

令和元年6月3日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08624

研究課題名(和文) 腸上皮細胞特異的チロシンホスファターゼによる腸管免疫制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of intestinal immunity by an intestinal epithelial-specific protein tyrosine phosphatase

研究代表者

村田 陽二 (Murata, Yoji)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60400735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸上皮細胞特異的な発現を示すチロシンホスファターゼSAP-1およびその関連シグナル分子による腸上皮細胞を介した腸管免疫制御機構の解析を進め、SAP-1の基質分子であるCEACAM20、およびSAP-1関連分子であるSrcファミリーキナーゼやCskが、腸炎モデルマウスを用いた解析などによりin vivoにおいて腸炎の病態形成に関与すること、また、これらシグナル分子による腸管免疫の制御機構の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管における免疫応答の異常は大腸炎や大腸がんの病態形成に深く関与することが知られている。しかしながら、腸管を構成する腸上皮細胞による免疫制御機構については不明な点が多い。本研究により、腸上皮細胞による腸管免疫制御機構の一端が明らかとなった。また、その制御機構の異常が腸炎の病態形成に関与することが腸炎モデル動物を用いた解析から示唆された。今後、更に本研究を進めることにより、免疫異常と関連する腸炎や大腸がんなどの消化管疾患の新たな診断法や治療法の開発の糸口が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I showed, by using gene-modified mice, that CEACAM20, Src family kinases, and Csk, which are signaling molecules related to the intestinal epithelial-specific protein tyrosine phosphatase SAP-1, were involved in the pathogenesis of colitis, and I revealed some of the molecular mechanisms for the regulation of immune responses in the intestine by these molecules in 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

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 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に隔てられており、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などの外来抗原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て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す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の恒常性維持に重要であり、これまで腸管免疫制御や炎症性腸疾患の病因の研究は、特に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、近年、腸上皮細胞が物理的なバリア機能を果たすのみならず、腸内環境を監視して腸管免疫を制御することが示されつつある(引用文献①)。しかしながら、腸上皮細胞による腸管免疫制御の分子機構については、十分に明らかとはなっていない。

研究代表者、および研究代表者が所属する研究グループは、これまでに腸上皮細胞の微絨毛に特異的に発現・局在する受容体型のチロシンホスファターゼであるSAP-1(別名PTPRH)を見出し、その生理機能について解析を進めてきた。最近研究代表者は、SAP-1遺伝子破壊(KO)マウスと炎症性腸疾患のマウスモデルであるIL-10 KOマウスを用いた解析から、IL-10/SAP-1二重遺伝子欠損(DKO)マウスに見られる大腸炎の程度がIL-10 KOマウスに比べ極めて高度であることを示し、SAP-1が腸炎発症を抑制的に制御するシグナル分子であることを見出した(引用文献②)。加えて、SAP-1欠損による大腸炎の増悪化を引き起こす分子メカニズムの解析から、SAP-1のチロシン脱リン酸化基質分子として微絨毛に局在する膜型分子であるCEACAM20(Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 20)を同定し、この膜型分子がその細胞内領域に生じるチロシンリン酸化を介してIL-8などのケモカイン産生を誘導し炎症を惹起する可能性を報告した(引用文献②)。すなわち、SAP-1はCEACAM20の脱リン酸化を担い、腸炎の発症を抑制すること、さらには両者の作用のバランスが腸上皮細胞による腸管免疫の制御に重要であるという新たなモデルを提案した(引用文献②)。しかしながら、SAP-1-CEACAM20シグナルを含め、チロシンホスファターゼSAP-1の腸上皮細胞を介した腸管免疫制御における役割やその作用機序については、十分に明らかとはなっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、腸上皮細胞による腸管免疫制御の分子メカニズムの一端を理解するため、研究代表者が独自に見出したSAP-1-CEACAM20シグナルを中心に、腸上皮細胞を起点としたチロシンホスファターゼSAP-1による腸管免疫制御機構の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 腸炎発症制御へのSAP-1関連分子の関与

腸管における免疫応答制御の異常は、炎症性腸炎の発症や病態の増悪化につながることで知られている。そこで、*in vivo*においてSAP-1の基質分子であるCEACAM20と腸炎の病態との関連性を明らかにする目的で、炎症性腸疾患モデルであるIL-10 KOマウスとCEACAM20 KOとの交配を行い、CEACAM20/IL-10 DKOマウスにおける腸炎の発症度および重症度について検討した。腸炎の発症度および重症度は、便の堅さ、血便の有無、脱肛の程度に基づき点数化することで評価した。また、CEACAM20 KOマウス、および、SAP-1シグナルの関連分子としてSrcファミリーキナーゼ(SAP-1と結合するチロシンキナーゼ)に着目し、その活性化制御分子であるCskの腸上皮細胞特異的KOマウス(Csk cKOマウス)を用い、化学物質誘導性の腸炎モデル[2.0%デキストラン硫酸(DSS)を飲料水中に加え7日間摂取、その後通常の飲料水に交換]を作製し、腸炎の程度について、体重の減少率、便潜血の有無、便の堅さに基づき点数化することで評価した。

#### (2) 腸上皮細胞におけるCEACAM20を介した遺伝子発現制御

CEACAM20により発現制御を受ける遺伝子産物が、SAP-1-CEACAM20シグナルを介した腸管免疫制御の一端を担う可能性が高いことから、野生型マウス、CEACAM20 KOマウスの腸上皮細胞を単離し、Total RNAを回収し、その後、DNAマイクロアレイ解析を行うことで、野生型マウスとCEACAM20 KOマウスの腸上皮細胞間で発現量の異なる遺伝子の探索を行った。

#### (3) CEACAM20のリガンド分子の探索

CEACAM20のファミリー分子であるCEACAM1やCEACAM5などは、細菌の受容体となり、細菌の宿主への定着や細菌による細胞内シグナル伝達の制御に関与することが報告されている。そこで、CEACAM20の細胞外領域とヒトIgG1のFc領域との融合蛋白質の発現ベクターを構築し、得られた発現ベクターをHEK293細胞に導入し、培養中に含まれるCEACAM20-Fc融合の精製を行った。その後、得られた融合蛋白質を固相化させたビーズと野生型マウスの腸内容物より調整した蛋白質を含む溶液とを反応させ、洗浄後、ビーズに含まれる蛋白質を回収し、SDS-PAGEにて分離し、銀染色により蛋白質の検出を行った。

#### (4) 腸内細菌依存的な腸上皮細胞の蛋白質チロシンリン酸化制御へのSAP-1の関与

腸管免疫の制御に腸内細菌が関与することが示されている。そこで、腸上皮細胞での SAP-1 シグナル系が腸内細菌依存的な腸管免疫制御に関与する可能性について検討する目的で、野生型マウスおよび SAP-1 KO マウスに抗生剤（アンピシリン、メトロニダゾール、ネオマイシン、バンコマイシンの4種の抗生剤）を含む飲料水を一ヶ月間与え、腸内細菌を除いた際の腸上皮細胞の蛋白質チロシンリン酸化の変動について抗リン酸化チロシン抗体を用いた腸組織の免疫染色を行い評価した。

#### (5) SAP-1 KO、および、CEACAM20 KO、Csk cKO マウスの腸内細菌叢の解析

腸内細菌叢は腸管免疫の制御に関与し、その腸内細菌叢を構成する菌種の量や違いが腸管免疫恒常性維持の破綻の引き金となり、腸炎の発症に関与することが示唆されている。そこで、8～10週令の野生型および CEACAM20、もしくは Csk cKO マウスの糞便を回収し、糞便中に含まれる DNA を抽出後、次世代シーケンサを用い抽出した DNA 中に含まれる細菌由来 16S rRNA 遺伝子の一部の領域の塩基配列を網羅的に解析した。得られた解析データを元に、特定の腸内細菌の存在比率、また腸内細菌の多様性について解析した。一方、SAP-1 KO マウスを用いた解析では、糞便に含まれる DNA を回収後、特定の細菌由来 16S rRNA 遺伝子の一部の領域を特異的に増幅可能なプライマーセットを用い、定量的 PCR を行うことで、糞便中に含まれる複数の細菌の相対的な存在量について野生型マウスと比較した。

#### (6) 腸炎における SAP-1 関連分子(Csk、および Src ファミリーキナーゼ)の役割

腸炎の発症や増悪化の要因として、腸上皮の透過性の亢進が知られている。そこで、DSS 腸炎の誘導処置を行ってから、0、3、6 日目に、マウスに平均分子量 4 kDa の蛍光標識されたデキストラン (FD-4) を経口投与し、4 時間後の血中に含まれる FD-4 の量を観察することで、腸上皮の透過性を評価した。また、上皮組織の透過性には、上皮細胞に発現するオクルーディンやクローディン、カドヘリンなどの細胞間接着分子が重要な役割を果たしている。そこで、DSS 腸炎の誘導処置を行う前後で、Csk cKO マウスおよび野生型マウスから腸組織を単離し、腸組織における細胞間接着分子の発現量についてウエスタンブロット法を用いて比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 腸炎発症制御への SAP-1 関連分子の関与

CEACAM20 KO マウスを用い、IL-10 KO マウスとの交配により腸炎モデルを作製し、CEACAM20/IL-10 DKO マウスの腸炎の程度について評価した。CEACAM20 KO マウスは腸炎の発症を示さないが、CEACAM20/IL-10 DKO マウスは、IL-10 KO マウスに比べ、飼育形態により腸炎の重症度が異なる結果となった。CEACAM20/IL-10 DKO マウスと IL-10 KO マウスをそれぞれ個別飼育した場合には、IL-10 KO マウスに比べ、DKO マウスでは腸炎の重症度が高まる傾向が認められた。一方、両マウスを同居させた場合には、DKO マウスでは腸炎の重症度が IL-10 KO マウスに比べ低下する傾向が認められた。すなわち、DKO マウスは飼育形態により腸炎の重症度が異なるが、IL-10 欠損による腸炎の発症において CEACAM20 が腸炎の発症制御に関与する可能性が示唆された。また、化学誘導性の腸炎モデルを用いた解析から、CEACAM20 KO マウスでは、野生型マウスに比べ、体重の減少度の低下傾向が認められ、腸炎の発症や重症度が弱まる可能性が示唆された。従って、腸上皮細胞の CEACAM20 は、*in vivo* において腸管免疫制御に関与するシグナル分子として機能する可能性が高いと考えられる。

また、SAP-1 シグナルとの関連分子である Src ファミリーキナーゼの活性化制御分子である Csk cKO マウスを用い、化学誘導性の腸炎モデルを作製し、Csk cKO マウスの腸炎の発症度、重症度に与える影響を検討した。その結果、Csk KO マウスでは、野生型マウスに比べ腸炎の重症度が有意に高く、Csk および Src ファミリーキナーゼが腸上皮細胞を介した腸管免疫制御の一端を担うことが明らかとなった。

#### (2) 腸上皮細胞における CEACAM20 を介した遺伝子発現制御

上記(1)の CEACAM20 KO マウスを用いた解析から、CEACAM20 が *in vivo* において腸管免疫制御に関与する可能性が示唆された。そこで、その制御機構の一端を明らかにする目的で、DNA マイクロアレイ解析により、野生型マウスと CEACAM20 KO マウス由来の腸上皮細胞間で発現量の異なる遺伝子の検索を試みた。その結果、CEACAM20 KO マウス由来腸上皮細胞では、腸炎の発症に関与することが示唆されている一部の抗菌ペプチドの発現上昇や腸炎のバイオマーカーとして知られている Lrg1 の発現量の低下を示唆する実験結果が得られた。今後更なる解析が必要であるが、CEACAM20 はこれら遺伝子発現調節に関与することで、腸管免疫の制御の一端を担う可能性が示唆された。

#### (3) SAP-1 KO、および、CEACAM20 KO、Csk cKO マウスの腸内細菌叢の解析

SAP-1、CEACAM20、または、SAP-1 シグナルに関与するシグナル分子 Csk (および Src ファミリーキナーゼ) が腸内細菌叢の構成に影響を与えるかについて、それぞれの SAP-1 KO、CEACAM20 KO、および腸上皮特異的 Csk cKO マウスと野生型マウスと糞便中に含まれる細菌の種類および存在比率について比較検討を行った。その結果、CEACAM20、SAP-1 KO において、野生型と比べ、通常の飼育下においては、有意な違いは認められなかった。一方、Csk cKO マウスにおいては、

一部の菌種の存在比比率や腸内細菌叢の多様性において異なる傾向が認められたが、有意ではなかった。すなわち、通常の飼育状態において、腸上皮細胞の CEACAM20、SAP-1、Src、Csk が能動的に腸内細菌叢の制御を担う可能性は低いと考えられた。一方、腸炎発症時における腸内細菌の変化がその症状の増悪化に關与することが示唆されている。従って、今後、腸炎発症時における CEACAM20 KO、SAP-1 KO、Csk cKO マウスと野生型マウス間での腸内細菌の比較解析を行うことが必要であるとも考えられる。

#### (4) 腸内細菌依存的な腸上皮細胞のチロシンリン酸化制御への SAP-1 の関与

SAP-1 KO マウスでは、腸上皮細胞微絨毛において蛋白質チロシンリン酸化の亢進が認められ、この蛋白質チロシンリン酸化の亢進が腸管免疫の破綻の一因となり腸炎の増悪化に關与すると考えられている（引用文献②）。興味深いことに、抗生剤により腸内細菌を除去した際には、野生型マウスと同様に SAP-1 KO マウスの腸上皮微絨毛部位での蛋白質チロシンリン酸化の増強が認められなかった。すなわち、SAP-1 は腸内細菌依存的に腸上皮細胞の微絨毛部で誘導される蛋白質チロシンリン酸化を抑制する働きを持つチロシンホスファターゼとして機能し、その蛋白質チロシンリン酸化の制御を通じて腸管免疫制御に關与する可能性が示唆された。

#### (5) SAP-1 および CEACAM20 のリガンド分子の探索

CEACAM20-Fc を固相化したビーズを用い、可溶化した野生型マウス由来の腸内容物中に CEACAM20 の細胞外領域に結合する蛋白質成分が存在するか否かについて検討した。その結果、ヒト IgG を固相化したコントロールビーズに比べ、特定の大きさの複数の蛋白質の結合を確認することが出来た。今後、結合した蛋白質を同定し、CEACAM20 のリガンドとして機能するか否か、また、CEACAM20 との結合により腸管免疫制御を担うかなど、その生理的機能について解析を進めて行く必要がある。

#### (6) 腸炎における SAP-1 関連分子(Csk、および Src ファミリーキナーゼ)の役割

上記(1)で述べたように、化学誘導性の腸炎モデルにおいて、野生型マウスに比べ、Csk cKO マウスでは腸炎の増悪化が認められた。そこで、その増悪化の原因探索を進めたところ、Csk cKO マウスでは野生型マウスに比べ、腸炎誘導時の大腸上皮の透過性の亢進が認められた。大腸上皮の透過性の亢進は、腸炎の発症や重症度に関連しており、また、透過性の制御には腸上皮細胞の細胞間接着分子が重要な役割を果たすことが知られている。実際、腸炎誘導時において、複数の細胞接着分子の発現量の解析を行ったところ、Csk cKO マウスでは上皮細胞の透過性に關与することが知られているオクルーディンの発現量が、野生型に比べ有意に低下することが明らかとなった。一方で、複数の他の細胞間接着分子については、両マウス間で有意な差は認められなかった。これらの結果から、腸上皮細胞における Csk および Src ファミリーキナーゼは、腸上皮の透過性を制御し、腸炎の発症や病態形成に關与する可能性が示唆された。また、その透過性の制御には、オクルーディンの関与が示唆された。今後、SAP-1 シグナルが、腸炎発症時に Csk や Src ファミリーキナーゼを介して、腸上皮の透過性の制御を通じて、腸管免疫を制御し得るか否かについてさらに解析を行う必要がある。

#### <引用論文>

- ① Peterson LW, & Artis D, Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol.*, 14, 141-53, 2014, DOI: 10.1038/nri3608.
- ② 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 U S A.*, 112, E4264-E4271, 2015, DOI: 10.1073/pnas.1510167112.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Sun C, Murata Y, Imada S, Konno T, Kotani T, Saito Y, Yamada H, Matozaki T, Role of Csk in intestinal epithelial barrier function and protection against colitis, *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有, 504, 109-114, 2018  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.140,
- ② Mori S, Kamei N, Murata Y, Takayama K, Matozaki T, Takeda-Morishita M. Microvillus-specific protein tyrosine phosphatase SAP-1 plays a role in regulating the intestinal paracellular transport of macromolecules, *J Pharm Sci.*, 査読有, 106, 2904-2908, 2017  
DOI: 10.1016/j.xphs.2017.04.014,

- ③ Kotani T, Murata Y, Saito Y, Matozaki T, Future therapeutic potential of SAP-1 in inflammatory bowel diseases, *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.*, 査読有, 10, 1313-1315, 2016  
DOI: 10.1080/17474124.2016.1245144
- ④ Imada S, Murata Y, Kotani T, Hatano M, Sun C, Konno T, Park JH, Kitamura Y, Saito Y, Ohdan H, Matozaki T. Role of Src family kinases in regulation of intestinal epithelial homeostasis, *Mol Cell Biol.*, 査読有, 22, 2811-2823, 2016  
DOI: 10.1128/MCB.00311-16

〔学会発表〕(計 9件)

- ① 孫 春暁、Role of Csk in the regulation of intestinal homeostasis and development of inflammation in the colon、第65回日本生化学会近畿支部例会、2018年
- ② 孫 春暁、Src ファミリーキナーゼの炎症性腸疾患における重要性、第91回日本生化学会、2018年
- ③ 的崎 尚、腸上皮細胞の恒常性維持に関わるチロシンリン酸化シグナルの意義、第91回日本生化学会、2018年
- ④ 孫 春暁、腸炎症制御における腸上皮 Src ファミリーキナーゼの役割、第77回日本癌学会学術総会、2018年
- ⑤ Murata Y, Role of Src family kinases in regulation of intestinal epithelial homeostasis, *Europhosphatase 2017: Phosphatases in cell fates and decisions*, 2017.
- ⑥ Kotani T, Regulation of intestinal immunity by the microvillus-specific protein tyrosine phosphatase SAP-1 and its substrate CEACAM20, *Europhosphatase 2017: Phosphatases in cell fates and decisions*, 2017.
- ⑦ Murata Y, Regulation of intestinal epithelial homeostasis by Src family kinases through Rac and Yap, 第76回日本癌学会学術総会、2017年
- ⑧ Imada S, Role of Src family kinases in regulation of intestinal epithelial homeostasis, 第12回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス&新がんゲノム国際シンポジウム、2016年
- ⑨ 村田陽二、受容体型チロシンホスファターゼによる腸管免疫制御、第15回生体機能研究会、2016年

〔その他〕

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大学院医学研究科 ホームページ  
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/tougou/signal/Home.html>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。