HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	腸内細菌による腸管粘膜免疫の調節におけるmicroRNAの役割に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	逢坂, 文那
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14380号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81483
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ohsaka_Fumina_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 逢坂 文那

学 位 論 文 題 名

腸内細菌による腸管粘膜免疫の調節における microRNA の役割に関する研究

哺乳類の腸管には、1000 種類を超える細菌種が 100 兆個程度存在し、腸内細菌叢を形成している。腸管では粘膜免疫が生体防御を担っており、その発達や恒常性維持に腸内細菌叢が重要な役割を果たしている。

microRNA（miRNA）は約 20 塩基のタンパク質に翻訳されない RNA の一つであり、mRNA の 3'非翻訳領域との部分相補的な結合を介して翻訳を抑制することにより、さまざまな生理現象に関与する。腸管粘膜免疫の調節にも miRNA が関与するが、腸内細菌叢が腸管粘膜免疫に影響をおよぼす際の miRNA の役割についてはほとんど知られていない。本研究では、腸内細菌叢を持たない無菌マウスと通常マウスの大腸の粘膜固有層白血球（lamina propria leukocyte、LPL）における miRNA と mRNA の発現を網羅的に比較することにより、腸内細菌叢の存在によって大腸 LPL において発現が変化する miRNA とその標的 mRNA を探索し、それらの腸管免疫調節への関与を追究した。

1. 通常マウスおよび無菌マウスの大腸粘膜固有層白血球の microRNA プロファイルおよび標的遺伝子の解析

無菌（germ free、GF）マウスと通常（specific pathogen free、SPF）マウスから分離した大腸 LPL の miRNA と mRNA の発現プロファイルをマイクロアレイにより網羅的に解析した。GF マウスと比較して SPF マウスでは miR-200 ファミリー（miR-200a-3p/-141-3p、miR-200b-3p/-200c-3p/-429-3p）の発現レベルが高くなっていた。一方、mRNA については、miRNA による遺伝子サイレンシングの観点から、GF マウスと比較して SPF マウスで低値を示した遺伝子に着目し、遺伝子オントロジー解析を行うと、*P* 値が 0.05 未満の上位 10 個の GO term のうち、感染防御と免疫系に関連する遺伝子が多いことが示された。それらの中から miR-200 ファミリーの標的遺伝子として 5 遺伝子（*Bcl11b*、*Ets1*、*Gbp7*、*Stat5b*、*Zeb1*）が予測された。*Bcl11b*、*Ets1*、および *Zeb1* は、腸管粘膜免疫の調節に重要な役割を果たすサイトカインの一種である IL-2 をコードする *Il2* 遺伝子の転写因子である。大腸 LPL における BCL11B および ETS-1 のタンパクレベルは GF マウスと比較して

SPF マウスで低値を示したが、ZEB1 のレベルに差は見られなかった。また、大腸 LPL の IL-2 産生を調べたところ、GF マウスに比べて SPF マウスで低値を示した。さらに、GF マウスと SPF マウスにおける miR-200 ファミリーおよび標的遺伝子の発現ならびに IL-2 産生の差異は、糞便細菌移植によって GF マウスに腸内細菌叢を再構築することにより消失した。以上の結果は、腸内細菌叢が存在することにより大腸 LPL において miR-200 ファミリーによる *Bcl11b* および *Ets1* の発現抑制が生じる結果、IL-2 産生が減少することを示唆する。

2. マウス T 細胞株における microRNA-200 ファミリーの導入条件下での標的遺伝子の解析

miR-200 ファミリーによる標的遺伝子の発現抑制を証明するため、マウス T 細胞株である EL-4 細胞に miR-200a-3p および-200b-3p を遺伝子導入した。その結果、それらの標的遺伝子の mRNA およびタンパクレベルは有意に減少した。したがって、GF マウスと SPF マウスの比較から示唆された大腸 LPL における miR-200 ファミリーによる標的遺伝子の発現抑制を直接的に証明したということができる。

3. 1-ケストース摂取がマウス大腸粘膜固有層白血球の microRNA プロファイルおよび標的遺伝子におよぼす影響の解析

GF マウスと SPF マウスの比較に比べて、より生理的な条件、すなわち食物成分により腸内細菌叢の構成を変化させた際の miRNA の発現変化を検討した。腸内細菌叢の構成を変化させることが知られている難消化性オリゴ糖の一種である 1-ケストース（KES）の摂取により、大腸 LPL の miR-200 ファミリーの発現が増加することを、マイクロアレイを用いた網羅解析により明らかにした。

4. マウス大腸粘膜固有層白血球の microRNA 発現を変化させる腸内細菌因子の探索

腸内細菌叢が大腸 LPL の miRNA の発現に影響をおよぼす機序を明らかにするために、腸内細菌の主要な代謝産物である短鎖脂肪酸および菌体成分である各種 Toll 様受容体リガンドを、培養した大腸 LPL に添加した際の miR-200 ファミリーの発現レベルを調べた。しかしながら、miR-200 ファミリーの発現変化は観察できなかった。これらの結果は、短鎖脂肪酸や菌体成分が大腸 LPL の miRNA 発現に直接影響することはなく、腸上皮細胞を介して間接的に影響する可能性を示唆する。

以上のように、本研究により、腸内細菌叢が大腸 LPL における IL-2 産生を制御する際の miR-200 ファミリーによる遺伝子発現制御の役割を明らかにした。腸管粘膜免疫において IL-2 が防御免疫および免疫寛容の両方に関与することを考慮すると、腸内細菌叢の存在はそれらいずれも抑制することになるが、宿主の進化の観点からは、腸内細菌が miR-200/BCL11B・ETS-1/IL-2 軸による防御免疫の低下を介して、宿主との共生を達成していると考えることができる。