

氏名	大濱 日出子
(ふりがな)	(おおはま ひでこ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成27年7月22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	M2b macrophage elimination and improved resistance of mice with chronic alcohol consumption to opportunistic infections (M2b マクロファージを排除することで慢性アルコール投与マウスはアルコール過剰摂取時に起こしやすい感染症に対する抵抗性が改善する)
論文審査委員	(主) 教授 内 山 和 久 教授 浮 村 聡 教授 佐 野 浩 一

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 《背景と目的》

慢性アルコール性肝障害患者は腸内に存在する常在菌などによる日和見感染症を起こしやすく、これは健常人では見られない。その背景にあるアルコール過剰摂取状態で免疫機能が低下しているのがその原因と考えられる。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にマクロファージ(M $\phi$ )がある。M $\phi$ は活性化すると、抗菌活性を持ち IL-12 を産生する M1M $\phi$ と、レジデント M $\phi$ から M1M $\phi$ へ転換することを阻害し、抗菌活性を持たずに IL-10 を産生する M2M $\phi$ が存在する。今回、アルコール過剰摂取時の日和見感染に対する感染抵抗性を明らかにすることを目的として、1) 慢性アルコール投与マウス(chronic alcohol consumption mice : CAC-mice)の日和見感染に対する感受性と、

Mφの優位な分画を検討し、2) 遺伝子治療により CAC-mice の Mφの性質を変化させることによって、感染抵抗性を誘導できるかを検討した。

#### 《方 法》

雄の 9-12 週齢の BALB/c マウスを用い、CAC-mice を作成するためこれらに 20%アルコールを 0.5mL/日ずつ 4-16 週間経胃的に投与した。コントロールは同期間水を 0.5mL/日ずつ経胃的に投与した。感染実験には *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis* 29212 株)、*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae* 43816 株)を用いた。*E. faecalis* 10<sup>6</sup> CFU/mouse を経口接種し、バクテリアトランスロケーションのモデルとして接種後の生存率におけるアルコール投与期間の影響を調べた。*E. faecalis* 感染に対する宿主の感染抵抗性に影響する細胞を同定するために各種免疫不全マウスに 10<sup>6</sup> CFU/mouse の *E. faecalis* を経口接種し、腸間膜リンパ節 (mesenteric lymph node : MLN)における菌の増殖を colony forming method を用いて調べた。*K. pneumoniae*は 10<sup>3</sup> CFU/mouse を経気道的に接種し、肺炎、敗血症のモデルとして感染 2 日後に脾臓を採取し菌の増殖を調べた。CAC-mice の Mφの性質を調べるため、MLN Mφを分離し heat-killed *E. faecalis* と共培養した上で IL-12、IL-10、CCL17、CCL1、CXCL13 を ELISA で、CXCL9、iNOS、CD163、mannose receptor、ARG1、Chu313/Ym1、LIGHT、CCL1 の mRNA 発現を RT-PCR で検討した。CAC-mice の感染抵抗性に影響する因子を検討するため、12 週 CAC-mice に CCL1 antisense ODN(10 μg/mouse)を 1 日 2 回 2 日間皮下注射した後 MLN Mφを分離し heat-killed *E. faecalis* と共培養した上で IL-12 の産生を ELISA で、IL-12、CD163、CCL1 の発現を flow cytometry で検討した。さらに CCL1 antisense ODN 投与後、マウスから MLN Mφを分離し 3×10<sup>5</sup> CFU の *E. faecalis* と共培養を行い殺菌能を検討した。*In vivo* の検討として、12 週の CAC-mice に CCL1 antisense ODN を皮下注射後 *E. faecalis* を経口接種、*K. pneumoniae* を経気道接種し MLN における菌の増殖および生存率を検討した。

## 《結 果》

12 週 CAC-mice に *E. faecalis* を経口接種すると全て死亡したが、コントロール群は全て生存していた。*E. faecalis* を経口接種した SCID、SCIDbg、SCIDbgN、NOD/scid mice の MLN では菌は検出されず、SCIDbgMN、SCIDbgM、NSG mice の MLN で菌が増殖し、*E. faecalis* 感染に対する感染抵抗性に主として影響する細胞は M $\phi$  であった。

*K. pneumoniae* を経気道接種した CAC-mice から採取した脾臓では菌が増殖しており、*K. pneumouniae* 感染でも CAC-mice は同様に感染感受性が高いと考えられた。それぞれのマウスから MLN M $\phi$  を分離し heat-killed *E. faecalis* で刺激しその性質を調べたところ、コントロールでは IL-12 の産生と CXCL9、iNOS の mRNA の発現を、12 週 CAC-mice では IL-10、CCL1 の産生と CD163、LIGHT、CCL1 の mRNA 発現が認められた。このことからコントロールから単離した MLN M $\phi$  は抗原刺激により M1M $\phi$  の特徴を持つ細胞に変化するが、CAC-mice 由来の MLN M $\phi$  は刺激をしても M2bM $\phi$  のままと考えられた。

CAC-mice における CCL1 の作用を見るために、CCL1 antisense ODN を皮下注射した CAC-mice の M $\phi$  の性質を確認した。CAC-mice 由来の M $\phi$  は CD163<sup>+</sup>IL-12<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>CCL1<sup>+</sup> cells だったが CCL1 antisense ODN 投与後 CAC-mice 由来の M $\phi$  は CD163<sup>-</sup>IL-12<sup>-</sup>IL-10<sup>-</sup>CCL1<sup>-</sup> cells となった。また、CCL1 antisense ODN 皮下注射後 CAC-mice の MLN M $\phi$  を  $3 \times 10^5$  CFU/well の *E. faecalis* と共培養し殺菌能を見たところ、scrambled ODN 皮下注射した CAC-mice と比べ有意に高い殺菌能を示した。さらに、CCL1 antisense ODN を投与した CAC-mice に *E. faecalis*、*K. pneumoniae* を感染させたところいずれも生存しており、CCL1 antisense ODN 投与により CAC-mice は感染抵抗性となることが示された。

## 《考 察》

今回の実験結果より、CAC-mice が *E. faecalis* と *K. pneumoniae* に対し易感染性で、CAC-mice に存在する M2bM $\phi$  の優位性が易感染性の主因と判明した。

M2bM $\phi$  は免疫複合体と IL-1 $\beta$  による刺激などでレジデント M $\phi$  から分化すると報告されている。アルコール過剰摂取者では血中に高濃度の免疫複合体を認めるとの報告や、ア

アルコール投与マウスの肺胞、脾臓では免疫複合体に必要な Fc 受容体の活性化が見られるとの報告があり、さらに慢性アルコール投与マウスの脳・肝臓では、IL- $\beta$  を活性化させる NLRP3 inflammasome の活性化が報告されている。以上のことより、CAC-mice に M2bM $\phi$  が主に存在したメカニズムとしてはアルコールによる Fc 受容体や NLRP3 inflammasome の活性化が主なものと推察される。

CCL1 は今までの研究にて M2bM $\phi$  の性質維持に必要なケモカインであることが報告されている。以前の研究にて、M2bM $\phi$  が存在する熱傷マウスは CCL1 antisense ODN 投与により感染抵抗性が改善するという報告がある。今回、CAC-mice でも CCL1 antisense ODN 投与で M2bM $\phi$  がレジデント M $\phi$  に遡及され、感染抵抗性を誘導することが示された。この結果は M2bM $\phi$  が存在する個体においては CCL1 antisense ODN が有望な遺伝子治療となり得ることを示している。

#### 《結 論》

CAC-mice には M2bM $\phi$  が存在し、それが宿主の感染感受性に関与していることを示した。また CCL1 antisense ODN 治療により、CAC-mice に優位に存在する M2bM $\phi$  をレジデント M $\phi$  に遡及させ、さらに細菌刺激を加えることで M1M $\phi$  に転換することにより宿主の感染抵抗性が改善することが判明した。

## 論文審査結果の要旨

慢性アルコール性肝障害患者では、日和見感染症を起こしやすくなる。アルコール過剰摂取に関連した感染における原因菌の多くは腸内に存在する常在菌であるが、これらの菌による重症感染症は健常人では見られず、慢性アルコール性肝障害の背景にあるアルコール過剰摂取状態における免疫機能の低下に関与すると考えられる。

申請者らは慢性アルコール投与 BALB/c マウス(chronic alcohol consumption mice : CAC-mice)を作成し、アルコール過剰摂取時の細菌感染に対する感染抵抗性について検討した。その結果、CAC-mice は *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)の経口感染、*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)の経気道感染に対し易感染性であることを示した。また CAC-mice ではレジデント M $\phi$ から M1M $\phi$ への転換を阻害する抗菌活性をもたない M2M $\phi$ が優位に存在しており、そのことが易感染状態の一つの原因であることを明らかにした。さらに、M2bM $\phi$ の性質を維持するケモカインである CCL1 の antisense ODN を CAC-mice に皮下注射した後に細菌刺激を加えると、CAC-mice の M $\phi$ は M1M $\phi$ が優位となっており、*E. faecalis* と *K. pneumoniae* に対する感染抵抗性が改善した。このことから、CCL1 antisense ODN による治療は、CAC-mice に優位に認められる M2bM $\phi$ をレジデント M $\phi$ に遡及させ、さらに細菌刺激を加えることで M1M $\phi$ を誘導し、感染抵抗性を改善させることを明らかにした。

本研究は、アルコール過剰摂取時には M $\phi$ が M2bM $\phi$ 優位となることで易感染性を惹起すること、また遺伝子治療により M $\phi$ の性質を変更し、感染抵抗性を誘導できることを示しており、慢性アルコール性肝障害における感染症に対する、抗生剤以外の新たな治療法を確立することに貢献すると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 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)

The American journal of pathology 185 (2) : 420-431, 2015