

氏名	土本雄亮
(ふりがな)	(つちもと ゆうすけ)
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28年1月13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 monocytes provoke bacterial pneumonia and gut bacteria-associated sepsis in alcoholics (アルコール過剰摂取による M2b 単球は細菌性肺炎や腸管由来の細菌性敗血症の原因となる)
論文審査委員	(主) 佐野 浩一 浮村 聡 中野 隆史

### 学位論文内容の要旨

#### 《背景と目的》

アルコールの過剰摂取は、様々な菌に対する感染抵抗性を低下させることが知られている。健常人の上気道もしくは腸内に常在する細菌は、アルコール過剰摂取患者において、敗血症を引き起こし、主な死因の一つとなっている。一般的に細菌感染症に対しては抗菌化学療法が行われるが、耐性菌の出現による難治化や重症化が問題となっており、抗菌薬を使用しない宿主免疫系の活性化などの新たな治療法の開発が切望されている。自然免疫における主要な細胞は単球/マクロファージ(M $\phi$ )である。その M $\phi$  の subtype は、抗菌活性を有する M1M $\phi$  と、抗菌活性を有さず M1M $\phi$  の誘導を阻害する M2M $\phi$  の二つに大きく大別されている。更に、M2M $\phi$  は表面抗原、サイトカインやケモカインの産生能などにより、M2aM $\phi$ 、M2bM $\phi$ 、M2cM $\phi$ 、M2dM $\phi$  の subtype に分けられる。アルコール過剰摂取ヒト化マウスモデルは易感染性であり、その原因が同個体に優位に存在する M2bM $\phi$  であるこ

とが、既に報告されている。今回、アルコール過剰摂取患者における易感染性の原因を解明するため、同患者由来 M $\phi$  の subtype を検討し、易感染性にどのような影響を及ぼしているのか、更にその M $\phi$  の subtype を変化させることにより細菌感染抵抗性を導きうるかどうかを検討した。

#### 《方 法》

雄の 12 週齢の T 細胞、B 細胞、NK 細胞が欠乏した NOD-SCID IL-2  $\gamma$  null マウスに 4Gy の放射線照射を行い、好中球を欠損させた免疫不全マウスを作成し、健常人やアルコール患者の末梢血から分離した単核球をその免疫不全マウスに移植し、ヒト化キメラマウスを作製した。感染実験には *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae* 43816 株) または *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis* 29212 株) を用いた。移入する単核球数は  $1 \times 10^4$  個から  $1 \times 10^6$  個の範囲とし、感染させる細菌数は *K. pneumoniae* は  $10^2$  から  $10^4$  CFU/mouse、*E. faecalis* は  $10^6$  から  $10^8$  CFU/mouse の範囲とした。*K. pneumoniae* は経気道的に、*E. faecalis* は経口的に接種し、その後の生存率の違いを検討した。また経気道的接種の場合は肺、腎臓、脾臓にて、経口接種の場合は肝臓や腸間膜リンパ節(MLN)における菌の増殖を colony counting method を用いて調べた。次にどの M $\phi$  成分が感染感受性に関与しているか調べるために健常人の単核球から CD3<sup>+</sup>細胞を negative selection し、マウスに移植した。同様の処理を CD19<sup>+</sup>細胞、CD56<sup>+</sup>細胞、CD14<sup>+</sup>細胞で行い、それぞれマウスに移植し、*K. pneumoniae* を接種し、肺における菌の増殖および生存率の違いを調べた。上記の実験結果より CD14<sup>+</sup>細胞(M $\phi$ )に注目し、アルコール過剰摂取患者と健常人の M $\phi$  の性質の違いを調べるため、末梢血 M $\phi$  を培養し、その培養上清中の IL-10 量を ELISA にて、同細胞の CD163、CCL17、CCL1、CXCL13 の発現を flow cytometry で測定し、更に *K. pneumoniae* と共培養してその殺菌能を検討した。更にアルコール過剰摂取患者の由来の M $\phi$  ( $5 \times 10^5$ /mL) を CCL1 antisense ODN ( $2 \mu$ g/mL) で 48 時間処理し、産生される IL-10 を ELISA で測定した。更に heat-killed *K. pneumoniae* (corresponding  $10^5$  cell/mL) で刺激した M $\phi$  が産生する IL-12 の産生を ELISA で測定すると共に *K. pneumoniae* と共培養し、その殺

菌能を検討した。また、健常人及びアルコール過剰摂取患者由来単核球  $1 \times 10^6$  個をヒト化キメラマウスに経静脈的に移植し、CCL1 antisense ODN( $10 \mu\text{g}/\text{mouse}$ , twice a day for 5day)を皮下注射後、*K. pneumoniae*( $10^2$  CFU/mouse)を経気道的に、*E. faecalis*( $10^6$  CFU/mouse)を経口的にそれぞれ接種し、臓器における菌の増殖を検討した。

## 《結 果》

$1 \times 10^6$  個の健常人の単核球を移植し、 $10^2$  CFU/mouse の *K. pneumoniae* を経気道的に接種したヒト化キメラマウスは 7 日間生存した。それ以下の数の単核球の移植や *K. pneumoniae* の接種菌量がそれ以上の条件ではヒト化キメラマウスは全て死亡した。同様に  $1 \times 10^6$  個の健常人の単核球を移植し、 $10^6$  CFU/mouse の *E. faecalis* を経口的に感染させたヒト化キメラマウスは 7 日間生存し、接種菌量がそれ以上の条件ではヒト化キメラマウスはすべて死亡した。以上の結果によって定めた条件下でアルコール摂取過剰患者由来単核球を移植したヒト化キメラマウスに *K. pneumoniae* を経気道的に接種したところ、肺、脾臓及び腎臓において菌が増殖していたが、健常人由来単核球を移植したヒト化キメラマウスではどの臓器にも菌の増殖を認めなかった。また同様に *E. faecalis* を経口的に接種したところ、アルコール過剰摂取患者由来単核球を移植したヒト化キメラマウスの肝臓及び MLN において菌が増殖していたが、健常人由来単核球を移植したヒト化キメラマウスではどの臓器にも菌の増殖を認めなかった。健常人の単核球から CD3<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup> の細胞をそれぞれ取り除いてマウスに移植した後に、*K. pneumoniae* を接種したところ、CD14<sup>+</sup>細胞を取り除いた血球を移植したヒト化キメラマウスの肺において菌の増殖を認め、生存率は低下したが、CD3<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>の細胞をそれぞれ取り除いた血球を移植した各ヒト化キメラマウスはいずれも肺において菌の増殖を認めなかった。このことからヒト化キメラマウスの易感染性に大きく関与する免疫担当細胞は CD14<sup>+</sup>細胞すなわち M $\phi$ と考えられた。健常人とアルコール過剰摂取患者血液から M $\phi$ を分離し、その subtype を調べたところ、アルコール過剰摂取患者由来の M $\phi$ は IL-10 を産生していた。また、アルコール過剰摂取患者由来の M $\phi$ は CCL17<sup>+</sup>CCL1<sup>+</sup>CXCL13<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>細胞優位であり、*K. pneumoniae* に対

する殺菌能は認めなかった。一方で健常人由来のMφはCCL17-CCL1-CXCL13-CD163細胞優位であり、*K. pneumoniae*に対する殺菌能を認めた。以上よりアルコール過剰摂取患者由来のMφは、IL10<sup>+</sup>CCL17-CCL1<sup>+</sup>CXCL13-CD163<sup>+</sup>細胞(M2b Mφ)優位と考えられた。アルコール過剰摂取患者由来MφはIL-10の産生を認めていたが、CCL1 antisense ODNを接種することでIL-10の産生が抑制された。更に同細胞をCCL1 antisense ODN接種後に、heat-killed *K. pneumoniae*で刺激を行ったところ、IL-12の産生を認め、健常人由来Mφと同様に*K. pneumoniae*に対する殺菌能を発揮した。更にアルコール過剰摂取患者由来単核球を移植し、CCL1 antisense ODNを接種したヒト化キメラマウスに、*K. pneumoniae*または*E. faecalis*を接種しても、それぞれ肺またはMLNにおける菌の増殖は認められなかった。

#### 《考 察》

健常人単核球を移植したヒト化キメラマウスでは今回用いた *K. pneumoniae* と *E. faecalis*に対する感染抵抗性を示したが、アルコール摂取過剰患者由来単核球を移植したヒト化キメラマウスは感染感受性を示した。今回の感染モデルの細菌感染に対する自然免疫において、Mφが重要な役割を担っていることが明らかとなった。また易感染性であるアルコール過剰摂取患者の末梢血Mφは殺菌能の低いM2b Mφ優位であった。このM2b Mφは、組織障害により生じるアルコール性ヒアリンが免疫複合体形成を安定的に促進することにより、誘導されると考えられている。誘導されたM2b Mφは、autocrine-CCL1によって維持し、M1 Mφの誘導を抑制しているとされており、今回、CCL1 antisense ODN接種によって、IL12の産生が亢進したことから、移植した単核球中の静止期のMφからM1 Mφが優位な状態が誘導され、殺菌能を示したと考えられる。本研究はヒト化キメラマウスにおけるものであるが、アルコール過剰摂取患者におけるCCL1 antisense ODN投与による日和見細菌感染症の新たな予防法あるいは治療法を開発する端緒となるものと考えられる。

## 論文審査結果の要旨

アルコール過剰摂取患者は感染抵抗性が低下し、上気道や腸内の常在菌による感染性腸炎や誤嚥性肺炎などの日和見感染症を起こし、しばしば致命的となる。このような日和見感染症を含め、感染症に対しては化学療法を行うが、耐性菌が出現し、治療に難渋するため、抗菌薬を使用しない新たな治療法の開発が望まれている。

申請者らは、アルコール過剰摂取患者の末梢血単球 (M $\phi$ ) の亜型と殺菌能を検討するとともに、免疫不全マウス (NOD-SCID IL-2R $\gamma$  null) にアルコール過剰摂取患者の末梢血単核球を移植したヒト化キメラマウス (アルコール過剰摂取キメラ) を作製し、健常人の末梢血単核球を移植したヒト化キメラマウス (健常キメラ) を対照として、*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) または *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) の感染実験を行った。それぞれの実験系における CCL1 antisense oligodeoxynucleotide (ODN) の影響を検討した。

その結果、健常人の末梢血 M $\phi$  は、CCL17<sup>+</sup>CCL1<sup>+</sup>CXCL13<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>細胞であり、殺菌能を示したのに対して、アルコール過剰摂取患者の末梢血 M $\phi$  は、IL-10 を産生する CCL17<sup>+</sup>CCL1<sup>+</sup>CXCL13<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>細胞であり、殺菌能を示さない M2b M $\phi$  が優位であることを明らかにした。また、アルコール過剰摂取キメラを用いた感染実験では臓器内で細菌が増殖し、致死的事であること及び CD14<sup>+</sup>を除いた健常キメラでアルコール過剰摂取キメラと同様の現象が認められることを示した。更に、ODN 処理によってアルコール過剰摂取患者の末梢血 M $\phi$  の IL10 産生が抑制され IL12 産生が亢進し、その M $\phi$  が殺菌能を獲得すること及び ODN 処理したアルコール過剰摂取ヒト化キメラの臓器内では細菌の増殖が抑制されることを明らかにしている。

これらの結果より、申請者は、健常人の日和見感染抵抗性が M1 M $\phi$  に依存しており、アルコール過剰摂取患者では、M2b M $\phi$  が優位になり M1 M $\phi$  を抑制することによって易感染性としている。また、ODN 処理は M2b M $\phi$  を抑制し、M1 M $\phi$  優位と考えられる状態を誘導することによって、アルコール過剰摂取患者の末梢血 M $\phi$  やアルコール過剰摂取キメラの感染抵抗性を獲得させるとしている。

本研究はアルコール過剰摂取による日和見感染症の発生メカニズムを自然免疫の観点から明らかにし、アンチセンス核酸を用いて自然免疫を活性化し、日和見感染症を予防あるいは治療する方法を開発する端緒を提供するものである。

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)

Journal of Immunology 195(11) : 5169-5177, 2015