



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博 士（農学） 氏名 逢 坂 文 那

審査担当者	主 査	教 授	園 山	慶
	副 査	教 授	有 賀	早 苗（生命科学院）
	副 査	教 授	石 塚	敏
	副 査	准教授	比 良	徹

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

本論文は、和文 74 頁、図 20、表 5、6 章からなり、参考文献 1 編が付されている。

哺乳類の腸管には多数の細菌が常在して腸内細菌叢を形成しており、腸管粘膜免疫の発達や調節に重要な役割を果たしている。microRNA (miRNA) は約 20 塩基の非翻訳 RNA 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、多彩な生理現象に関与する。しかしながら、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。本論文は、このことに関する新たな情報を得ることを目的として行った実験研究をまとめたものである。

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

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。マイクロアレイ解析の結果、無菌マウスと比較して通常マウスでは miR-200 ファミリー (miR-200a-3p/-141-3p、miR-200b-3p/-200c-3p/-429-3p) の発現レベルが高値を示した。一方、無菌マウスと比較して通常マウスで低値を示した mRNA の遺伝子オントロジー解析を行うと、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 *Bcl11b*、*Ets1*、*Gbp7*、*Stat5b*、および *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インターロイキン (interleukin、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

ルは無菌マウスと比較して通常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、無菌マウスに比べて通常マウスで低値を示した。さらに、無菌マウスと通常マウスとの間に見られた上記の差異は、糞便細菌移植によって無菌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 EL-4 に miR-200a-3p および-200b-3p を遺伝子導入したところ、それらの標的遺伝子の mRNA およびタンパクレベルが減少した。したがって、無菌マウスと通常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えることができる。

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

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-ケストースの摂取により、大腸 LPL における miR-200 ファミリーの発現が増加することを明らかにした。

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いことを示唆する。

以上のように、本研究は、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解明した。本研究は、腸内細菌叢が腸管粘膜免疫の発達や調節に役割を果たす際の分子機序に新知見を加えたものであり、腸内細菌叢と宿主動物の共生の全体像の理解に貢献するものと評価できる。よって、審査員一同は、逢坂文那氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。