

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460366

研究課題名(和文) 消化管粘膜上皮細胞特異的なチロシンホスファターゼを介した腸管免疫制御と病態

研究課題名(英文) Regulation of intestinal immunity by a gastrointestinal epithelial-specific protein tyrosine phosphatase and its pathological role.

研究代表者

村田 陽二 (Murata, Yoji)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60400735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、消化管粘膜上皮細胞特異的に発現する受容体型チロシンホスファターゼSAP-1とその基質候補分子p100による腸管免疫制御機構とその病態的意義について解析を進めた。その結果、SAP-1と同様に炎症性腸疾患のモデルマウスであるIL-10ノックアウトマウスでのp100の欠損が大腸炎の増悪化をもたらすことを確認した。さらに、SAP-1の新たな基質候補分子としてp90を同定した。これらのことから、SAP-1はp100やp90のチロシンリン酸化を制御することで、腸上皮細胞による腸管免疫制御に関与する可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated molecular mechanisms, by which SAP-1, a gastrointestinal epithelial-specific protein tyrosine phosphatase, and its putative substrate p100 in intestinal epithelial cells modulate intestinal immunity. The pathological roles of these molecules were also examined. I found that ablation of p100 as well as that of SAP-1 markedly increased the severity of colitis in IL-10-deficient mice. I also found that p90 was another putative substrate for SAP-1 at the microvilli of intestinal epithelial cells. Therefore, SAP-1, through de-phosphorylation of p100 and p90, is likely to contribute to the modulation of intestinal immunity by intestinal epithelial cells.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：チロシンホスファターゼ 腸上皮細胞 腸管免疫 腸炎 がん

1. 研究開始当初の背景

腸炎の病態形成やその維持には、腸管における免疫応答の乱れが寄与するとされているが、これまで腸管免疫制御や腸炎発症の分子メカニズムの解析は、免疫担当細胞の機能やその異常を中心とした研究がなされてきた。一方、最近では外界との物理的なバリアを果たす腸上皮細胞が TGF- β 、TSLP、MIP-2、KC などのサイトカインやケモカイン、あるいは Defensin などの抗菌ペプチドを産生し、免疫担当細胞や腸内細菌叢に直接作用して腸管免疫を制御することが示唆されているが、腸上皮細胞による詳細な腸管免疫制御機構については、十分に明らかではない。

SAP-1 は研究代表者が所属する研究グループにおいて単離同定された受容体型のチロシンホスファターゼ (PTP) であり、細胞外領域に複数のフィブロネクチンタイプ III 様ドメインをもち、細胞内領域に 1 つの PTP ドメインをもつ。これまでに研究代表者は、SAP-1 が大腸や小腸の上皮細胞に特異的に発現し、その微絨毛に局在すること。また、炎症性腸炎モデルマウスとして知られている IL-10 遺伝子破壊 (KO) マウスと SAP-1 KO マウスの二重遺伝子欠損 (DKO) マウスを作製したところ、SAP-1/IL-10 DKO マウスは IL-10 単独の KO マウスに比べ高い大腸炎の発症率と重症度を示すことを見出していた。さらに、SAP-1 KO マウス由来大腸および小腸では野生型マウスに比べチロシンリン酸化が亢進する約 100 kDa の膜蛋白質 (p100) が腸粘膜の上皮細胞の微絨毛に存在することを突き止めていた。また、培養細胞などを用いた解析から、この p100 は SAP-1 によりチロシン脱リン酸化を受け一方で、Src ファミリーチロシンキナーゼによりチロシンリン酸化を受け、大腸炎の重篤化に寄与すると示唆されているケモカイン IL-8 (マウスでは KC、MIP-2 に相当する) の産生を正に制御する可能性を示す実験結果を得ていた。これらのことから、腸上皮細胞による腸管免疫制御の新たな制御機構として SAP-1/p100 シグナルが機能する可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、SAP-1/p100 シグナルを中心に SAP-1 シグナル系の腸管免疫制御における役割とその病態的意義について解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) p100 KO マウスの作製

p100 遺伝子のエクソン 1 およびエクソン 2 を neo カセットに置き換え、ヘテロに p100 遺伝子の一部を欠損した ES 細胞株を複数樹立した。さらに、得られた ES 細胞を胚盤胞の受精卵に移植し、最終的に、p100 遺伝子欠損キメラマウスを得た。その後、野生型

C57BL/6J マウスとのバッククロスを 4 世代行い、得られた p100 KO マウスを実験に使用した。また、p100 KO マウスが作製出来たことは、サザンブロット法および PCR 法によるゲノム DNA における p100 遺伝子の部分的欠損の有無の解析と単離した腸上皮細胞における p100 蛋白質の発現の有無の解析により確認した。

(2) 腸炎モデルマウスの作製と評価

腸管における免疫応答制御の異常は、炎症性腸炎の発症につながることで知られている。抑制性サイトカインである IL-10 の遺伝子破壊マウスは、炎症性腸炎を発症することから、一般的に、炎症性腸疾患のモデルマウスとして広く用いられている。また、IL-10 遺伝子欠損とは異なり、デキストラン硫酸の摂取による化学物質誘導性の大腸炎モデルマウスが知られている。そこで、p100 および SAP-1 と腸管免疫制御の関連性を評価する目的で、IL-10 KO マウスと p100 KO マウスとの交配を行い、野生型マウス、p100 KO マウス、IL-10 KO マウス、p100/IL-10 二重遺伝子欠損 (DKO) マウス、SAP-1 KO マウスとの交配も行い、p100/SAP-1/IL-10 の三重遺伝子欠損マウスの作製を進め、それぞれのマウスの腸炎の発症度および重症度、また、腸管におけるサイトカイン・ケモカインの mRNA の発現量について検討した。なお、腸炎の発症度および重症度は、Disease Activity Index (DAI)、1. 便の堅さ、2. 血便の有無、3. 脱肛の程度) および組織学的解析に基づき点数化することで評価した。また、p100 KO マウスと野生型マウスに対して、1.5%デキストラン硫酸を飲料水中に加え 7 日間摂取させることで、化学物質誘導性の腸炎モデルを作製し、それぞれの腸炎の程度について、主に、体重の減少率、便潜血の有無、便の堅さで評価した。

(3) サイトカイン産生制御の解析

p100、SAP-1 シグナル系がサイトカイン産生の制御に関与するかについて、培養細胞に p100 および SAP-1 と c-Src との過剰発現を行い、培養中の炎症性サイトカイン IL-6 の産生量を ELISA にて定量することで評価した。また、野生型マウス、p100 KO マウス、SAP-1 KO マウスの小腸よりクリプト細胞を単離し、腸オルガノイド培養を行い、腸オルガノイドでの IL-6 (および MIP-2) の mRNA の発現量について、Q-PCR にて評価した。

(4) SAP-1、p100 の発現制御の解析

SAP-1 および p100 が腸内細菌によりその発現制御を受けるかについて評価する目的で、通常の飼育条件下 (SPF) での野生型マウス、抗生剤により腸内細菌を除去した野生型マウスおよび野生型の無菌マウスから腸上皮細胞を単離し、トータル RNA の抽出を行い、得られたトータル RNA を用い、Q-PCR を行うことで SAP-1 および p100 の mRNA の発現量に

について検討した。さらに、通常の飼育条件下 (SPF) での野生型マウス、抗生剤により腸内細菌を除去した野生型マウスの腸管における IFN- γ を含む炎症性サイトカインの mRNA の発現量の検討も同様に行った。また、野生型マウスの小腸よりクリプト細胞を単離し、腸オルガノイド培養を行い、IFN- γ および TNF- α 刺激により腸オルガノイドでの p100 の発現量が変化するかについて、ウェスタンブロット法、および Q-PCR 法により検討した。

(5) p100 および SAP-1 リガンド分子の検索
p100 と SAP-1 が互いにリガンド分子であるかについて評価するため、p100 および SAP-1 の野生型および細胞内領域欠失した変異体を発現する発現ベクターを構築し、培養細胞に導入した後、p100 または SAP-1 の特異抗体を用い両者の免疫沈降を行い、p100 および SAP-1 が共沈するか否かを検討した。

(6) SAP-1 基質候補分子の単離・同定
SAP-1 KO マウス由来腸上皮細胞の微絨毛膜画分を調整し、抗リン酸化チロシン抗体によるチロシンリン酸化蛋白質のアフィニティ精製および質量分析を行うことで、約 90 kDa のチロシンリン酸化蛋白質の単離と同定を試みた。さらに、p90 の特異抗体を用い、野生型および SAP-1 KO マウスの微絨毛膜画分から p90 の免疫沈降を行い、免疫沈降された p90 のチロシンリン酸化の程度について抗チロシンリン酸化抗体を用い評価した。

4. 研究成果

(1) 動物個体における腸管免疫制御および病態への SAP-1/p100 シグナルの関与

IL-10 KO マウスと p100 KO マウスとの交配を行い、p100/IL-10 DKO マウスを作製し、腸炎の発症度および重症度について検討した。その結果、p100/IL-10 DKO では、IL-10 KO マウスおよび p100 KO マウスに比べ、生後 15 週以降での DAI が有意に高く、高い腸炎の発症率と重症度を示すと考えられた。また、大腸におけるサイトカイン IL-6 およびケモカイン KC、MIP-2 の発現量について、IL-10 KO マウスに比べ p100/IL-10 DKO において高い傾向を認めるに留まった。一方、p100 KO マウスと野生型マウスに対して、5 日間、1.5% デキストラン硫酸 (DSS) を含む飲料水を摂取させたところ、p100 KO マウスと野生型マウスでは DSS 摂取による体重減少については、大きな差が認められなかった。これらのことから、p100 は腸管免疫の制御に関与すると考えられるが、腸炎の発症機構により、p100 の作用が異なる可能性が高いと考えられた。

また、p100/SAP-1/IL-10 の三重遺伝子欠損マウスについては、解析を行う段階へと至った。

(2) SAP-1、p100 シグナルによる腸管免疫

制御機構の解析

腸上皮細胞はサイトカイン、ケモカインを分泌することで腸管免疫を制御することが知られている。これまでの解析から、SAP-1 および p100 シグナルがケモカイン産生の制御に関与することを見出していた。そこで、SAP-1 および p100 がサイトカイン産生の制御に関与するかについて、培養細胞に p100 および p100 変異体 (チロシンリン酸化部位をフェニルアラニンに置換した変異体) また p100 のチロシンリン酸化を担う c-Src との過剰発現を行い、腸炎と密接に関連する炎症性サイトカイン IL-6 の産生について評価した。その結果、野生型 p100 と c-Src を同時に過剰発現させた場合には、野生型 p100、変異型 p100、c-Src 単独、および変異型 p100 と c-Src との共発現に比べ、IL-6 産生の有意な増加が認められ、p100 および SAP-1 シグナル系が炎症性サイトカイン産生制御にも関与することが強く示唆された。一方、SAP-1 KO、p100 KO、野生型マウス由来腸オルガノイドにおけるサイトカイン IL-6 (またはケモカイン MIP-2) の mRNA の発現量については、有意な差は認められなかった。

腸管内腔に存在する腸内細菌による腸上皮細胞の遺伝子発現制御が、腸上皮細胞を介した腸管免疫制御に関与することが知られている。そこで、腸内細菌により p100 および SAP-1 の遺伝子発現が制御されるかについて検討した。その結果、抗生剤投与マウスおよび無菌マウスを用いた解析から、小腸上皮細胞において p100 は、グラム陽性菌によりその発現が促進され、一方、SAP-1 については腸内細菌によりその発現制御を受けない可能性が示唆された。さらに、腸オルガノイドを用いた解析から、p100 は炎症性サイトカインである IFN- γ によりその発現が正に制御されることを見出した。興味深いことに、抗生剤投与マウスにおいて、腸管における IFN- γ の mRNA 量の減少が認められたことから、腸内細菌叢おそくはグラム陽性菌によりその発現が誘導される IFN- γ により、p100 の小腸上皮細胞での発現が促進的に制御されている可能性も考えられた。

(3) p100 および SAP-1 リガンド分子の検索
p100 が SAP-1 の基質分子であることから、p100 および SAP-1 が互いの細胞外領域を介して結合し、リガンド分子としても機能する可能性が考えられた。そこで、培養細胞に SAP-1 または p100 の野生型および細胞内領域欠失変異体を過剰発現させ、SAP-1 と p100 の複合体形成について検討した。その結果、細胞内領域を欠失させた p100 および SAP-1 同士との複合体形成が認められたことから、両者が細胞外領域を介して互いのリガンド分子として機能する可能性が示唆された。

(4) SAP-1 の新たな基質候補分子の単離・同定

SAP-1 KO マウス由来微絨毛分画において、p100 以外にチロシンリン酸化の亢進を認められる約 90 kDa の蛋白質を見出していた。そこで、抗リン酸化チロシン抗体を用いたアフニティー精製および質量分析を行い、90 kDa 付近のチロシンリン酸化蛋白質の単離同定を試みた。その結果、細胞質型の蛋白質であり、腸上皮細胞の微絨毛に存在する約 90 kDa のチロシンリン酸化を受ける p90 を単離同定することができた。さらに、p90 はそのアミノ酸一次構造から複数のリン酸化を受ける可能性の高いチロシン残基を持つと考えられた。実際、SAP-1 KO マウス微絨毛膜由来分画から抗 p90 抗体を用い免疫沈降を行った p90 については、野生型マウスから免疫沈降を行ったものに比べ、チロシンリン酸化の亢進を認めた。以上のことから、p90 が SAP-1 の新たな基質分子である可能性が強く示唆された。

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7件)

Murata Y, Kotani T, Supriatna Y, Kitamura Y, Imada S, Kawahara K, Nishio M, Daniwijaya EW, Sadakata H, Kusakari S, Mori M, Kanazawa Y, Saito Y, Okawa K, Takeda-Morishita M, Okazawa H, Ohnishi H, Azuma T, Suzuki A, Matozaki T.

Protein tyrosine phosphatase SAP-1 protects against colitis through regulation of CEACAM20 in the intestinal epithelium.

Proc Natl Acad Sci USA. 査読有.

112 巻. 2015. E4264-4271.

doi:10.1073/pnas.1510167112.

Kitamura Y, Murata Y, Park JH, Kotani T, Imada S, Saito Y, Okazawa H, Azuma T, Matozaki T.

Regulation by gut commensal bacteria of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule expression in the intestinal epithelium.

Genes Cells. 査読有. 20 巻. 2015.

578-589. doi:10.1111/gtc.12247.

村田 陽二, 小谷 武徳, 的崎 尚

【プロテインホスファターゼの最先端: 制御機構から医療まで】受容体型チロシンホスファターゼの機能と病態 R3 サブタイプチロシンホスファターゼを中心に

生化学. 査読無. 87 巻. 2015. 547-553

村田 陽二, 小谷 武徳, 齋藤 泰之, 岡澤 秀樹, 大西 浩史, 的崎 尚
クラス3 受容体型チロシンホスファターゼ SAP-1 による腸管免疫制御
BMB2015, 2015.12.4, 神戸ポートアイランド(兵庫県)

Yoji Murata, Takenori Kotani, Yana Supriatna, Yasuaki Kitamura, Shinya Imada, Yasuyuki Saito, Hideki Okazawa, Hiroshi Ohnishi, Takashi Matozaki
SAP-1 and CEACAM20 protect against colitis in the intestinal epithelium
FASEB, 2015.8.3, The Steamboat Grand (USA)

村田 陽二, 小谷 武徳, Yana Supriatna, 北村 泰明, 今田 慎也, 齋藤 泰之, 大西 浩史, 的崎 尚
腸粘膜上皮細胞の微絨毛に局在する受容体型チロシンホスファターゼ SAP-1 と CEACAM20 による腸管免疫制御
第 67 回日本細胞生物学会大会, 2015.7.2, タワーホール船堀(千葉県)

Yasuaki Kitamura, Yoji Murata, Jung-ha Park, Takenori Kotani, Takeshi Azuma, Takashi Matozaki
Regulation by the intestinal microflora of Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEACAM) 20 expression in intestinal epithelial cells
第 11 回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス, 2014.11.12, 東北大学医学部 民陵会館(宮城県)

北村 泰明, 村田 陽二, 朴 貞河, 今田 慎也, 小谷 武徳, 岡澤 秀樹, 東健, 的崎 尚

腸管における CEACAM20 の発現と腸内細菌叢を介した発現制御

第 87 回日本生化学会大会, 2014.10.17, 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都府)

的崎 尚, 村田 陽二, 小谷 武徳, Yana Supriatna, 森 宗昌, 岡澤 秀樹, 大西 浩史

R3 受容体型チロシンホスファターゼの発現、局在と生理機能

第 36 回日本分子生物学会年会, 2013.12.5, 神戸ポートアイランド(兵庫県)

村田 陽二, 小谷 武徳, Supriatna Yana, 森 宗昌, 草苺 伸也, 岡澤 秀樹, 大西 浩史, 的崎 尚
受容体型チロシンホスファターゼ SAP-1 による腸管免疫制御

[学会発表](計25件)

第 73 回日本癌学会学術総会、2013.10.3、
パシフィコ横浜（神奈川県）

Takashi Matozaki, Yoji Murata,
Takenori Kotani, Yana Supriatna,
Hideki Okazawa, Hiroshi Ohnishi
The protein tyrosine phosphatase
SAP-1 protects against colitis
through regulation of CEACAM in the
intestinal epithelium
FASEB, 2013.8.12、 SteamboatSprings
(USA)

〔その他〕

ホームページ等

神戸大学大学院医学研究科 生化学・分子生
物学講座 シグナル統合学分野

[http://www.med.kobe-u.ac.jp/tougou/sign
al/Home.html](http://www.med.kobe-u.ac.jp/tougou/sign
al/Home.html)

6．研究組織

(1)研究代表者

村田 陽二 (MURATA, Yoji)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号： 60400735