

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15219

研究課題名(和文)腸上皮細胞微絨毛を足場とした新たな腸管免疫の制御機構に関する研究

研究課題名(英文) Novel regulatory mechanisms of the intestinal immunity via the microvilli of intestinal epithelial cells

研究代表者

的崎 尚 (Matozaki, Takashi)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：80252782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000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であるSAP-1は腸上皮細胞に特異的に発現し、その基質分子であるCEACAM20のチロシンリン酸化レベルを制御することによって腸管免疫系を制御すると考えられている。本研究ではSAP-1/CEACAM20の機能や発現の制御機構についてin vitro及びin vivoレベルでの解析を行い、SAP-1/CEACAM20による腸管免疫系制御機構の一端を解明した。

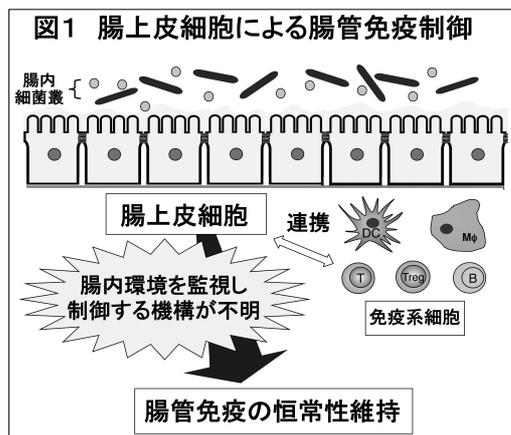
研究成果の概要(英文)：SAP-1, a receptor-type protein tyrosine phosphatase that is specifically expressed in intestinal epithelial cells, likely participates in the regulation of intestinal immunity by controlling the tyrosine phosphorylation level of its ligand CEACAM20. In this study, the regulatory mechanisms of SAP-1/CEACAM20-function and -expression were analyzed in vitro and in vivo. I showed a part of regulatory mechanisms of SAP-1/CEACAM20-mediated intestinal immunity.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：腸上皮細胞 微絨毛 腸管免疫 チロシンホスファターゼ 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

腸管は、常に病原菌などの細菌を含む外来抗原と接する生体内で最大の免疫応答の場であり、腸管免疫の破綻はクローン病、潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸炎 (IBD) あるいは大腸がんなどの病因となることが示唆されている。腸管免疫の制御においては、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 T、B 細胞など獲得免疫系細胞を活性化し病原微生物を攻撃する (図 1)。

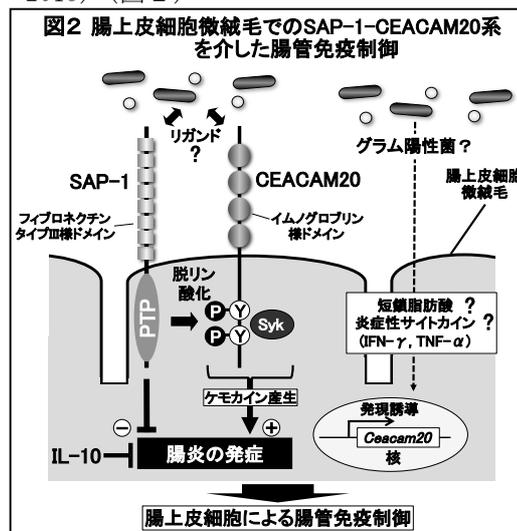


他方、制御性 T 細胞などは腸内常在細菌に対して免疫寛容をもたらし、過剰な免疫応答を抑制する。この正と負の免疫バランスが腸管免疫の恒常性維持に重要であり、この破綻が IBD の発症要因の 1 つであるとされている。従って、これまで腸管免疫制御や IBD の病因の研究は、上記の免疫系細胞の機能やその異常を中心に行われてきた。

しかし、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、常に腸内環境を監視して腸管免疫の制御に重要な役割を果たすことが示唆されつつある。例えば、腸上皮細胞は TGF- β 、TSLP などのサイトカイン、あるいは defensin などの抗菌ペプチドを産生することで、免疫系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されている (Peterson & Artis, *Nat Rev Immunol.*, 2014)。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、受容体型チロシンホスファターゼ (PTP) 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) (図 2)。さらに最近、SAP-1 が炎症抑制性サイトカイン IL-10 と協調して腸炎発症を抑制的に制御すること、また、SAP-1 の脱チロシンリン酸化基質分子として同じく微絨毛に局在する膜型分子である CEACAM20 を同定し、SAP-1 と CEACAM20 の作用のバランスが腸管免

疫の制御に重要であるというモデルを提唱している (Murata, Matozaki et al., *PNAS*, 2015) (図 2)



2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が独自に見出している上述の腸上皮細胞微絨毛を足場とするチロシンリン酸化シグナル系 (SAP-1/CEACAM20 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的とした。

3. 研究の方法

(1) 腸管免疫制御における SAP-1/CEACAM20 シグナル系の機能解析

腸炎モデルマウスである IL-10 遺伝子欠損 (KO) マウスと CEACAM20 KO マウスを交配することで IL-10/CEACAM20 2重 KO マウスを作製した。この 2重 KO マウスと IL-10 KO マウスについて体重、便の軟度、血便の程度、脱肛の程度を測定することにより腸炎の程度を比較した。また、大腸切片についても HE 染色を行い、腸炎の程度を比較した。

(2) 腸内細菌による SAP-1/CEACAM20 シグナル系の発現及び機能制御についての解析

①腸内細菌による SAP-1/CEACAM20 の発現制御

腸内細菌を感知する受容体として知られている Toll 様受容体 (TLR) が CEACAM20 の発現を制御するにつつき、TLR の一つである TLR2 受容体と TLR 受容体の下流シグナル分子として中心的な役割を果たす Myd88 の KO マウスの小腸または大腸より単離した上皮細胞における CEACAM20 蛋白質の発現を免疫ブロット法により解析した。

一方で、4 種の抗生剤 (アンピシリン、ネオマイシン、メトロニタゾール、バンコマイシン) を含む飲料水および通常の飲料水を一ヶ月間与えた野生型マウス (SPF 飼育下)、または無菌マウスより小腸および大腸由来上皮細胞を回収し、腸上皮細胞における SAP-1

の発現をイムノブロット法により解析した。

②腸内細菌による SAP-1 の機能制御

腸内細菌依存的な腸上皮細胞の細胞機能制御への SAP-1/CEACAM20 系の関与を個体レベルで解析する目的で、抗生剤投与による SAP-1 遺伝子破壊マウスにおける腸上皮細胞の微絨毛部でのチロシンリン酸化状態の変化について、組織免疫染色による解析を行った。

(3) CEACAM20 の細胞外領域のリガンドの検索

CEACAM20 は細胞外部分にフィブロネクチンタイプ III 様構造、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。CEACAM20 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。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である CEACAM20-Fc を結合させたビーズを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反応させ、ビーズを洗浄、ビーズに含まれる蛋白質を回収後、SDS-PAGE にて分離し、銀染色により蛋白質の検出を行った。

(4) SAP-1/CEACAM20 シグナル系による IL-6 の発現制御

HEK293 細胞に CEACAM20、c-Src の発現ベクターおよびコントロールベクターをリポフェクション法により導入し、48 時間後に培養液中に含まれる IL-6 を ELISA 法により定量解析した。

4. 研究成果

(1) 腸管免疫制御における SAP-1/CEACAM20 シグナル系の機能解析

交配により IL-10/CEACAM20 2重 KO マウスを得た。このマウスと IL-10 単独の KO マウスにおける腸炎の重篤度を比較したところ、IL-10 KO マウスにおける CEACAM20 遺伝子の更なる欠損が腸炎の増悪化を誘導することを見出し、CEACAM20 が腸管免疫制御に関与する可能性が確認できた。

(2) 腸内細菌による SAP-1/CEACAM20 シグナル系の発現及び機能制御についての解析

①腸内細菌による SAP-1/CEACAM20 の発現制御

研究代表者らは、これまでに腸上皮細胞における CEACAM20 の発現制御について検討した結果、4 種の抗生剤（アンピシリン、バンコマイシン、メトロニダゾール、ネオマイシン）投与マウスや無菌マウスの腸上皮細胞での CEACAM20 の発現がコントロールマウスに比べて、有意に減少することを見出していた。さらに、グラム陽性菌に強い抗菌作用を示すバンコマイシンの投与を行ったマウスの腸

上皮細胞において CEACAM20 の発現量の強い低下が認められ、グラム陽性菌が CEACAM20 の発現制御に関与する可能性が示唆された。そこで、細菌などの外来抗原の認識に関わる TLR が CEACAM20 の発現制御に関与する可能性について検討する目的で、細菌のリポ蛋白質やグラム陽性菌のペプチドグリカンの特異的に認識し自然免疫反応を惹起する TLR2 および TLR の主要なアダプター分子である Myd88 の遺伝子破壊マウスと野生型マウスの小腸および大腸由来腸上皮細胞における CEACAM20 の発現量について比較検討した。その結果、野生型マウスおよび TLR2 または Myd88 遺伝子破壊マウス由来腸上皮細胞間において、著明な CEACAM20 の発現量の変化は認められなかった。

また、CEACAM20 を基質分子とする SAP-1 が腸内細菌によりその発現制御を受けるか否かについて、4 種の抗生剤（アンピシリン、バンコマイシン、メトロニダゾール、ネオマイシン）投与マウスおよび無菌マウスを用いた解析を行ったところ、抗生剤投与マウスおよび無菌マウスにおいて小腸由来上皮細胞では SPF 飼育下での野生型マウスに比べ SAP-1 の発現量が僅かに増加する傾向が認められた。一方、大腸由来上皮細胞ではその発現量の変化はほとんど認められなかった。

②腸内細菌による SAP-1 の機能制御

SAP-1 遺伝子破壊マウスでは腸上皮細胞の微絨毛での強いチロシンリン酸化を示すシグナルが抗生剤非投与時において認められたが、投与時ではその減弱傾向が認められた。すなわち、腸内細菌により誘導される腸上皮細胞の微絨毛におけるチロシンリン酸化の制御に SAP-1 が関与する可能性が示唆された。

(3) CEACAM20 の細胞外領域のリガンドの検索

CEACAM20 の細胞外領域をヒト IgG1 の Fc 領域と融合させた組換え蛋白質（CEACAM20-Fc）の発現ベクターを構築し、一過性に発現ベクターを HEK293 細胞に導入することで、最終的に分泌型の組換え蛋白質 CEACAM20-Fc を得た。その後、得られた CEACAM20-Fc を用い、マウスの腸内容物の可溶性分画から CEACAM20 に結合する蛋白質のアフィニティ精製を試みたところ、コントロールのヒト IgG とは異なり、CEACAM20-Fc では腸内容物の可溶性分画に相互作用する可能性のある蛋白質の存在を示唆する実験結果が得られた。

(4) SAP-1/CEACAM20 シグナル系による IL-6 の発現制御

研究代表者は、培養細胞を用いた解析から CEACAM20 が c-Src によりチロシンリン酸化を受けることで、IL-8 の産生を促進的に制御し、一方、SAP-1 による CEACAM20 のチロシン脱リン酸化が CEACAM20 による IL-8 の産生を抑制することを見出していた。そこで、IL-8 に加

え、腸管免疫応答に密接に関連する炎症性サイトカイン IL-6 の産生について検討したところ、HEK293 細胞への CEACAM20 と c-Src の共発現が、CEACAM20 の単独発現に比べ、有意な IL-6 の産生誘導を示し、IL-6 の産生制御に CEACAM20 が関与することが示唆された。

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 10 件)

- ① Sawada Naoki, Kotani Takenori, Konno Tasuku, Setiawan Jajar, Nishigaito Yuka, Saito Yasuyuki, Murata Yoji, Nibu Ken-ichi, Matozaki Takashi
Regulation by commensal bacteria of neurogenesis in the subventricular zone of adult mouse
Brain Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、498 巻、2018 年、824-829
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.03.064
- ② Murata Yoji, Tanaka Daisuke, Hazama Daisuke, Yanagita Tadahiko, Saito Yasuyuki, Kotani Takenori, Oldenborg Per-Arne, Matozaki Takashi
Anti-human SIRP α antibody is a new tool for cancer immunotherapy
Cancer Science、査読有、2018 年、印刷中
DOI: 10.1111/cas.13548
- ③ Mori Shingo, Kamei Noriyasu, Murata Yoji, Takayama Kozo, Matozaki Takashi, Takeda-Morishita Mariko
Microvillus-Specific Protein Tyrosine Phosphatase SAP-1 Plays a Role in Regulating the Intestinal Paracellular Transport of Macromolecules
Journal of Pharmaceutical Sciences、査読有、106 巻、2017 年、2904-2908
DOI: 10.1016/j.xphs.2017.04.014
- ④ Meindert Sanne M., Oldenborg Per-Arne, Beuger Boukje M., Klei Thomas R. L., Johansson, Johanna, Kuijpers Taco W., Matozaki Takashi, Huisman Elise J., de Haas Masja, van den Berg Timo K., van Bruggen Robin
Human and murine splenic neutrophils are potent phagocytes of IgG-opsonized red blood cells
Blood Advances、査読有、1 巻、2017 年、875-886
DOI: 10.1182/bloodadvances.2017004671
- ⑤ Saito Yasuyuki, Respatika Datu, Komori Satomi, Washio Ken, Nishimura Taichi, Kotani Takenori, Murata Yoji, Okazawa Hideki, Ohnishi Hiroshi, Kaneko Yoriaki, Yui Katsuyuki, Yasutomo Koji, Nishigori Chikako, Nojima Yoshihisa, Matozaki Takashi
SIRP α +dendritic cells regulate homeostasis of fibroblastic reticular cells via TNF receptorligands in the adult spleen
Proceedings of the National Academy of Sciences、査読有、114 巻、2017 年、E10151-E10160
DOI: 10.1073/pnas.1711345114
- ⑥ Dai Hehua, Friday Andrew J., Abou-Daya Khodor I., Williams Amanda L., Mortin-Toth Steven, Nicotra Matthew L., Rothstein David M., Shlomchik Warren D., Matozaki Takashi, Isenberg Jeffrey S., Oberbarnscheidt Martin H., Danska Jayne S., Lakkis Fadi G. Donor SIRP α polymorphism modulates the innate immune response to allogeneic grafts
Science Immunology、2 巻、査読有、2017 年、eaam6202
DOI: 10.1126/sciimmunol.aam6202
- ⑦ Nuvolone Mario, Paolucci Marta, Sorce Silvia, Kana Veronika, Moos Rita, Matozaki Takashi, Aguzzi Adriano
Prion pathogenesis is unaltered in the absence of SIRP α -mediated "don't-eat-me" signaling
PLOS One 査読有、12 巻、2017 年、e0177876
DOI: 10.1371/journal.pone.0177876
- ⑧ Park Jung-ha, Kotani Takenori, Konno Tasuku, Setiawan Jajar, Kitamura Yasuaki, Imada Shinya, Usui Yutaro, Hatano Naoki, Shinohara Masakazu, Saito Yasuyuki, Murata Yoji, Matozaki Takashi
Promotion of Intestinal Epithelial Cell Turnover by Commensal Bacteria: Role of Short-Chain Fatty Acids
PLOS One、査読有、11 巻、2016 年、e0156334
DOI: 10.1371/journal.pone.0156334
- ⑨ Imada Shinya, Murata Yoji, Kotani Takenori, Hatano Masaki, Sun Chunxiao, Konno Tasuku, Park Jung-ha, Kitamura Yasuaki, Saito Yasuyuki, Ohdan Hideki, Matozaki Takashi
Role of Src family kinases in regulation of intestinal epithelial homeostasis
Molecular and Cellular Biology、査読有、36 巻、2016 年、2811-2823
DOI: 10.1128/MCB.00311-16
- ⑩ Kotani Takenori, Murata Yoji, Saito Yasuyuki, Matozaki Takashi
Future therapeutic potential of SAP-1 in inflammatory bowel diseases
Expert Review Gastroenterology &

Hepatology、査読有、10 卷、2016 年、
2811-2823
DOI: 10.1080/17474124.2016.1245144

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kotani Takenori, Murata Yoji, Yana Supriatna, Kitamura Yasuaki, Imada Shinya, Saito Yasuyuki, Okazawa Hideki, Ohnishi Hiroshi, Matozaki Takashi
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 年 7 月 23 日～28 日、パリ (フランス)
- ② 的崎 尚
成熟細胞の寿命制御とその破綻による病態に関する研究-腸上皮細胞をモデルとして-第 47 回広島消化管疾患研究会 (招待講演)、2016 年 05 月 31 日、ホテルグランヴィア広島 (広島県)
- ③ 村田 陽二、小谷 武徳、齊藤 泰之、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
第 15 回生体機能研究会、2016 年 7 月 1 日～2 日、淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県)
- ④ 金野 祐、小谷 武徳、朴 貞河、Jajar Setiawan、北村 泰明、今田 慎也、臼井 佑太郎、波多野 直哉、篠原 正和、齊藤 泰之、村田 陽二、的崎 尚
Short chain fatty acids regulate the turnover of intestinal epithelial cells
第 89 回日本生化学会大会、2016 年 09 月 25 日～27 日、仙台国際センター (宮城県)

[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：8 0 2 5 2 7 8 2