



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 [全文の要約]
Author(s)	逢坂, 文那
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/81484
Type	doctoral thesis
File Information	Ohsaka_Fumina_summary.pdf



博士論文の要約

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、1,000 種類を超える細菌種が総数で約 100 兆個生息し、多様な生態系（腸内細菌叢）を形成している（Bäckhed *et al.* 2005）。腸内細菌は主に 4 つの門（Firmicutes、Bacteroidetes、Proteobacteria、Actinobacteria）の細菌群から構成されており、Firmicutes 門および Bacteroidetes 門が全体の約 8～9 割を占めている。腸管粘膜は一層の上皮細胞により覆われ、その大部分を吸収上皮細胞が占め、主に栄養素の吸収を行なっている。一方で、上皮細胞は管腔という外界と接し、病原性微生物の最大の侵入経路となるため、独自のバリアシステムを構築している。例えば、上皮細胞の一種である杯細胞は、糖タンパクの一種であるムチンを主成分とする粘液を分泌することにより、病原菌などの外的刺激から粘膜上皮を守っている（Goto *et al.* 2014）。また、やはり小腸上皮に存在するパネート細胞はトール様受容体（toll-like receptor、TLR）や Nod-like（NOD）受容体を介して微生物を認識し、抗菌ペプチドであるディフェンシンやリゾチームなどの抗菌物質を分泌することで微生物の侵入を防いでいる（Hooper & Macpherson 2010; Kunisawa & Kiyono 2013）。

腸管ではこのような物理的・化学的なバリア機構だけでなく、ユニークな粘膜防御機構が存在する。上皮には主に細胞傷害性 CD8⁺ T 細胞からなる上皮間リンパ球が存在し、ウイルスに感染した上皮細胞のアポトーシスを誘導する（Cheroutre 2004）。また、粘膜免疫誘導組織としてパイエル板（Peyer's patch、PP）、孤立リンパ節、および腸間膜リンパ節（mesenteric lymph node、MLN）が知られており、これらは腸管関連リンパ組織（gut-associated lymphoid tissue、GALT）と称される（Bäckhed 2005）。GALT は、腸管内抗原に対する免疫応答の開始部位であり、特に PP では、抗原取り込みに特化した M 細胞が上皮に存在し、その直下に集積している樹状細胞（dendritic cell、DC）に抗原を輸送することで、抗原特異的免疫グロブリン A（immunoglobulin A、IgA）抗体産生を中心とする免疫応答を惹起する（Mabbott *et al.* 2013; Hooper & Macpherson 2010）。PP の B 細胞濾胞中には胚中心（germinal center、GC）が形成され、B 細胞の IgA 陽性細胞へのクラススイッチが行われる（Macpherson *et al.* 2008）。上皮細胞の下層にある粘膜固有層（lamina propria、LP）に存在する DC もまた、細胞突起を上皮細胞間に伸長することで管腔

内の抗原を取り込み、免疫応答を誘導する (Niess *et al.* 2005)。さらに、LP には、IgA 抗体産生形質細胞、T 細胞、自然リンパ球、DC、マクロファージなどの多くの免疫担当細胞が存在し、上皮細胞とのクロストークにより腸管免疫系の維持を担っている (Hooper & Macpherson 2010)。

腸管免疫の発達には腸内細菌が関わっており、SPF (specific pathogen free、SPF) マウスに比べて常在菌をもたない無菌 (germ free、GF) マウスでは、実際に、GALT、脾臓およびその他のリンパ組織が未発達であり、IgA 抗体産生形質細胞、Th17 細胞、Treg 細胞、インバリアントナチュラルキラーT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、DC、および自然リンパ球の数はいずれも GF マウスにおいて少ない (Honda & Littman 2012)。これらの免疫細胞数の減少は SPF マウスの腸内容物あるいは糞の細菌叢移植により回復する。

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、線虫からヒトに至るまでさまざまな生物種のゲノムにコードされていることが明らかとなっている。標準的な miRNA の生合成経路は以下のように進む (Bartel 2018)。miRNA 遺伝子が RNA ポリメラーゼ II (RNA polymerase II、Pol II) により転写されることにより、primary miRNA (pri-miRNA) が産生される。次に、2 つの RNase III ドメインをもつ Drosha と二本鎖 RNA (double-strand、dsRNA) 結合タンパク質である DiGeorge 症候群必須領域遺伝子 8 (*DGCR8*) が会合し、マイクロプロセッサーと呼ばれる複合体を形成することで、pri-miRNA のヘアピン基部を切断する。これにより、長さ約 60 塩基のプレカーサー-miRNA または pre-miRNA と呼ばれるヘアピン構造が産生される。Drosha は 3'末端に 2 塩基のオーバーハングを残すことにより、成熟 miRNA 鎖の末端側を決定する。Exportin-5 はオーバーハングを認識後に pre-miRNA を核から細胞質に輸送し、Dicer によるさらなるプロセッシングをうける。Dicer は、Drosha と同様に 2 つの RNase III ドメインを持ち、pre-miRNA の 3'オーバーハングへの高い親和性により結合する Piwi-Argonaute-Zwille (PAZ) ドメイン、ヘリカーゼドメイン、DUF283 サブユニット、および dsRNA 結合ドメインからなる。Dicer は、pre-miRNA を切断し、2 本鎖の miRNA (miRNA duplex) を産生する。2 本鎖 miRNA はアルゴノート (Argonaute、AGO) タンパク質に取り込まれることによって、一方の RNA 鎖が除去され、もう一方の RNA 鎖だけが AGO タンパク質と安定な複合体を形成し、RNA 誘導型サイレンシング複合体 (RNA-induced silencing complex、RISC) となる。2 本鎖 RNA のうち最終的に機能するのがガイド鎖、除去される RNA はパッセンジャー鎖 (miRNA*、スター鎖) と呼ばれ、最終的に RISC に取り込まれたガイド鎖は成熟 miRNA として、標的 mRNA と結合し、翻訳抑制や mRNA の分解により転写後抑制を行う。

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 (germ free、GF) マウスと通常 (specific pathogen free、SPF) 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、それらの腸管粘膜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

ncRNA の一種である miRNA は、エピジェネティックな制御を介して標的遺伝子の発現制御を担い、様々な疾患や生理現象に関与している。腸管免疫の発達や機能の調節においても miRNA は一定の役割を担っていると考えられるが、その詳細は明らかではない。これまでに、腸内細菌叢が存在する通常マウスおよび存在しない無菌マウスとして、それぞれ SPF マウスおよび GF マウスを用いた腸粘膜組織や腸上皮細胞の miRNA 発現の比較についてはいくつか報告があるものの (Dalmaso *et al.* 2011; Singh *et al.* 2012)、免疫細胞とりわけ腸内細菌の主要な定着部位である大腸の LPL における miRNA の発現を GF マウスと SPF マウスで比較した例はこれまでにない。

本研究では、GF マウスと SPF マウスから分離した大腸 LPL の miRNA と mRNA の発現プロフィールをマイクロアレイ (3D Gene、オリゴチップ、東レ) 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、特異的な miRNA ファミリー (miR-X ファミリー) の発現レベルが高くなっていた。このことは、Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) 法によって確認された。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、Database for Annotation, Visualization Discovery and Integrated (DAVID) 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov>) を用いた遺伝子オン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-X ファミリーの標的遺伝子として 5 遺伝子が予測された。なお、miRNA の標的遺伝子の予測には web ツールである TargetScan

(<http://targetscan.org/>) を用いた。予測された 5 遺伝子のうち、遺伝子 A、遺伝子 B および遺伝子 C 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 Y をコードする遺伝子の転写因子であった。大腸 LPL における A および B 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、C のレベルに差は見られなかった。また、ホルボール 12-ミリスタート 13-アセタート (phorbol 12-myristate 13-acetate、PMA) /イオノマイシン存在下で培養した大腸 LPL のサイトカイン Y の産生を ELISA 法により調べたところ、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-X ファミリーおよび標的遺伝子の発現ならびにサイトカイン Y の産生の差異は、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-X ファミリーによる遺伝子 A および遺伝子 B の発現抑制が生じる結果、サイトカイン Y の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-X ファミリーの導入条件下での標的遺伝子の解析

miR-X 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-X mimic を Neon transfection system を用いたエレクトロポレーション法(1080 V、パルス幅 50 ms、パルス回数 1 回)により導入した。EL-4 細胞への miR-X mimic の一過性発現は qRT-PCR 法により評価した。その結果、Negative control の導入と比べて miR-X mimic を導入した EL-4 細胞で miR-X の発現レベルは有意に増加し、標的遺伝子の mRNA レベルおよびタンパクレベルは、qRT-PCR 法およびウエスタンブロット法により有意に減少することを観察した。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-X ファミリーによる標的遺伝子の発現抑制を直接証明したといえることができる。

3. 難消化性オリゴ糖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。これまでに、GF マウスと通常マウスの腸粘膜組織や腸上皮細胞、糞中 miRNA の発現プロファイルが異なることが報告されている (Dalmaso *et al.* 2011; Singh *et al.* 2012; Nakata *et al.* 2017; Viennois *et al.* 2019)。以上のような先行研究における腸内細菌叢が存在しない GF マウスと存在する通常マウスの比較は、腸内細菌叢の存在の有無が腸管の miRNA 発現におよぼす影響を明確にしているが、食餌条件により腸内細菌叢の構成が変化する条件で腸管の miRNA の発現を解析した例はこれまでに報告されていない。

本研究では、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をマウスに二週間与えたときの、大腸 LPL 中における miRNA の発現プロファイルをマイクロアレイにより解析した。その結果、miR-Z ファミリーの発現が増加することを明らかにした。同時に難消化性オリゴ糖摂取により盲腸内容物中のビフィズス菌数が増加したことから、難消化性オリゴ糖摂取により増加したビフィズス菌が大腸 LPL における miRNA の発現を変化させた可能性がある。今後、腸内細菌叢の構成と大腸 LPL の miRNA 発現プロファイルとの関係を詳細に解析することにより、miRNA の発現変化に寄与する特異的な細菌群を明らかにすることができる。

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 (short-chain fatty acid、SCFA) および菌体成分である各種トール様受容体 (toll-like receptor、TLR) リガンド (LPS、Flagellin、Pam3CSK4、ODN 1589、および imiquimod) を、培養した大腸 LPL に添加した際の miRNA の発現を qRT-PCR 法により

調べた。しかしながら、発現変化は観察できなかった。これらの結果は、SCFA や菌体成分が大腸 LPL の miRNA 発現に直接影響することではなく、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。すなわち、菌体成分や代謝産物のような腸内細菌の因子が、腸上皮細胞に働きかけて何らかのサイトカインの産生・分泌を刺激し、そのようなサイトカインが LPL における miRNA の発現に影響をおよぼす可能性は十分に考えられる。腸内細菌が大腸 LPL の miRNA 発現に影響を与える細胞・分子機構を解明するためには、さらなる研究が必要である。

以上のように、本研究により、腸内細菌叢が大腸 LPL におけるサイトカイン Y の産生を制御する際の miR-X 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。

引用文献

- Bäckhed F., Ley R. E., Sonnenburg J. L., Peterson D. A., & Gordon J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307: 1915–1920.
- Bartel D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173: 20–51.
- Cheroutre, H. (2004). Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annual Review of Immunology*. 22: 217–246.
- Dalmasso G., Nguyen H. T. T., Yan Y., Laroui H., Charania M. A., Ayyadurai, S., Sitaraman S. V., & Merlin D. (2011). Microbiota modulate host gene expression via microRNAs. *PLoS One* 6: e19293.
- Goto Y., Obata T., Kunisawa J., Sato S., Ivanov I. I., Lamichhane A., Takeyama N., Kamioka M., Sakamoto M., Matsuki T., Setoyama H., Imaoka A., Uematsu S., Akira S., Domino S. E., Kulig P., Becher B., Renauld J.-C., Sasakawa C., Umesaki Y., Benno Y., & Kiyono H. (2014). Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science* 345: 1254009.
- Hooper L. V., Littman D. R., & Macpherson A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 336: 1268–1273.
- Hooper L. V. & Macpherson A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology* 10: 159–169.
- Kunisawa J., & Kiyono H. (2013). Immune regulation and monitoring at the epithelial surface of the intestine. *Drug Discovery Today*. 18: 87–92.

- Mabbott N. A., Donaldson D. S., Ohno H., Williams I. R., & Mahajan A. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunology* 6: 666–677.
- Macpherson, A. J., McCoy, K. D., Johansen, F.-E., & Brandtzaeg, P. (2008). The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology*. 1: 11–22.
- Nakata K., Sugi Y., Narabayashi H., Kobayakawa T., Nakanishi Y., Tsuda M., Hosono A., Kaminogawa S., Hanazawa S., & Takahashi K. (2017). Commensal microbiota-induced microRNA modulates intestinal epithelial permeability through the small GTPase ARF4. *The Journal of Biological Chemistry* 292: 15426–15433.
- Niess, J. H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B. A., Vyas, J. M., Boes, M., Ploegh, H. L., Fox, J. G., Littman, D. R., & Reinecker, H.-C. (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*. 307: 254–258.
- Viennois E., Chassaing B., Tahsin A., Pujada A., Wang L., Gewirtz A. T., & Merlin D. (2019). Host-derived fecal microRNAs can indicate gut microbiota healthiness and ability to induce inflammation. *Theranostics* 9: 4542–4557.
- Singh N., Shirdel E. A., Waldron L., Zhang R.-H., Jurisica I., & Comelli E. M. (2012). The murine caecal microRNA signature depends on the presence of the endogenous microbiota. *International Journal of Biological Sciences* 8: 171–186.