

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860359

研究課題名(和文) 病原菌/非病原菌認識機序におけるIL-10の役割とその調節の解明

研究課題名(英文) Role of IL-10 in the discrimination of pathogen and non-pathogen

研究代表者

星 奈美子 (HSOHI, NAMIKO)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40645214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々をとりまく環境には多種多様の微生物が存在するが、その全てが生体に病害を惹起するものではなく、生体は何らかの病原菌/非病原菌の識別能力を有していると考えられる。しかし、その識別のメカニズムは明らかになっていない。本研究では、御性サイトカインであるインターロイキン10(IL-10)の病原菌/非病原菌の識別機序への関与について検討した。その結果、腸炎を起こすタイプの菌株(C.roudentium)よりも非病原菌(Nissle 1917)のほうが、IL-10を誘導する能力が高い事が分かった。さらに、この能力は死菌ではみとめられず、非病原菌の活動性が関与する事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We are exposed to many types of microorganisms in the surrounding environment, however, not all microorganisms can cause infectious disease. There should be a mechanism by which the host discriminate a bacteria between pathogen and non-pathogen, however, it is not fully understood. In this study we investigated whether regulatory cytokine IL-10 plays a role in the pathogen non-pathogen discrimination. Our data suggested that non-pathogenic bacteria Nissle 1917 has an ability to induce IL-10 superior to pathogenic C.roudentium. Only live but not heat-killed Nissle 1917 showed that ability.

研究分野：消化器病学、免疫学

キーワード：IL-10 病原菌 非病原菌

1. 研究開始当初の背景

我々をとりまく環境には多種多様の微生物が存在するが、その全てが生体に病害を惹起するものではない。生体は微生物を認識する際に pattern recognition receptors (PRRs: パターン認識受容体) という受容体を使用するが、例えばその代表格である Toll-like receptors (TLRs) とそのアダプター蛋白である MyD88 のシグナル経路は、微生物認識はするものの、病原体/非病原体の区別はできない。即ち生体が、病原体/非病原体を判断する際には、PRRs とは別の機序の生体反応を使用している可能性が高い。興味深いことに、腸炎モデルである IL-10 ノックアウトマウスは無菌状態では異常を呈さないが、specific pathogen free (SPF) 環境下で腸炎を自然発症する。これは IL-10 の非存在下の生体では共生細菌が病原性細菌のように振舞うことを示し、IL-10 が病原体/非病原体の区別に関与する事を示唆すると考えられる。

2. 研究の目的

骨髄由来マクロファージを lipopolysaccharide (LPS) などの pathogen associated molecular patterns (PAMPs) で刺激すると、IL-1、IL-6、IL-12、TNF といった炎症性のサイトカインのみならず、IL-10 も同時に産生される。更に、IL-10 ノックアウトマクロファージで同様の実験をすると、過剰な炎症性サイトカインが産生され、これは IL-10 を加えることで抑制できることから (Kamada et al., J Immunol 2005)、各種細菌の PAMPs による刺激は、炎症性サイトカインと IL-10 産生のバランスまたはカイネティクスの違いがあることにより病原菌由来、非病原菌由来の識別が行われるという仮説が考えられる。もう一つ考えられるのは、病原体が持つ何らかの活動性が (例; pore-forming activity や Type III

secretion system (TTSS) から注入される因子の存在など) が IL-10 発現を抑制する、という機序である。いずれの場合も IL-10 欠損の状態では pro-inflammatory に傾くため病理的变化を伴う炎症が起こりうる。本研究ではこれら仮説を検討し、病原性/非病原性の識別における IL-10 の役割つき検討する。

3. 研究の方法

1) 細胞株による検討

マウスのマクロファージ系細胞株である RAW264.7 細胞を使用し、種類の違うグラム陰性桿菌由来のリポポリサッカライド (LPS) で刺激することで由来菌株によって免疫細胞における反応性に違いがあるか検討する。次いで、病原菌となりうる菌株と、非病原菌である菌株の死菌、生菌を使用して RAW264.7 細胞免疫応答、特に IL-10 の誘導に違いがあるかを検討する。ここで、病原菌と非病原菌で差異を検出した際、IL-10 産生に関する制御因子 (転写因子、共役因子) をマイクロアレイにて検索を行う。

2) マウス腸炎モデルによる検討

IL-10 ノックアウトマウスは腸内細菌依存性に腸炎を発症するモデルであり、施設により腸炎の程度や動態が異なることが知られている。まず IL-10 ノックアウトマウス腸炎を経時的に観察するため、マウス大腸内視鏡システムをセットアップし、腸炎の動態について検討を行う。その後、1) で検索された IL-10 を制御する可能性のある分子のノックアウトマウスを使用し、そのマウスが非病原菌に対して病的な感染症を惹起するか、また、IL-10 ノックアウトマウスと交配することにより腸炎の増悪を来すか検討する。

4. 研究成果

1) 細胞株による検討

微生物の違いにより免疫細胞の応答が異なるかを評価するため RAW264.7 細胞を使用

し、グラム陰性桿菌である大腸菌株 (*Escherichia coli* 055:B5) とサルモネラ菌株 (*Salmonella enterica minnesota*) 由来の菌体成分であるリポポリサッカライド (LPS) で細胞を刺激しサイトカインプロファイルの違いについて、リアルタイム PCR にて検討した。その結果、同量の LPS での刺激にもかかわらず、大腸菌株よりもサルモネラ菌では IL-6、IL-10 の刺激能がやや弱いなど、サイトカイン産生のバランスが同様でない可能性が示唆されたものの、著明な差は認めなかった (図 1.)

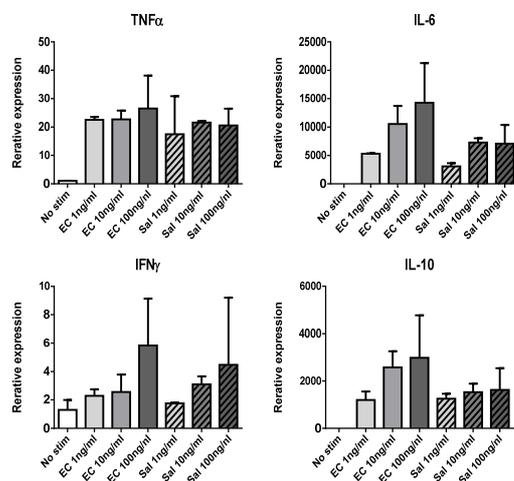


図 1. *E. coli* 055:B5 と *Salmonella enterica minnesota* 由来 LPS におけるサイトカイン産生能の相違

上記のように、LPS といった菌体成分のみの刺激では明らかな差が検出されない可能性があることから、菌体そのものを使用して RAW264.7 細胞を刺激し、同様の実験を行った。病原菌の *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) と、プロバイオティクスとしても使用される非病原菌である大腸菌株 Nissle 1917 (Rembackrn et al., Lancet 1999) の死菌または生菌を使用し、同様の実験を行った (図 2)。この検討から、死菌による刺激のみでは免疫応答の惹起能力が生菌に比べ弱くなることが示唆され、更に興味深いこ

とに非病原菌 (Nissle 1917) では、病原菌 (*C. rodentium*) に比べ IL-10 を誘導する能力が高いことが示唆された。以上から、これは、PRR による微生物の分子パターン認識ではなく、何らかの非病原菌の活動によって IL-10 が強く誘導されることが示唆された。なお、菌株によるサイトカイン産生刺激のカイネティクスの差異についても刺激後 2 時間、4 時間、8 時間などで検討を行ったが、経時的な変化については両菌株で著明なパターンの相違を認めなかった。

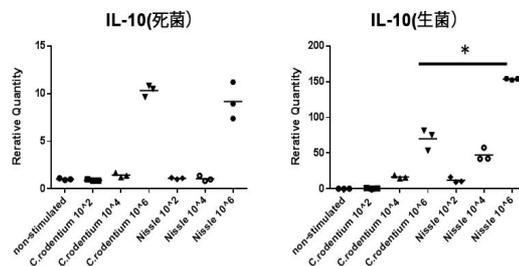


図 2 病原菌・非病原菌による免疫応答の差の検討

これらの結果は、菌体成分よりも病原体が持つ何らかの活動性が、生体における病原体 / 非病原体の識別機構に関与するという仮説をサポートする結果であった。この結果を踏まえ、網羅的な解析を行うため、*C. rodentium* と、Nissle 1917 の生菌にて Raw 細胞を刺激し、その遺伝子発現レベルについてマイクロアレイを行った (図 3)。

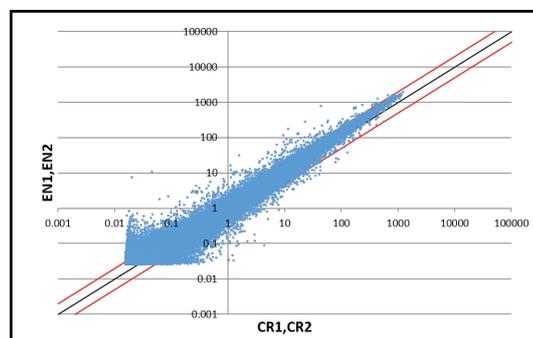


図 3 Nissle 1917 と *C. rodentium* 刺激による Raw 細胞の遺伝子発現比較

その結果では、Nissle1917 の刺激により、*C. rodentium* より IL-10 の発現レベルが7倍程度高くなっており、上述のリアルタイムPCRでの検討と同様の傾向であり、かつ、より発現の差が顕著に検出された。更に、S100a8 や CCR1 など自然免疫細胞の抗菌機能に重要な遺伝子が Nissle1917 より *C. rodentium* で10倍以上上昇していた。Nissle1917 の生菌刺激で *C. rodentium* より発現強度が6倍以上強い遺伝子が300以上検出されたため、今後はこの中から IL-10 の発現を促進する可能性がある転写因子/共役因子を検索し、その遺伝子のノックダウンなどにより、上記の変化が消失するか検討する必要がある。

2) マウス腸炎モデルによる検討

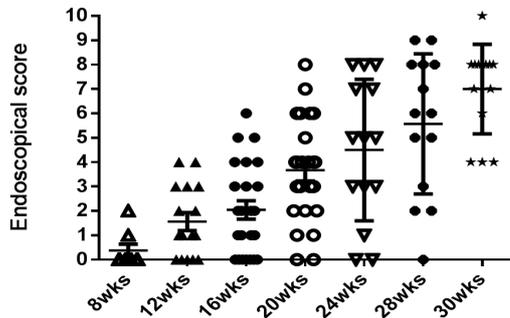


図4 IL-10 ノックアウトマウスの経時的腸炎増悪の検討

従来のマウス腸炎モデルでは、腸炎マウスから腸管組織を摘出し組織学的に炎症の評価を行う必要があったため、同一のマウスでの経時的な腸炎動態の解析が困難であり、解析に相当数のマウスを使用する必要があった。そこで我々はまずマウス内視鏡システムをセットアップを行った。当施設においては、IL-10 ノックアウトマウス腸炎は28週齢までには発症、増悪することを確認することが出来た(図4)。今後、マイクロアレイから IL-10 を制御する候補分子を決定し、そのノックアウトマウスを使用した腸炎の検討を行う必

要がある。

5. 主な発表論文等

(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 2 件)

星奈美子、Critical role of MyD88 signaling in CD11c+ cells in progression of intestinal tumor、日本免疫学会、2015年11月18日、札幌コンベンションセンター、札幌、北海道

星奈美子、Interactions of Host Cells, Microbiota and Its Metabolites in the Intestinal Tumor、Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology、2015年5月13日、ソウル、韓国

〔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

星奈美子 (HOSHI, Namiko)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号: 40645214

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: