

平成22年 6月11日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700607

研究課題名（和文） 腸管マクロファージのCD14発現制御機構に関する研究

研究課題名（英文） Analysis of CD14 expression for the hyporesponsiveness against LPS in intestinal macrophage

研究代表者

中田 和江（NAKATA KAZUE）

岡山県立大学・保健福祉学部・助教

研究者番号：60411740

研究成果の概要（和文）：

腸管マクロファージのLPS低応答メカニズムについて、CD14（LPS受容体）の発現制御機構に着目し解析を行った。本研究の結果、腸管マクロファージのCD14はコントロール細胞よりも高分子であること、また糖鎖修飾を受けていないことが示唆された。今回明らかになった結果は、組織マクロファージの異物に対する過剰応答を抑制する制御機構として、CD14の翻訳後修飾における新規な制御機構の存在を示唆していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The investigation was focused on the regulatory system of CD14 expression, which is a LPS receptor, for the analysis of LPS hyporesponsiveness of intestinal macrophages. These results suggested that CD14 in intestinal macrophages showed high molecular weight than control peritoneal macrophage and RAW264.7, and without sugar modification. Thus, it is suggested that there exists a new regulatory mechanism of posttranslational modification of CD14 for suppress excess response against foreign substances in tissue macrophages.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食と栄養、粘膜免疫機構、腸管マクロファージ、LPS、CD14

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内外の研究動向および位置づけ

食物の第3次機能が注目され、消化管経由の免疫活性化制御機構解明の重要性が指摘されている。そのため、今後腸管免疫の機能解析が展開していくと考えられる。さらに近

年、腸管の恒常性維持にはTLRを介するシグナルが本質的な意義を持つことが明らかとなった（Abreu, MT., et al., J Immunol. 174, 4453-60 (2005)）。以上は腸管免疫の制御を通じた生体調節を生活習慣病の予防や治療に活用することが今まで以上に重要となる

と共に、腸管に存在する細菌群の生理的意義の見直しが必要であることを示唆している。一方、腸管上皮あるいは粘膜固有層には多くの免疫担当細胞が存在することが知られている。この中で比較的解析が行われているのは、上皮細胞、パイエル板ドームを形成するリンパ球系細胞、B1細胞、樹状細胞、IELなど特異免疫に関連した細胞群である。しかしながら、近年生体恒常性の維持における重要性が認識されている自然免疫、特にその中心的細胞であるマクロファージについては未だに十分な研究が行われてはいない。

腸管マクロファージは、粘膜固有層に存在し異物応答の最前線に位置する免疫担当細胞である。そのため感染防御を始めとする生体防御、外部環境情報の受発信、腸管恒常性維持などに重要な機能をもつと考えられる。腸管マクロファージの機能解析は、主にアメリカのSmithらのグループがヒトの細胞を用いて解析を行っている。しかしながら、世界的に見て腸管マクロファージを用いて異物識別のメカニズム解析に取り組んでいるのは申請者らのみである。

(2) これまでの経緯

マクロファージは、生体内のあらゆる組織に存在している組織マクロファージと炎症によって誘導される単球由来の滲出マクロファージに大別される。組織マクロファージは存在する組織環境により、食食作用や抗原提示、サイトカインなどの分泌といった機能が異なる。これまで報告されている腸管マクロファージの特徴を以下にまとめる (Schenk, M., et al., *Semin Immunol. Rev.* 19, 84-93 (2007))。

- ①他の組織マクロファージと同等の食食能を有する (アポトーシスした腸管上皮細胞も食食する)。
- ②CD14、CD89、TLR4/MD-2 等の異物識別に関わるレセプターの発現がほとんど認められない。
- ③LPS に対する応答性 (TNF、IL-6 産生など) が認められない。
- ④炎症性腸疾患患者の腸管では、CD14 を発現したマクロファージが存在し、炎症性サイトカインの産生が認められる。

上記以外の腸管マクロファージの生理的機能はほとんど不明である。しかしながら、研究代表者らは、これまでに腸管マクロファージの LPS 等マクロファージ活性化物質に対する応答解析の研究から以下の事実を発見した。

- ①腸管マクロファージの CD14 mRNA 発現量は、肺泡マクロファージや腹腔マクロファージと同程度であり転写レベルでの特異性は認められない。
- ②腸管マクロファージの CD14 は細胞内にタンパク質として発現している。

(Nakata, K., et al., *Clin. Exp. Immunol.* 143, 484-493 (2006))。

- ③腸管マクロファージは IgA で刺激すると、LPS 応答性 (TNF、NO 産生) が回復する (Nakata, K., et al., *Int. J. Colorectal Dis.* 21, 339-347 (2006))。

以上のことから、腸管マクロファージの LPS 低応答性は、これまで知られていない CD14 の発現制御メカニズムにより担われていることが強く示唆された。

2. 研究の目的

これまでに見いだした事実に基づき腸管マクロファージの LPS 低応答性を、CD14 の細胞内局在と細胞内輸送の点から究明し、腸管マクロファージが示す特異的な異物識別制御機構を解明することを目的とする。本研究では特に、腸管マクロファージの CD14 を細胞内に制限している原因としてタンパク質の構造に着目した。腸管マクロファージの CD14 の構造が腹腔マクロファージや培養細胞と違うかどうかウェスタンブロッティング法により解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 腸管マクロファージの単離

マウスより大腸を回収し、DTT・EDTA処理により粘液や上皮細胞を除去する。その後、酵素 (ディスパーゼ、コラゲナーゼ、DNase) 処理し、不要な組織を除去する。パーコールでの密度勾配遠心法により単核細胞分画を得る。得られた細胞群をさらにエルトリエーターを用いたカウンターフローによる密度勾配法より、比重差によって細胞を分ける。回収した細胞は、一部をマクロファージ特異的抗体 (F4/80またはCD68) で免疫染色し、フローサイトメトリー法により抗原の発現量から得られた細胞の精製度を解析した。

(2) 腸管マクロファージのCD14タンパク質の解析

(1) で得られた細胞またはコントロールとして用いた腹腔マクロファージや単球由来細胞株 (RAW264.7) をLysis bufferで溶解し、タンパク質を抽出した。SDS-PAGEを行った後、ウェスタンブロッティング法によりPVDFに吸着させたタンパク質を抗CD14抗体で検出し、分子量について解析を行った。

(3) 脱糖鎖処理によるCD14分子量の变化解析
各細胞のタンパク質抽出液をβ-メルカプトエタノール入りSDS溶液で変性処理を行った後、N-グリカナーゼ (PNGase F) またはシアリダーゼAまたはO-グリカナーゼを用いて酵素的に脱糖鎖処理を行った。その後、(2) 同様にSDS-PAGEを行い、ウェスタンブロッティング法で解析を行った。

4. 研究成果

(1) 腸管マクロファージの単離

本単離方法により、腸管マクロファージとしてマウス1匹あたり $0.60 \pm 0.64 \times 10^6$ cells の細胞を得ることが出来た。得られた細胞の精製度については、エルトリエーターにかける前の細胞で F4/80 : 44.1 ± 20.0%、CD68 : 33.5 ± 8.0%、エルトリエーター後回収した細胞で F4/80 : 55.1 ± 19.1%、CD68 : 46.0 ± 2.8% であった。エルトリエーターを用いて、腸管マクロファージの精製度を 86% 以上に出るとの報告があることから (Smith, PD., et al, J. Immun. Meth. 202 1-11(1997)) 精製度については、今後も検討の余地があるといえた。

(2) 腸管マクロファージの CD14 タンパク質の解析

CD14 は約 55kD のタンパク質であるが、cDNA 配列からは約 40kD 程のタンパク質が予測されている (Simmons, DL., et al. Blood. 73, 284-9 (1989))。CD14 には、マウスでは 5 つ (ヒトでは 4 つ) の N 型糖鎖付加部位があることから、腸管マクロファージでは付加される糖鎖等の違いにより発現が抑制されている可能性が考えられた。また、CD14 と共発現している TLR4/MD2 の発現に、シャペロンタンパク質の gp96 が関与しており、腸管上皮細胞ではこのシャペロンタンパク質の欠損が TLR4/MD2 発現の抑制に関与しているという報告がある (Harding, CV., et al. Immunity. 26, 141-3 (2007))。

そこで、腸管マクロファージの CD14 タンパク質の輸送を抑制している機構について、CD14 の構造によるものか、輸送に関わるシャペロンタンパク質等の欠損によるものか検討するため、まず CD14 タンパク質の分子量を他の組織マクロファージと比較し、差異がみられるか検討を行った。

ウェスタンブロットング法による CD14 の分子量比較から、腸管マクロファージでは約 60kD と約 55kD の 2 本のバンドが確認された。このうち、約 60kD のバンドが濃いことに対し、約 55kD のバンドは非常に薄かった。一方、コントロールの腹腔マクロファージでは約 55kD の濃いバンドが 1 本確認され、RAW264.7 では、腸管マクロファージと同様の位置に 2 本のはっきりとしたバンドが確認された (図 1)。この結果、腸管マクロファージには、腹腔マクロファージとは異なる分子量の CD14 が存在することが明らかとなり、この差が細胞膜上への発現を抑制している原因となっていることが考えられた。また、腹腔マクロファージと RAW264.7 は、CD14 が細胞膜上に発現していることから、約

55kD が膜発現型、約 60kD が細胞内型ではないかと推察された。

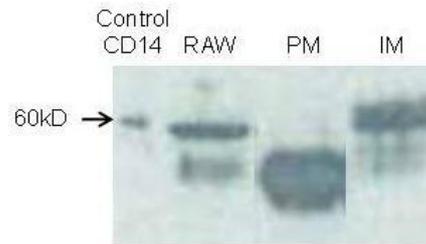


図 1 CD14 分子量の比較

Control CD14: マウス由来 CD14 (Western blotting control 用、60kD), Santa Cruz Biotechnology, Inc.、RAW: RAW264.7、PM: 腹腔マクロファージ、IM: 腸管マクロファージ

(3) 脱糖鎖処理による CD14 分子量の変化

(2) で明らかとなった分子量の差は、約 5kD と小さい。一般的にタンパク質の品質管理では、小胞体内においてミスフォールドタンパク質は、シャペロンタンパク質と結合して他のタンパク質と不可逆的な凝集が起こらないよう保持される。しかしながら、品質管理に働くシャペロンタンパク質として知られるカルネキシンやカルレティキュリンはそれぞれ分子量が約 88-90kD、約 55-60kD であり、これらに CD14 が結合していた場合、分子量の差はもっと大きくなると考えられた。

一方、N 型糖鎖修飾も主に小胞体内で行われる。小胞体内腔で作製されたコア・グリコシレーションと呼ばれる糖鎖がタンパク質のアスパラギン残基 (N) に付加された後、グリコシダーゼや小胞体マンノシダーゼ等によるトリミングを介してフォールディングが進行する (Jakob CA. JCB, 142, 1223-33 (1998))。このことから、腸管マクロファージの分子量の差は、付加されているコア・グリコシレーションのトリミングの段階に制御がかかっており、コア・グリコシレーションが大きいのではないかと考えた。そこで、付加されているコア・グリコシレーション部分を除去することで、腸管マクロファージの CD14 が他のマクロファージと同じ分子量になるか確認を行った。本研究では、N 型糖鎖を完全に除去することが可能といわれている N-グリカナーゼ (PNGase F) による酵素法を用い (Tarentino, AO., et al. Methods in Enzymol, 230, 44-57(1994))、CD14 タンパク質の分子量の変化を観察した。この結果、RAW264.7 では、PNGase F 処理によって、約 55kD のバンドが薄くなり、約 40kD の位置に新たなバンドが確認された。しかしながら、腸管マクロファージの CD14 には全く変化が

見られなかった (図 2)。なお、腹腔マクロファージも RAW264.7 と同様に PNGase F 処理により分子量の変化が観察された。一般的に小胞体では N 型糖鎖の修飾が行われ、O 型糖鎖はゴルジ体において修飾される。確認のため、O-グリカナーゼとシアリダーゼ A を用いて、一部の O 型糖鎖の除去を試みが、腹腔マクロファージ、RAW264.7、腸管マクロファージ共に変化は見られなかった。

したがって、腸管マクロファージの CD14 タンパク質は、糖鎖修飾を受けていない可能性があり、糖鎖修飾を受ける以前の段階に抑制機構が存在することが示唆された。

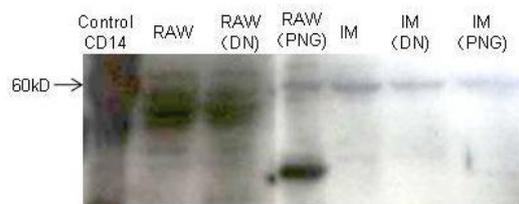


図 2 PNG 処理による CD14 分子量の変化

Control CD14: マウス由来 CD14 (Western blotting control 用、60kD), Santa Cruz Biotechnology, Inc.、RAW: RAW264.7、RAW (D-N): 変性処理のみ、RAW (PNG): PNGase F 処理、IM: 腸管マクロファージ、IM (D-N): 変性処理のみ、IM (PNG): PNGase F 処理

本研究の結果より、腸管マクロファージの CD14 は他の組織マクロファージと異なり、高分子であることが明らかとなった。この分子量の差を明らかとするため、酵素法を用いて N 型糖鎖と一部の O 型糖鎖除去処理を行ったが、腸管マクロファージの CD14 の分子量には全く変化が見られなかった。このことから、腸管マクロファージの CD14 は糖鎖修飾を受けていないことが示唆され、抑制機構は糖鎖が付加される以前の段階で働いている可能性が考えられた。CD14 については、付加される糖鎖の機能を調べた報告はあるが (Jianmin M. J Biol Chem. 283, 3376-84 (2008))、翻訳後どこでどのような修飾を受けるのかなど、発現に関する報告はまだない。また、CD14 は GPI アンカー型タンパク質であるが、GPI アンカー型タンパク質の小胞体における修飾の過程についても、付加される糖鎖のプロセスについてはいくつか報告がある。しかし、付加される前のタンパク質について、どのような修飾を受けているのか詳細は十分に明らかにされていない。したがって、今回明らかになった事実は、腸管マクロファージ特異的な CD14 発現抑制機構の解明のみならず、CD14 や GPI アンカー型タンパク質の修飾に関わる新たな知見を提示することにも繋がると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- 1) N. Yoshioka, Y. Taniguchi, A. Yoshida, K. Nakata, T. Nishizawa, H. Inagawa, C. Kohchi, G. Soma.: Intercellular localization of CD14 protein in intestinal macrophages. *Anrincancer Research* **29**, 865-9. (2009) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- 1) K. Nakata, H. Inagawa, C. Kohchi, Y. Taniguchi, N. Yoshioka, G. Soma, Unique recognition mechanism and cellular response to LPS by intestinal macrophages. The 5th Joint Conference on Nutrition of Okayama Prefectural University, Woosong University and Sichuan University, 2009.9.14, Sichuan University.
- 2) 吉岡典子、谷口芳枝、吉田彩、中田和江、西澤孝志、稲川裕之、河内千恵、平島光臣、柚源一郎、腸管マクロファージの LPS 不応答に関するメカニズム解析、第 13 回バイオ治療法研究会学術集会、2009 年 12 月 5 日 (香川)
- 3) 中田和江、山本耕一郎、吉岡典子、柚源一郎、Analysis of CD14 expression for the hyporesponsiveness against LSP in intestinal macrophage、第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 29 日 (神奈川)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 和江 (NAKATA KAZUE)
岡山県立大学・保健福祉学部・助教
研究者番号：60411740

(2) 研究協力者

河内 千恵 (CHIE KOHCHI)
香川大学・医学部・総合免疫システム学講座・客員准教授
研究者番号：00274142
柚 源一郎 (GEN-ICHIRO SOMA)
徳島文理大学・人間生活学部・食物栄養学科・教授 兼 香川大学・医学部・総合免疫システム学講座客員教授
研究者番号：00158990