

氏 名	岡本 紀夫
(ふりがな)	(おかもと のりお)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲博医第7号
学位審査年月日	令和3年7月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Hepatic F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD68 <sup>-</sup> cells influence the antibacterial response in irradiated mice with sepsis by <i>Enterococcus faecalis</i> ( <i>E.faecalis</i> 敗血症をきたした放射線照射マウス単球由来肝臓マクロファージの性質および感染抵抗に関する検討)
論文審査委員	(主) 教授 中野 隆史 教授 浮村 聡 教授 二瓶 圭二

## 学位論文内容の要旨

### 《背景と目的》

Bacterial translocation は腸内細菌が腸上皮を通過し、腸間膜リンパ節や肝臓を含む多臓器へ移行することと定義され、敗血症の原因の1つである。原因菌として腸球菌が約10%を占めている。敗血症の治療は細菌の除去が患者の生存にとって最も重要なプロセスで、腸間膜リンパ節や肝臓は細菌の排除に重要な役割を担っている。宿主に侵入した病原体に対する自然免疫系の主要なエフェクター細胞の1つに macrophage (Mφ) がある。肝臓には Kupffer 細胞と呼ばれる肝臓 Mφが存在し、macrophages derived from circulating monocytes (MDMφ) (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD68<sup>-</sup>) と resident Mφ (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD68<sup>+</sup>) との2種類の異なる細胞集団に区別されることが報告された。MDMφは骨髄で産生された単

球に由来し、resident M $\phi$ は卵黄嚢あるいは胎児肝臓で発生した前駆細胞に由来する。また消化管に対する放射線照射は腸管バリアを破壊し、bacterial translocation を引き起こしやすくする。放射線を照射したマウスにおける腸管感染症モデルでは、腸間膜リンパ節 M $\phi$ の性質が感染抵抗性に関与していることが知られている。しかし、bacterial translocation による敗血症においてそれぞれの肝臓 M $\phi$ がどのように感染抵抗性に関与しているのかは不明である。

今回我々は、1) 敗血症における 2 種類の肝臓 M $\phi$ の性質と役割、2) 敗血症における放射線照射マウスの 2 種類の肝臓 M $\phi$ の性質と感染感受性への関与、3) 放射線照射マウスの肝臓 M $\phi$ を対象とした遺伝子治療による感染抵抗性改善効果を検討した。

#### 《方 法》

雄の 7 週齢の C57BL/6 マウスに 4Gy 全身放射線照射を行い、放射線照射マウスを作製した。雄の 6 週齢の NOD-SCID IL-2 $\gamma$  null マウスに 4Gy の放射線照射を行い、効果的な免疫担当細胞を持たない免疫不全マウスを作製した。正常マウスもしくは放射線照射マウスから分離した MDM $\phi$ か resident M $\phi$ をそれぞれ免疫不全マウスに移入した。感染実験には *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*) ( $5 \times 10^4$  CFU/mouse) を経静脈感染させ、その生存率および血液、肝臓と腎臓における菌増殖を colony counting method を用いて調べた。次に感染時の正常マウスおよび放射線照射マウスの MDM $\phi$ と resident M $\phi$ の性質の違いを調べるため、正常マウスおよび放射線照射マウスに *E.faecalis* ( $1 \times 10^7$  CFU/mouse) を経静脈感染させ、MDM $\phi$ と resident M $\phi$ を単離し、それぞれの細胞数をカウントした。各細胞における microRNA-27a (miR-27a) と microRNA-222 (miR-222) の発現を RT-PCR で測定し、細胞内サイトカイン (IL-12、IL-10、CCL1) および表面マーカー (CD206) を flow cytometry で調べた。また、各細胞 ( $1 \times 10^6$  個/mL) の 24 時間培養上清中のサイトカイン (IL-12、IL-10、CCL1) を ELISA で調べた。更に放射線照射マウスの MDM $\phi$  ( $1 \times 10^6$  個/mL) を CCL1 antisense Oligodeoxynucleotides (ODN) (6 $\mu$ g/ml) で 24 時間処理し、その培養上清中のサイトカイン (IL-12、IL-10、CCL1) を ELISA で調べた。また同細胞

( $2 \times 10^5$  個/mL) を *E.faecalis* ( $2 \times 10^5$  CFU/well) にて感染させ、その殺菌能を colony counting method を用いて調べた。CCL1 antisense ODN で 24 時間処理した放射線照射マウスの MDM $\phi$  ( $5 \times 10^3$  個/mouse) を免疫不全マウスに移入し、*E.faecalis* ( $2 \times 10^4$  CFU/mouse) を経静脈感染させ、その生存率および各臓器の菌数を検討した。

## 《結 果》

正常マウスの MDM $\phi$  を移入し経静脈感染させた免疫不全マウスは、全て 7 日間生存し、各臓器に菌の増殖を認めなかった。一方、正常マウスの resident M $\phi$ 、放射線照射マウスの MDM $\phi$  および resident M $\phi$  をそれぞれ移入し経静脈感染させた免疫不全マウスは、4 日以内に全て死亡し、各臓器において著明な菌増殖を認めた。このことから、正常マウスの MDM $\phi$  を移入した免疫不全マウスは *E.faecalis* 経静脈感染に対し感染抵抗性が高かったが、正常マウスの resident M $\phi$  を移入した免疫不全マウスと放射線照射マウスの MDM $\phi$  および resident M $\phi$  をそれぞれ移入した免疫不全マウスは感染抵抗性が低いことが判明した。

次に正常マウスでは感染時に MDM $\phi$  の細胞数は増加したが、resident M $\phi$  の細胞数は変化しなかった。一方、放射線照射マウスの MDM $\phi$  と resident M $\phi$  の細胞数は感染時に変化しなかった。放射線照射マウスの MDM $\phi$  は正常マウスと比較して miR-27a および miR-222 を発現していた。正常マウスの MDM $\phi$  は感染時に IL-12<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup>CD206<sup>-</sup>CCL1<sup>-</sup>細胞であった。一方、放射線照射マウスの MDM $\phi$  は感染の有無に関わらず IL-12<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>CCL1<sup>+</sup>細胞であった。正常マウスおよび放射線照射マウスの resident M $\phi$  は感染の有無に関わらず、miR-27a および miR-222 を発現せず、IL-12<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>CCL1<sup>-</sup>細胞であった。このことから、正常マウスの感染時における MDM $\phi$  は殺菌能を有する M1M $\phi$  の性質を持っていたが、放射線照射マウスの MDM $\phi$  は感染に関わらず常に殺菌能を持たない M2bM $\phi$  の性質を維持していた。また、正常マウスおよび放射線照射マウスの resident M $\phi$  は感染があろうがなかろうが殺菌能を持たない M2aM $\phi$  の性質を持ち続けていた。

次に、M2bM $\phi$  の性質を変化させる目的にて CCL1 antisense ODN を用いた遺伝子治療の効果を検討した。CCL1 antisense ODN で処理した放射線照射マウスの MDM $\phi$  は CCL1

を産生せず、*E.faecalis*に対する殺菌能が認められた。更に CCL1 antisense ODN で処理した放射線照射マウスの MDM $\phi$ を免疫不全マウスに移入し、同マウスに *E.faecalis* を経静脈感染させたところ、それらのマウスは全例生存し、各臓器における菌増殖も認めなかった。このことから、放射線照射マウスの MDM $\phi$ は CCL1 antisense ODN で処理することで M2bM $\phi$ の性質を失い、最終的に感染抵抗性を獲得し、その細胞を移入した免疫不全マウスにおける感染抵抗性を導くことができた。

#### 《考 察》

今回の実験結果より、resident M $\phi$ は殺菌能を持たない M2aM $\phi$ であり、感染時でも性質は変化せず感染抵抗性を示さなかった。一方、正常マウスの MDM $\phi$ は *E.faecalis* 経静脈感染時に殺菌能を有する M1M $\phi$ に誘導され宿主の感染抵抗性に関与していた。ところが、放射線照射マウスの MDM $\phi$ は殺菌能を持たない M2bM $\phi$ の性質を持ち、易感染性の原因の 1 つであった。その M2bM $\phi$ の維持には、M2bM $\phi$ 自らも産生している CCL1 が必須である。放射線照射により誘導される miR-222 は、GAS5 遺伝子発現を抑制することが知られており、GAS5 遺伝子は CCL1 遺伝子の silencer であることから、結果的に放射線照射マウスの MDM $\phi$ では CCL1 産生が維持され、M2bM $\phi$ が長期に渡り存在し、感染抵抗性を低下させてしまう。CCL1 antisense ODN で処理した放射線照射マウスの MDM $\phi$ は M2bM $\phi$ の性質を失い、感染抵抗性を認めた。これらの結果から、M2bM $\phi$ により低下した宿主の感染抵抗性は、CCL1 antisense ODN を用いた遺伝子治療により回復しうる可能性があることを示している。

#### 《結 論》

放射線照射マウス MDM $\phi$ は M2bM $\phi$ の性質を持ち、それが宿主の感染感受性に関与した。同細胞に CCL1 antisense ODN で処理することは、同細胞の M2bM $\phi$ としての性質を失わせ、最終的に宿主の感染抵抗性を改善させる遺伝子治療となる可能性がある。

## 論文審査結果の要旨

放射線被曝はさまざまな合併症を引き起こす。その 1 つに腸管バリアの破壊による bacterial translocation があり、敗血症に至ると生命を脅かす臓器障害を導く。敗血症の治療として細菌の排除が重要で、肝臓がその役割の一部を担っている。宿主に侵入した病原体に対する自然免疫系の主要なエフェクター細胞の 1 つに macrophage (M $\phi$ ) があり、肝臓では Kupffer 細胞が細菌の排除に重要な役割を担っている。Kupffer 細胞は macrophages derived from circulating monocytes (MDM $\phi$ ) (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD68<sup>-</sup>) と resident M $\phi$  (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD68<sup>+</sup>) との 2 種類の異なる細胞集団に区別され、それぞれの M $\phi$  が感染の際にどのような役割を果たしているか不明である。

申請者らは正常マウスおよび放射線照射マウスの MDM $\phi$  と resident M $\phi$  を単離し、同細胞を移入した免疫不全マウスに *E.faecalis* 経静脈感染させ、感染抵抗性について検討した。また、正常マウスおよび放射線照射マウスに *E.faecalis* 経静脈感染させ、MDM $\phi$  と resident M $\phi$  の性質を評価した。その結果、正常マウスの MDM $\phi$  を移入した免疫不全マウスは *E.faecalis* 経静脈感染に対し感染抵抗性が高かったが、resident M $\phi$  を移入した免疫不全マウスと放射線照射マウスの MDM $\phi$  および resident M $\phi$  をそれぞれ移入した免疫不全マウスは感染抵抗性が低いことを示した。正常マウスの感染時における MDM $\phi$  は殺菌能を有する M1M $\phi$  の性質を持っていたが、放射線照射マウスの MDM $\phi$  は感染の有無に関わらず殺菌能を持たない M2bM $\phi$  の性質を持っており、正常マウスおよび放射線照射マウスの resident M $\phi$  は感染の有無に関わらず殺菌能を持たない M2aM $\phi$  の性質を持ち続けることが示された。このことから、放射線照射マウス MDM $\phi$  は M2bM $\phi$  に誘導され、それが宿主の感染感受性に関与していることを示した。次に、M2bM $\phi$  の性質を変化させる目的にて CCL1 antisense ODN を用いた遺伝子治療の効果を検討し、CCL1 antisense ODN で処理した放射線照射マウスの MDM $\phi$  は *E.faecalis* に対し殺菌能を示し、同細胞を移入した免疫不全マウスは *E.faecalis* 経静脈感染に対し、感染抵抗性を回復した。このことから、M2bM $\phi$  が存在する個体において、M $\phi$  に対する CCL1 antisense ODN を用いた遺伝子治療が感染抵抗性を改善させる可能性を明らかにした。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

Journal of Leukocyte Biology 109(5): 943-952, 2021 May

doi: 10.1002/JLB.4A0820-550RR.