

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670142

研究課題名(和文)腸上皮細胞による腸管免疫制御の分子機構に関する研究

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of regulation of intestinal immunity by intestinal epithelial cells

研究代表者

的崎 尚(Matozaki, Takasi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80252782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：受容体型チロシンホスファターゼSAP-1は腸上皮細胞の微絨毛に特異的に局在することが知られている。以前に私は、IL10ノックアウトマウスにおいて自然発症する腸炎がSAP-1を欠損させると重篤化することを見出していた。本研究では、SAP-1の脱リン酸化基質であるCEACAMのチロシンリン酸化が、下流分子を活性化することでIL-8のようなケモカインの産生を誘導することを見出した。また、SAP-1とCEACAMは互いの細胞外ドメインを介して相互作用することも見出した。以上のことから、腸上皮細胞のSAP-1はCEACAMのチロシンリン酸化を調節することで腸管免疫を制御している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：SAP-1 is a receptor-type protein tyrosine phosphatase that is localized specifically at microvilli of the brush border in intestinal epithelial cells. I previously found that SAP-1 ablation results in exacerbation of spontaneous colitis in Il10 knockout mice. In this study, I showed that tyrosine phosphorylation of CEACAM, a dephosphorylation substrate for SAP-1, promotes the activation of downstream molecules, thereby inducing production of chemokines such as IL-8. In addition, I found that SAP-1 specifically interacts with CEACAM and that this interaction is mediated via the ectodomains of both proteins. Thus, SAP-1 in intestinal epithelial cells is likely to regulate the intestinal immunity by controlling the tyrosine phosphorylation level of CEACAM.

研究分野：生化学

キーワード：腸上皮細胞 炎症 生体分子 腸内細菌 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

腸管は、わずか1層の上皮細胞により消化管内腔と粘膜下層が隔てられており、腸管内腔からの様々な病原微生物の侵入に対しては極めて脆弱な環境をもたらしている。それ故、腸上皮細胞が強固な細胞バリアを形成すると共に、粘膜固有層やパイエル板には、病原微生物を感知する樹状細胞やマクロファージなど自然免疫系細胞が存在し獲得免疫系細胞を活性化し病原微生物を攻撃する。他方、制御性T細胞などは腸内常在細菌に対して免疫寛容をもたらし、過剰な免疫応答を抑制する。この正と負の免疫バランスが腸管免疫系の恒常性維持に重要であり、この破綻がクローン病、潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患 (IBD) の発症要因でもあろうと推定されている。従って、これまで腸管免疫制御や IBD の病因の研究は、上記の免疫担当細胞の機能やその異常を中心に行われてきた。一方、最近では、腸上皮細胞が物理的なバリア機能を果たすのみならず、常に腸内環境を監視して腸管免疫を制御することが示唆されている。しかし、腸上皮細胞による直接的な腸管免疫制御の分子機構の理解は十分でなく、特に腸上皮細胞がいかに腸内環境を監視しているのか、あるいは腸上皮細胞と免疫系細胞の連携はどのようにしてなされているか、その分子機構はほとんど明らかにされていない。

研究代表者は本研究の開始当初までに受容体型のチロシンホスファターゼ (PTP) である SAP-1 (別名 PTPRH) が、消化管粘膜上皮細胞の微絨毛に特異的に発現・局在することを明らかにしていた (Sadakata, Matozaki et al., Genes Cells, 2009)。また、SAP-1 遺伝子破壊 (KO) マウスと IBD のマウスモデルである IL-10 KO マウスとを交配したところ、IL-10/SAP-1 ダブル KO (DKO) マウスに見られる腸炎の程度が IL-10 単独 KO マウスに比べ極めて高度であることを見出し、SAP-1 は腸炎発症を抑制的に制御すると研究代表者は考えた。さらに、SAP-1 の脱チロシンリン酸化基質分子として、やはり微絨毛に局在する膜型分子である CEACAM ファミリーの 1 メンバー (以下、CEACAM) を同定し、研究代表者は SAP-1 と CEACAM の作用バランスが腸管免疫の制御に重要である可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、SAP-1 とその基質分子である CEACAM によって構成される SAP-1/CEACAM 系の生理機能とその作用機序を明らかにすることにより、腸上皮細胞による腸管免疫制御の新たな分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 腸管免疫制御における SAP-1/CEACAM 系の機能解析

CEACAM KO マウスを作製し、CEACAM が IL-10 KO マウスにおける腸炎の増悪に真に関わる

か否かにつき、IL-10/CEACAM DKO を作製し誘導される腸炎の程度を検討した。また、IL-10/SAP-1/CEACAM 3重 KO マウスの作製を進めた。

(2) CEACAM の機能と下流シグナル系の解析
培養細胞に CEACAM や、その他の分子を発現させ、CEACAM のチロシンリン酸化を誘導する分子、CEACAM と結合する分子、CEACAM の発現により活性や発現の上昇する分子について解析を進めた。

(3) 腸内細菌による CEACAM の発現調節機構の検討

腸上皮細胞における CEACAM の発現制御を検討した結果、アンピシリン、バンコマイシンなどの抗生剤投与後のマウスや Germ-free (無菌) マウスの腸上皮細胞における CEACAM 遺伝子発現が対照マウスに比して、有意に減少することを見出していた。そこでマウス小腸から単離・培養した腸上皮細胞塊 (腸オルガノイド) の培地中に、腸内細菌によって発現が誘導される炎症性サイトカインや、腸内細菌の代謝産物、菌体由来成分を添加し、CEACAM の発現に与える影響を検証した。

(4) CEACAM の細胞外領域のリガンド分子の探索

CEACAM の細胞外領域と免疫グロブリン Fc 領域との融合タンパク質をプローブとして、菌体成分や上皮細胞成分から細胞外領域に対するリガンドを生化学的に精製することを試みた。また、SAP-1 ならびに CEACAM の変異体を細胞に発現させ、それらが相互作用するかにつき検証した。

4. 研究成果

(1) CEACAM 欠損による腸炎の重症化

CEACAM の腸管免疫制御における役割について個体レベルでの解析は不十分である。そこで CEACAM KO マウスを作製し、CEACAM が IL-10 KO マウスにおける腸炎の増悪に真に関わるか否かにつき、IL-10/CEACAM DKO マウスを作製し、解析を行った。本解析の開始当初、CEACAM は SAP-1 の脱チロシンリン酸化基質分子であり、IL-10/SAP-1 DKO マウスでは IL-10 欠損による腸炎が重篤化することから、IL-10/CEACAM DKO マウスは IL-10 欠損によって生じる腸炎の程度が弱くなると予想していた。しかし、IL-10 単独 KO マウスに比べ、IL-10/CEACAM DKO マウスに見られる腸炎の程度は重症化するという予想外の結果が得られた。そこで現在、更なる検証を目的として IL-10/SAP-1/CEACAM 3重 KO マウスの作製を進めている。

(2) CEACAM 下流シグナルの同定

CEACAM の細胞内領域にはチロシンリン酸化を受ける部位、いわゆる Immunoreceptor

Tyrosine-based Activation Motif (ITAM)がある。そこで ITAM のチロシンリン酸化を行う分子について探索したところ、Src ファミリーチロシンキナーゼが ITAM のチロシンリン酸化を促進することを見出した。また、チロシンリン酸化した ITAM には SH2 ドメインを介して Syk チロシンキナーゼが結合することを見出した。また、CEACAM が NF κ B シグナルや MAP キナーゼを介して IL-8 などケモカインの産生を誘導する可能性を見出した。

(3) 短鎖脂肪酸及び炎症性サイトカインによる CEACAM の発現上昇

研究代表者は腸内細菌が CEACAM の発現を促進することを見出していた。腸内細菌は免疫系細胞に作用して TNF α や INF γ といった炎症性サイトカインの産生を誘導することが知られる。そこで、マウス小腸から単離・培養した腸上皮細胞塊 (腸オルガノイド) を用い、これらの炎症性サイトカインが CEACAM の発現を誘導するかにつき検証を行った。その結果、TNF α は CEACAM の発現を誘導しなかったが INF γ は CEACAM の発現を強く誘導することが明らかとなった。

一方で、腸内細菌は食物繊維を代謝することで短鎖脂肪酸を産生することが知られる。そこで、腸オルガノイドを短鎖脂肪酸で刺激したところ、短鎖脂肪酸の1つである酪酸によって CEACAM の発現が強く誘導されることも明らかとなった。

(4) CEACAM の細胞外領域のリガンド分子の探索

CEACAM は細胞外部分にイムノグロブリン様構造を有することから、細胞外領域に対するリガンド分子が存在する可能性が高い。CEACAM は腸微絨毛に局在することから、そのリガンド分子の候補として腸内細菌の菌体成分や腸上皮細胞から分泌される可溶性分子などが考えられる。しかし、本研究では CEACAM の細胞外ドメインに結合する菌体成分や腸上皮細胞から分泌される可溶性分子を同定することは出来なかった。

その一方で、本解析を進める過程において SAP-1 と CEACAM はそれぞれの細胞外ドメイン同士で相互作用することを見出した。このことから、SAP-1 と CEACAM は細胞外ドメインを介して相互作用しながら腸内環境を監視することで腸管免疫を制御している可能性が考えられた。

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9件)

- ① 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. E4264-71.

doi:10.1073/pnas.1510167112.

- ② 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.

578-89. doi:10.1111/gtc.12247.

- ③ 小谷 武徳, 村田 陽二, 的崎 尚
【細胞シグナル操作法】分子からみたシグナル操作法 キナーゼ プロテインホスファターゼ

生体の科学. 査読無. 66 巻. 2015.

432-433

- ④ 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

[学会発表] (計17件)

- ① 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 / Regulation of intestinal immunity by R3-subtype receptor-type protein tyrosine phosphatase SAP-1

BMB2015, 2015. 12. 4, 神戸ポートピアホテル (兵庫県)

- ② 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, SteamboatSprings (USA)

- ③ 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 /Regulation of intestinal immunity by the microvillus-specific protein tyrosine phosphatase SAP-1 and CEACAM20
第 67 回日本細胞生物学会大会、2015. 7. 2、タワーホール船橋 (千葉県)

- ④ Takashi Matozaki
Roles of Protein Tyrosine Phosphatases in Homeostasis of Intestinal Epithelium
Joint Symposium of Université de Liège and Kobe University、2015. 5. 13、神緑会館 (兵庫県)
- ⑤ Yoji Murata
Regulation of intestinal immunity by the protein tyrosine phosphatase SAP-1
University of Washington and Kobe University International Joint Symposium、2015. 12. 16、神戸ポートピアホテル (兵庫県)
- ⑥ 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
University of Washington and Kobe University International Joint Symposium、2014. 12. 15、神戸ポートピアホテル (兵庫県)
- ⑦ Jung-ha Park, Takenori Kotani, Yasuaki Kitamura, Yoji Murata, Takashi Matozaki
Regulation by microbiota of intestinal epithelium turnover
第 37 回日本分子生物学会年会、2014. 11. 27、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑧ Takashi Matozaki, Yoji Murata, Takenori Kotani, Yasuyuki Saito
Roles of protein tyrosine phosphatases in homeostasis of intestinal epithelium
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、東北大学医学部良陵会館 (宮城県)
- ⑨ 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、東北大学医学部良陵会館 (宮城県)

- ⑩ 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/Expression of CEACAM20 in intestine epithelial cells and regulation of its expression by intestinal microflora
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)
- ⑪ 北村 泰明、村田 陽二、朴 貞河、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 13 回生体機能研究会、2014. 7. 19、ホテルパーク (岐阜県)

[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/signal/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

的崎 尚 (MATOZAKI Takashi)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80252782