

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19307

研究課題名(和文)腸上皮インテグリンによる菌由来物質認識機構を介した新規宿主 細菌相互作用の解明

研究課題名(英文) Investigation of a novel host-microbial interaction focusing on the recognition of bacterial derived molecules by intestinal epithelial integrin.

研究代表者

田中 一之 (TANAKA, Kazuyuki)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：30624176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：麦芽乳酸菌由来のポリリン酸の腸管上皮に対する作用機序解明を目的に検討を行った。蛍光免疫染色法にてポリリン酸がインテグリン 1 を介して腸上皮細胞へ取り込まれることが確認された。その取り込みは、インテグリン 1 および脂質ラフトの主な構成要素であるカベオリン-1 の発現抑制により有意に減少した。また、ポリリン酸の細胞保護タンパク誘導および腸管バリア機能増強作用はカベオリン-1 の発現抑制により有意に減弱した。以上より、ポリリン酸はカベオリン-1 依存性エンドサイトーシスを介して作用することが示された。high-throughput sequencing解析ではTNFAIP3を候補分子として同定した。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated the mechanism which Lactobacillus brevis-derived poly P exhibited the beneficial function. An immunostaining indicated that poly P was captured to plasma membrane via integrin 1 in caco2/bbe cells. The uptake of poly P was reduced by the inhibition of integrin 1 as well as caveolin-1, which a major component of lipid rafts. The function of poly P, including the induction of Hsp27 and enhancement of the intestinal barrier function, was suppressed by the inhibition of caveolin-1, illustrating that the function of poly P was mediated by the endocytic pathway. High-throughput sequencing revealed poly P induced tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3), which contributes to the cytoprotection including upregulation of intestinal barrier function.

研究分野：消化器内科

キーワード：プロバイオティクス ポリリン酸 エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

腸管内には 1000 種を超える腸内細菌が存在し、宿主との相互作用により腸管の恒常性を保つと同時に、多くの消化器疾患の病態に強く関連することが示唆されている。

腸管上皮における腸内細菌の認識機構として、Toll like receptors (TLRs) や Nods などのパターン認識受容体 (pattern recognition receptors; PRRs) が発見されており、主に病原菌の菌体成分などを認識し腸管炎症を惹起する。一方、宿主に有益な菌 (プロバイオティクス) に対する認識機構については、その一部が病原菌と同様に PRRs を介する経路であることが知られているが、残りの大部分の菌では認識機構が不明である。

我々の研究室では、乳酸菌から分泌される腸管保護物質ポリリン酸を同定し、これが腸管炎症や線維化を改善することを突きとめた。この菌由来ポリリン酸は腸管上皮の integrin 1 に結合した後にエンドサイトーシスを介してヒト腸管上皮細胞に取り込まれ、作用を発揮していることを見出し、PRRs とは異なる経路で腸管上皮細胞に認識され作用を発揮することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、ポリリン酸が腸管上皮 integrin 1 に認識された後の腸管上皮との相互作用について明らかにする。

菌由来物質が腸管上皮細胞へエンドサイトーシスにより取り込まれる際の詳細なメカニズムやその後の細胞内動態および生体に対する生理作用を明らかにすることにより、新規の宿主-細菌間の相互作用の本態を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ポリリン酸の合成

混合液 (50mM Tris - HCl (pH7.4), 40mM ammonium sulfate, 4mM MgCl₂, 40mM creatine phosphate, 20ng/ml creatine kinase, 1mM ATP (pH7.2), 1U の polyphosphate kinase (PPK) を反応させポリリン酸を合成した。

(2) 細胞株

Caco2/bbe 細胞 (ヒト腸管上皮由来細胞株) を用いた

(3) shRNA の導入

レンチウイルス発現ベクターを用いて Caco2/bbe 細胞に integrin 1, caveolin-1, tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3) の shRNA を導入した。ノックダウン効率は Real-time PCR および Western blotting にて確認した。

(4) マンニトール漏出試験

トランスウエルに Caco2/bbe 細胞を培養しポリリン酸および PBS を投与する。1, 2, 3 時間後に ³H 標識マンニトールを上部 well に投与し、下 well へ漏出したマンニトールを測定することにより腸管バリア機能を評

価した。

(5) ³²P ポリリン酸の動態試験

³²P 標識 ATP を用いて上記 1. と同様の方法で ³²P 標識ポリリン酸を作製した Caco2/bbe 細胞に ³²P 標識ポリリン酸を投与し、細胞内外のポリリン酸の分布を評価した。

(6) Western blotting

解析対象の細胞から蛋白を精製し SDS-PAGE にて電気泳動を行った。ニトロセルロースメンブレンへ転写し下記に示す一次抗体を用いて特異的な蛋白を検出し、画像解析ソフト image J で発現量を評価した。用いた一次抗体は、リン酸化 p38 MAPK, HSP27, TNFAIP3, thymosin beta 4 (TMS 4) に対する単クローン抗体である。

(7) Real-time PCR

解析対象の細胞から RNA を分離し、逆転写にて cDNA を作製した。これをテンプレートとして integrin 1, caveolin-1, TNFAIP3, TMS 4, dual specificity phosphatase 2 (DUSP2) の cDNA 配列に特異的な配列を持つプライマーを用いて PCR を行った。

(8) High-throughput sequencing

Caco2/bbe 細胞にポリリン酸および PBS を投与し 24 時間後に RNA を分離した。これをテンプレートとして発現量が変化する mRNA を網羅的に解析した。

(9) 蛍光免疫染色

Caco2/bbe 細胞にポリリン酸を加え、ポリリン酸結合蛋白およびこの蛋白の単クローン抗体を用いて腸管上皮内外のポリリン酸の動態を評価した。また、sh TNFAIP3 Caco2/bbe 細胞にポリリン酸を加えタイトジャンクション関連蛋白に対するタンクローン抗体を用いて蛋白発現を評価した。

(10) 統計処理

有意差検定には Student's t-test を用い、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した。

4. 研究成果

(1) ポリリン酸の細胞内への取り込み

³²P 標識ポリリン酸は 1 時間後に細胞内へ取り込まれ、その後時間経過とともに細胞外へ移行し、48 時間にはほとんどが細胞外へと排出された (図 1)。蛍光免疫染色でも同様の細胞内外の移動を認めたと、integrin 1 発現抑制によりポリリン酸の細胞への集積は有意に低下した。integrin 1 は上皮細胞膜上の脂質ラフトを形成する caveolin-1 との相互作用があることから、ポリリン酸が caveolin-1 依存性のエンドサイトーシスにより細胞へ取り込まれると仮定し、検討を行った。免疫沈降 western blotting を行った結果、ポリリン酸が Caco2/bbe 細胞株において caveolin-1 との複合体を形成することが明らかになった。この複合体は integrin 1 発現抑制により形成が有意に低下した。³²P 標識ポリリン酸の細胞内取り込みも caveolin-1 発現抑制によって有意に減少した (図 2)。

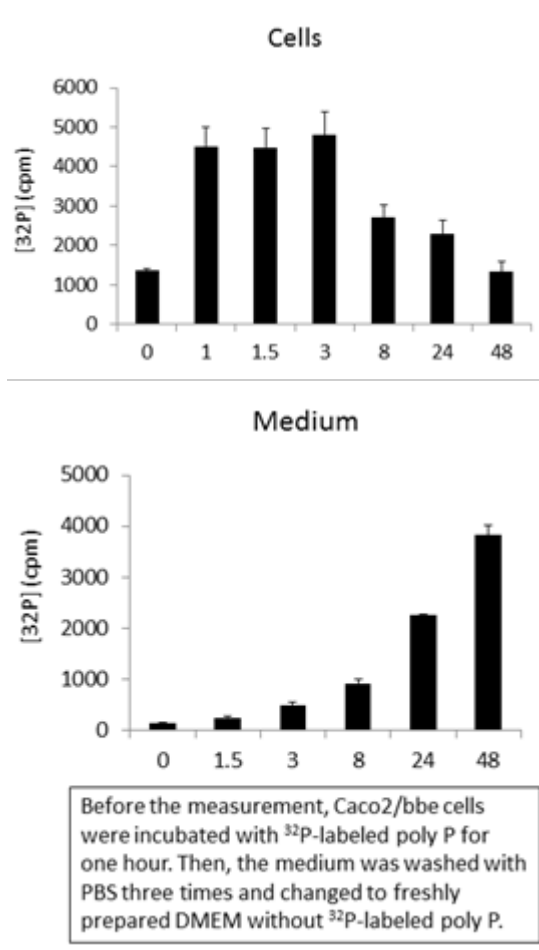


図 1. ³²P 標識ポリリン酸の細胞内への取り込み

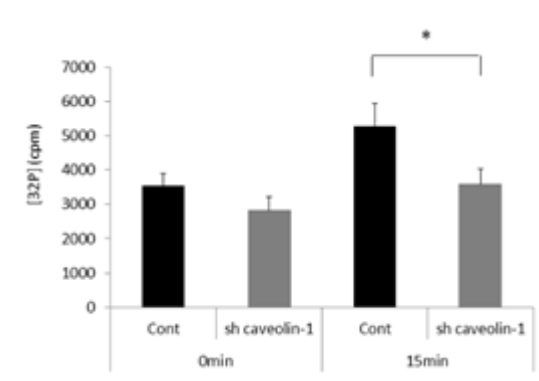


図 2. caveolin-1 発現抑制による ³²P 標識ポリリン酸の細胞内取り込みの減少
* : p<0.05

(2) ポリリン酸の細胞保護作用

Western blotting にて細胞保護蛋白 Hsp27 およびリン酸化 p38 MAPK の発現を検討した結果、ポリリン酸投与に両者とも有意に発現が誘導された。この作用は caveolin-1 発現抑制により有意に抑制された(図 3)。マンニトール漏出試験で腸管バリア機能を検討した結果、ポリリン酸投与により腸管バリア機能の増強が認められたが、その作用は caveolin-1 発現抑制により有意に抑制された(図 4)。

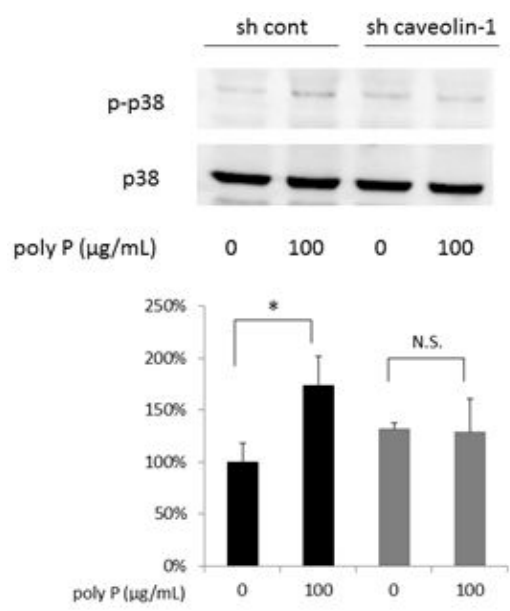
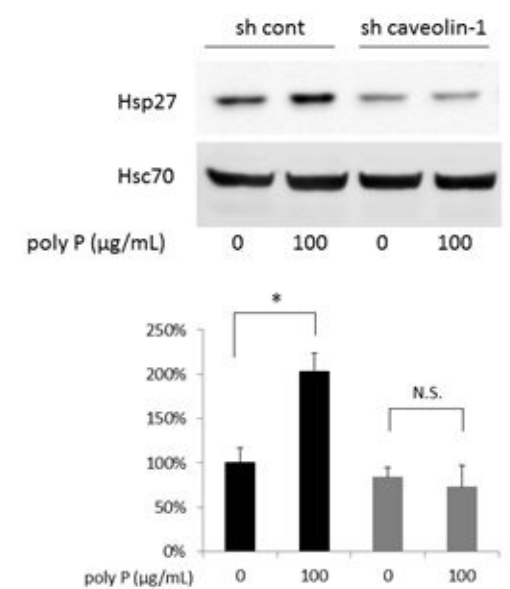


図 3. caveolin-1 発現抑制によるポリリン酸の細胞保護作用の減弱
* : p<0.05

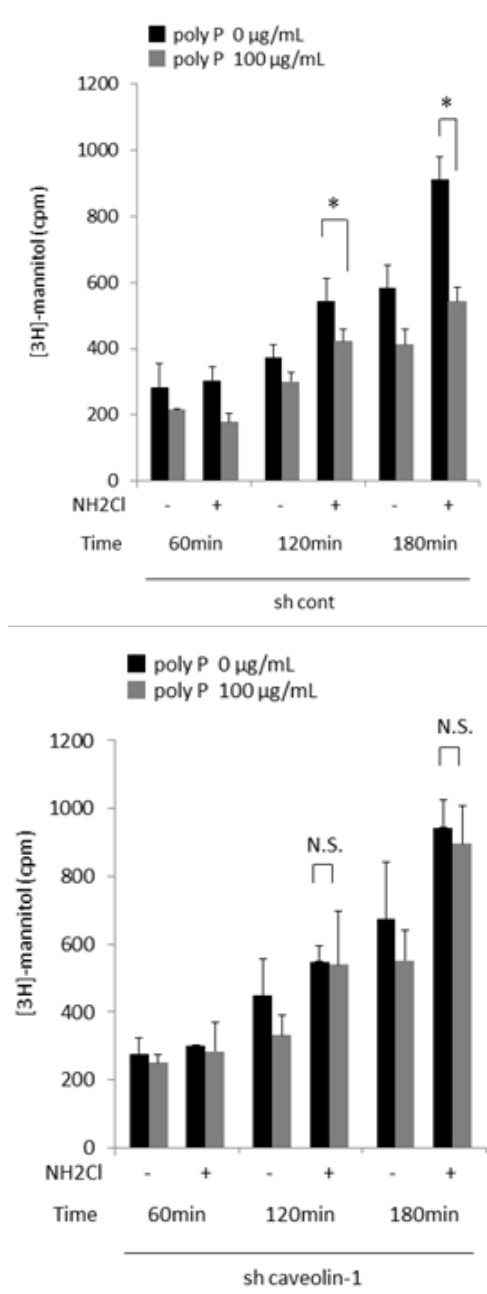


図 4. caveolin-1 発現抑制によるポリリン酸の腸管バリア機能増強作用の減弱
* : p<0.05

(3) ポリリン酸投与による TNFAIP3 の発現誘導

high-throughput sequencing 解析にてポリリン酸投与により有意に発現量が変化する遺伝子を抽出し、バリア機能増強作用に関連する TNFAIP3, TMS 4, DUSP2 を候補分子として同定した。そのうち、細胞株へのポリリン酸投与により mRNA, タンパク発現量ともに有意に発現が変化した分子は TNFAIP3 のみであった (図 5)。また、免疫蛍光染色にてタイトジャンクション関連蛋白の発現を検討した結果、ポリリン酸投与により claudin および ZO-1 の発現が誘導されたが、その作用は TNFAIP3 発現抑制により減弱した (図 6)。

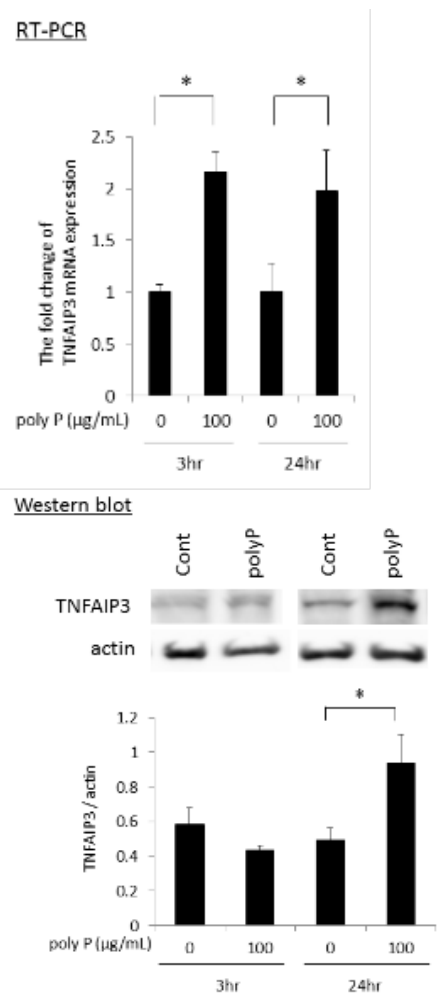


図 5. ポリリン酸投与による TNFAIP3 の発現誘導 * : p<0.05

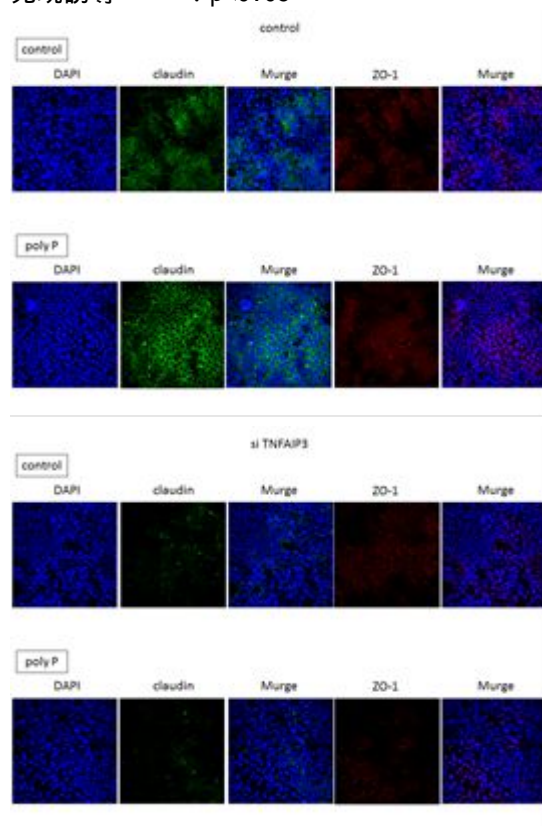


図 6. TNFAIP3 発現抑制によるポリリン酸の tight junction 関連蛋白発現誘導の抑制

本研究によって、細菌由来のポリリン酸が integrin-caveolin 依存性のエンドサイトーシスにより腸管上皮細胞に取り込まれ、p38 MAPK と Hsp27 の活性化により細胞保護作用を発揮するという新たな宿主-細菌相互作用メカニズムが明らかになった。以前我々はバシラス菌由来の分子が細胞膜トランスポーターによる取り込みを介して認識されることも明らかにしており、プロバイオティクスの認識には PRRs を介さない経路が存在すると思われる。

また、high-throughput sequencing 解析によりポリリン酸投与によって発現量が変化する主な分子が TNFAIP3 であることを突き止めた。TNFAIP3 は TNF /NF- κ B シグナルを強力に抑制すること、腸管バリア機能を増強することが知られている。また、TNFAIP3 は p38MAPK の活性化を介して発現が増強されることも報告されている。

以上から、ポリリン酸はインテグリン-1 との結合を起点として、エンドサイトーシスによって取り込まれる過程で、p38 MAPK を活性化し、Hsp27 や TNFAIP3 の発現を誘導することで腸バリア機能を増強するものと考えられた。

この新規の宿主-細菌間の相互作用がさらに解明されることで、PRRs に限定されない種を超えた宿主-細菌間クロストーク解明に向けた新分野の創設が期待される。さらには、細菌由来の物質の認識や取り込み機構に着目し、消化器疾患の新たな治療標的の開発が期待される。

<引用文献>

Kazuyuki Tanaka, Mikihiro Fujiya, Hiroaki Konishi, et al. Probiotic-derived polyphosphate improves the intestinal barrier function through the caveolin-dependent endocytic pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 467, Issue 3, Pages 541-548

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kazuyuki Tanaka, Mikihiro Fujiya, Hiroaki Konishi, et al. Probiotic-derived polyphosphate improves the intestinal barrier function through the caveolin-dependent endocytic pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 467, Issue 3, Pages 541-548, DOI 10.1016/j.bbrc.2015.09.159.

〔学会発表〕(計 1 件)

田中一之, 上野伸展, 藤谷幹浩 腸上皮エンドサイトーシスによる麦芽乳酸菌由来ポリリン酸の取り込みを介した腸管バリア機能増強作用の解析, 第 53 回日本消化器免疫学会総会, 2016 年 7 月 15 日, 大阪府大阪市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 一之 (TANAKA, Kazuyuki)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号: 30624176