

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16253

研究課題名(和文)カイコをモデルとした、感染現象の場としての自然免疫システムの包括的理解

研究課題名(英文)Comprehensive understanding of the innate immune system using the silkworm model

研究代表者

宮下 惇嗣(Miyashita, Atsushi)

帝京大学・付置研究所・講師

研究者番号：40818308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において(1)自然免疫を刺激する新たな分子群を得ることができたこと、(2)カイコを実験動物に用いて炎症性疾患モデルを構築できたこと、ならびに(3)上記の免疫プライマーによる刺激条件下や実験的炎症誘導下において、生体内における応答の中心的役割を担うと想定される血球細胞における遺伝子発現パターン(トランスクリプトーム)や、血液中に放出される様々な化合物群のパターン(メタボローム)を解析する条件を構築できたことである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、免疫機能の底上げによって人々の感染抵抗性を高める「感染予防」のアプローチを開拓するとともに、現在問題となっている炎症性疾患の理解と克服につながることを期待される。特に、本研究で研究代表者が見出した免疫プライマー群は未記載の分子群を含み、その生体内における作用メカニズムはほとんど未知であるといえる。こうした化合物の免疫系に対する作用メカニズムを明らかにすることによって、免疫学における新しい地平を切り拓くとともに、そうした科学的知見に基づく人々の疾患の克服と健康衛生水準の向上への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I (1) obtained a new group of molecules that stimulate innate immunity, (2) established an inflammatory disease model using silkworms as experimental animals, and (3) established an experimental condition for analyzing the gene expression patterns (transcriptome) in hemocytes (that plays a central role in the immune responses) and the metabolomic patterns of the plasma under the above conditions.

研究分野：生化学・免疫学

キーワード：自然免疫 炎症 昆虫 感染症 微生物 カイコ

## 1. 研究開始当初の背景

### 感染症克服の重要性：

感染症は、世界中で人々の生命を脅かしている主要な脅威である。感染症は、ヒトに対する直接的な健康被害と、家畜動物や農作物への感染を通じた間接的な被害を人類にもたらしている。私たちがより豊かな社会を実現するために、こうした感染被害を制御することは大変重要である。しかしながら、感染制御の試みは時に失敗に終わる。その理由は、感染症の原因となる病原微生物と宿主生物との相互作用、に関する科学的理解が不十分なためである。この問題を克服するためには、病原微生物と宿主生物との相互作用の科学的理解を深めることが必要である。

### 自然免疫システムを理解することの重要性：

「病原微生物と宿主生物との相互作用の科学的理解」とは、言い換えれば「なぜ生物は微生物の感染によって死に至り、それはどうすれば防げるのか？」という問いに答えることに他ならない。だが「なぜ生物は微生物の感染によって死に至るのか」に関する人類の科学的理解は未だ断片的である。微生物が生物を殺傷するメカニズムの一端として、病原微生物が保持する毒素や病原性因子群が明らかにされているものの、その全貌は未だ不明である。他方、「微生物による感染はどうすれば防げるのか」という点に関しては、感染宿主生物が有する物理的なバリアーや免疫系による防護システムが永らく研究対象となっている。そうした防護システムの破綻が、病原微生物の侵入や体内での増殖を許すことによって感染症の引き金になると考えられており、生物が有する感染防護システムの賦活化による感染制御の試みが広く行われている（ワクチンなど）。そうした感染防護システムの中でも最前線を担うのは自然免疫システムであり、無脊椎動物から哺乳動物に至る全ての多細胞生物が、自然免疫システムに依存した感染防護の仕組みを構築している。しかしながら、獲得免疫系を利用した感染制御や抗菌薬の活用と比較すると、自然免疫をターゲットにした感染防御の試みは少ない。

### 感染制御への新たなアプローチ：

本研究では、獲得免疫系や抗菌薬の活用とは異なる感染制御へのアプローチとして、自然免疫系に着目して病原体宿主相互作用に関する理解を試みる。研究を遂行する上で大きな課題になるのは、獲得免疫系（抗体による免疫システム）の影響を排除しつつ、定量的な分子生物学実験を行うことができる実験システム（モデル動物）の構築である。例えばマウスのような脊椎動物の場合、獲得免疫システムの寄与をなくすことは通常難しい。一方、ショウジョウバエや線虫は獲得免疫系を有さないモデル動物で、豊富な遺伝学的ツール群が極めて有用だが、その小さな個体サイズは定量的なサンプルの注射や、体液・組織サンプルの大量採取を困難にしている。そこで本研究計画ではサイズの大きい昆虫であるカイコをモデルに用い、これらの問題を克服したモデル系を構築して自然免疫システムの研究を展開する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでに研究代表者が提唱している「免疫プライマー」としての機能を有する新しい化合物群の創出とその作用メカニズムの理解、さらに免疫系の活性化を適切に制御する方法論の開拓である。

### 3. 研究の方法

本研究では、カイコをモデルに用いた。免疫プライマーとしての機能の有無を知る方法は、試料をカイコに投与（血中または経口）し一定時間インキュベートした後に、通常条件では致死量となる緑膿菌をカイコに感染させ、一日経過後にカイコの生存率を観察する方法を採用した。本実験系において、ネガティブコントロールである生理食塩水の前投与を施されたカイコが感染死し、試料を前投与されたカイコが緑膿菌感染を免れて生存した場合に、当該試料を免疫プライマー活性ありと判定した。また、カイコに過度な免疫の活性化を引き起こすために、飢餓や外来化合物の投与といった複合的ストレスを与えた条件下で、病原体成分（緑膿菌の加熱死菌）を血液内に投与する、という方法を採用した。

### 4. 研究成果

初年度は、病原性細菌が免疫システムの過剰な活性化を引き起こして個体にダメージを与えるメカニズムについての理解を深めることを主な達成課題とした。日和見感染症を引き起こす緑膿菌の加熱死菌サンプルを用いて、カイコに対して過剰免疫応答を引き起こし、数時間以内で個体死に至る過程を捉えた実験系を確立した。当該条件下では、サイトカイン関連遺伝子の発現量増加、血中に存在するサイトカイン分子の活性化、血液のメラニン化や血中水素イオン濃度の急激な変動を伴う過剰な免疫反応を呈し、緑膿菌サンプルを注射してから数時間でカイコがショック死に至った。さらに、当該条件下でカイコの体液中に誘導される細胞障害性因子に着目し、細胞障害活性を示す物質を生化学的手法によって精製・同定を試み、その部分精製に成功した。一方で、本研究課題におけるもう一つの検討項目である自然免疫活性化物質 (Primed immune response 誘導物質) の探索に関しては、植物、並びに食経験のある乳酸菌や酵母といった材料の中に活性物質を多数見出し、それぞれ生化学的方法による精製と化学構造の解析に取り組んだ。いずれも原著論文として投稿中あるいは投稿準備中の段階にある。また、カイコで見出された自然免疫活性化物質の効果を検証するためには高等動物(脊椎動物)を用いた免疫学実験が重要だが、今回新たに魚類(水泡眼金魚)をもちいた免疫学実験系を立ち上げ、その免疫学実験における有用性を示した。

最終年度では、カイコをモデルとした自然免疫システムの理解、並びに宿主の自然免疫システムとの相互作用を通して起きる感染現象に焦点を当てて、病原体と宿主との相互作用原理の解明に取り組んだ。これまでにカイコを用いて、腸管出血性大腸菌 0157 やセラチア、緑膿菌といった様々なグラム陰性菌のペプチドグリカンが、カイコに対して感染抵抗性を付与する活性を有することを見出してきた。私はこれをカイコにおける Immune Priming (Primed Immune Responses) と呼び、その分子基盤の解明に取り組んだ。最終年度では、乳酸菌が産生する分子量およそ二千の化合物が、カイコに対する Immune priming 活性を有することを見出し、その活性がペプチドグリカンの分解酵素であるムタノライシンによって失活することを見出した。また、共同研究を通して同定された化学構造をもとに、当該活性物質の合成品を得てその活性を検証したところ、合成品に当該活性があり、その活性はムタノライシンによって失活することを確認した。さらに、当該化合物が作用するメカニズムを知るために、RNAseq 法による網羅的遺伝子発現解析を実施した。これまで私の研究グループでは、カイコに関する RNAseq 解析を行った例がなかったが、最終年度において、RNA 調製からデータ解析までの一連の実験系を整備することができた。特に、1 個体から回収した血球細胞を用いて、最大でおよそ 200-400 ng のトー

タル RNA を得ることができ、個体ごとの RNAseq を行えるようになった点が重要な進展である。  
今後、当該実験系を用いてカイコの immune priming の分子基盤に関する研究を進めていく予定  
である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroto Nakajima, Atsushi Miyashita, Hiroshi Hamamoto, Kazuhisa Sekimizu	4. 巻 in press
2. 論文標題 A Novel Application of Bubble-eye Strain of Carassius Auratus for Ex Vivo Fish Immunological Studies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyashita Atsushi, Kataoka Keiko, Sekimizu Kazuhisa	4. 巻 -
2. 論文標題 Activation of innate immunity by neutral polysaccharides from broccoli buds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.03.10.434731	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮下惇嗣、中島弘人、高田伊知郎、石島早苗、三上雄大、神村学、関水久
2. 発表標題 カイコを用いた過剰炎症モデルの確立と創薬スクリーニングへの展望
3. 学会等名 日本蚕糸学会第 91 回大会
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 サイトカインストーム治療・予防剤のスクリーニング方法及びサイトカインストーム治療・予防剤	発明者 関水久、宮下惇嗣	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、052006	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------