇させているものと考えられた。NP3253 神経細胞が何らかの制御を受け、感染防御を調節していることが示唆されたため、NP3253 神経細胞群で Hh シグナルを人為的に阻害、あるいは活性化した際の病原菌 (*Pe* 菌) の経口感染に対する抵抗性を調べた。その結果、NP3253 神経細胞における Hh シグナルを阻害すると、感染抵抗性が低下し、逆に Hh シグナルを活性化すると、感染抵抗性が上昇した。このことから、感染抵抗性の発現における、NP3253 神経細胞における Hh シグナルの関与が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kentaro Ishibashi, Takuro Suzuki, Naoyuki Fuse, Shoichiro Kurata
2. 発表標題 Homeostasis through neural control of gut microbiota in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 The 8th Global Network Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石橋謙太郎, 鈴木拓朗, 布施直之, 倉田祥一郎
2. 発表標題 神経系によるショウジョウバエ腸管免疫制御機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋謙太郎, 鈴木拓朗, 布施直之, 倉田祥一郎
2. 発表標題 神経系によるショウジョウバエ腸管免疫制御機構
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第85回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木拓朗, 石橋謙太郎, 布施直之, 倉田祥一郎
2. 発表標題 ショウジョウバエ腸管免疫の神経制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroki Nagai, Hiroshi Tatara, Shoichiro Kurata, and Tamaki Yano
2. 発表標題 Intestinal autophagy suppresses unnecessary damage response induced by non-pathogenic enteric bacteria through Ref(2)P regulation.
3. 学会等名 13th Japanese Drosophila Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shoichiro Kurata
2. 発表標題 Neural control of host resistance to ingested bacteria in Drosophila
3. 学会等名 International Symposium for Infectious Diseases: Vector-borne Diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院薬学研究科生命機能解析学分野 http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seimei/seimei_original.html
--

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	布施 直之 (Fuse Naoyuki)		