

令和 4 年 6 月 12 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07166

研究課題名(和文)サーファクタントプロテインDを介した腸内細菌叢制御による胆嚢・消化管の恒常性維持

研究課題名(英文) Homeostasis of biliary and intestinal systems dependent on microbiota regulated by SP-D

研究代表者

西尾 純子(Nishio, Junko)

東邦大学・医学部・准教授(寄付講座)

研究者番号：40598679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胆嚢で産生されるサーファクタントプロテインD (SP-D)は、Lactobacillus murinus などに対し抗菌作用を持ち、腸内細菌叢を制御していた。このような腸内ディスバイオーシスを持つSP-D欠損マウスでは、gdT細胞、Nkp46細胞、CD4+ lymphoid tissue-inducer細胞などのIL-22産生細胞が大腸粘膜で減少しており、大腸炎に対する高感受性の原因であると考えられた。一方、硬化性胆管炎モデルのAbcb4欠損マウスにSP-Dを欠損させても胆管炎は抑制されず、SP-Dの疾患への影響はなかった。今後、胆嚢がんや胆嚢感染症へのSP-Dの関与について検討していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SP-Dは、肺胞上皮細胞から分泌される抗菌ペプチドとして肺感染防御機構に貢献していることが知られていたが、本研究により、SP-Dが肺以外にも胆嚢から産生され、腸内細菌を制御し、腸管粘膜のIL-22産生細胞の維持を介して腸管恒常性に貢献している可能性があるという新しい概念を生んだ。線維性胆管炎に対してSP-D欠損による腸内ディスバイオーシスの影響は認めなかったが、感染症やがんなどの他の胆のう疾患に対する影響を検討する価値は十分にある。何らかの影響が認められれば、炎症性腸疾患のみならず、胆嚢疾患に関してSP-Dを標的とした治療基盤を創出する可能性を持つ。

研究成果の概要(英文)：Surfactant protein D (SP-D) produced in the gall bladder (GB) regulated gut microbiota by its anti-microbial activity against a group of bacteria including Lactobacillus murinus. In SP-D-deficient mice which has dysbiosis in the gut, IL-22-producing cells such as gdT and Nkp46 cells and CD4+ lymphoid tissue-inducers were decreased, leading to high sensitivity to colitis. In sclerosing cholangitis model mice in which SP-D was genetically depleted, the diseases was not affected. However, it is worthy of addressing the effects of SP-D on other GB or bile duct diseases including cancer and infection.

研究分野：自己免疫疾患、腸管免疫

キーワード：サーファクタントプロテインD Lactobacillus murinus ディスバイオーシス IL-22 硬化性胆管炎

1. 研究開始当初の背景

近年、腸内細菌叢が生体の恒常性維持や様々な疾患に深く関わっていることが明らかになってきた。良好な腸内細菌叢を維持して疾患を予防することは不可欠であり、そのために腸内細菌叢制御機構を解明することは急務である。腸内細菌叢の制御に、一部の抗菌ペプチドが関与することが知られているが、一部を除いて腸内細菌叢の変化と腸管恒常性への関与についての検討なされていない。申請者らは、細菌、肺における病原細菌・ウイルスの排除に貢献する抗菌ペプチドと知られていたサーファクタントプロテイン D (SP-D)が、胆嚢で産生され腸内細菌を制御し、腸管恒常性に貢献していることを発見した。さらに、大腸炎では、腸管からのフィードバック調節を受け、肝臓におけるグルコシルチコイド産生亢進に依存して胆嚢の SP-D 産生が亢進することを見出した。この現象の機構を明らかにするため、本研究課題を考案することとした。

2. 研究の目的

上記の現象の機構を明らかにするため、1) SP-D によって制御された腸内細菌叢のどのような因子が、どのように腸管恒常性維持に貢献するのか、2) SP-D は胆嚢の恒常性や疾患へ関与するか、さらに、3) SP-D が炎症性腸疾患 (IBD) や関連する胆嚢疾患の治療標的になるか、4) 腸内細菌叢を制御する胆嚢由来分子は SP-D 以外にも存在するか、上記の 4 つの問いを解明することにより、炎症性腸疾患・胆嚢疾患の新規病態メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1. SP-D^{-/-}マウスにおける dysbiosis と上皮・免疫細胞との関係について解析するため、SP-D^{-/-}マウス大腸組織を EDTA にて上皮を取り除いた後、コラゲナーゼ処理し、粘膜上皮の免疫細胞の懸濁液を得て、免疫細胞のフローサイトメトリー解析、及び qRT-PCR による遺伝子発現の検討を行った。
2. SP-D により制御された腸内細菌叢が胆嚢に関連する疾患の病態に関与するかを検討するため、線維性胆道疾患のモデルマウスである Abcb4^{-/-}マウスと SP-D^{-/-}マウスとを掛け合わせた重欠損マウスを作製し、線維性胆管炎への発症および重症度を検討した。
3. 腸内細菌叢を制御する、SP-D 以外の胆嚢由来分子を網羅的に探索するため、野生型マウスにデキストラン硫酸塩(DSS)誘導性大腸炎を罹患させたマウスの胆嚢組織の RNA-seq 解析を行い、罹患していないマウスを対照にして、大腸炎により発現が高まる遺伝子を網羅的に検討した。

4. 研究成果

1. 大腸粘膜免疫細胞が発現する、大腸炎に関連する炎症性サイトカインを qRT-PCR にて解析を行ったところ、SP-D^{-/-}マウスに比べて SP-D^{-/-}マウスで IL-22 の産生が低下していた(図 1)。粘膜免疫細胞のフローサイトメトリー解析では、SP-D^{-/-}マウスでは、IL-22 の産生細胞の中で、 $\gamma\delta$ T 細胞、NKp46 細胞、CD4+ lymphoid tissue-inducer 細胞が減少していることを見出した(図 2)。一方、同様に IL-22 産生細胞である Th17 細胞は、SP-D^{-/-}マウスと SP-D^{-/-}マウスで同等であった。従って、SP-D 欠損による腸内細菌叢のディスバイオーシスにより、これらの細胞が減少し、IL-22 の低下を来し、DSS 大腸炎に対する感受性が高くなったと考えられた。
2. PSC のモデルマウスである Abcb4^{-/-}マウスと SP-D^{-/-}マウスとを掛け合わせた重欠損マウスでは、SP-D 欠損の有無にかかわらず、線維性胆管炎は同様に発症し重症度にも有意差を認めなかった。このことから、SP-D 欠損により Abcb4^{-/-}マウスの線維性胆管炎は抑制されないと結論した。
3. 申請者らの過去の研究では、野生型マウスでは、大腸炎により肝臓内のグルコシルチコイド産生が増加することにより胆管上皮細胞の SP-D の産生が増加し、強固に腸内細菌叢を制御を行うが、SP-D^{-/-}マウスでは SP-D が欠失しているため腸内細菌叢制御がなされず大腸炎を悪化させることが示唆された。そこで、SP-D と同様に大腸炎罹患後に胆嚢で産生される抗菌ペプチドを探索するため、また、炎症性腸疾患に線維性胆管炎がしばしば併発する機構を見出すため、DSS 誘導性大腸炎を罹患させたマウスの胆嚢組織の RNA-seq 解析を行い、大腸炎による胆嚢組織へ影響を検討した。737 遺伝子が 2 倍以上で発現が増強し、細胞増殖に関与する遺伝子群、細胞外基質に関連する遺伝子の発現が有意に上昇していた。また、*Lipocalin2*, *Lipocalin6*, *PepsinogenC* の抗菌ペプチドが大腸炎罹患で上昇することが明らかになった(図 3)。

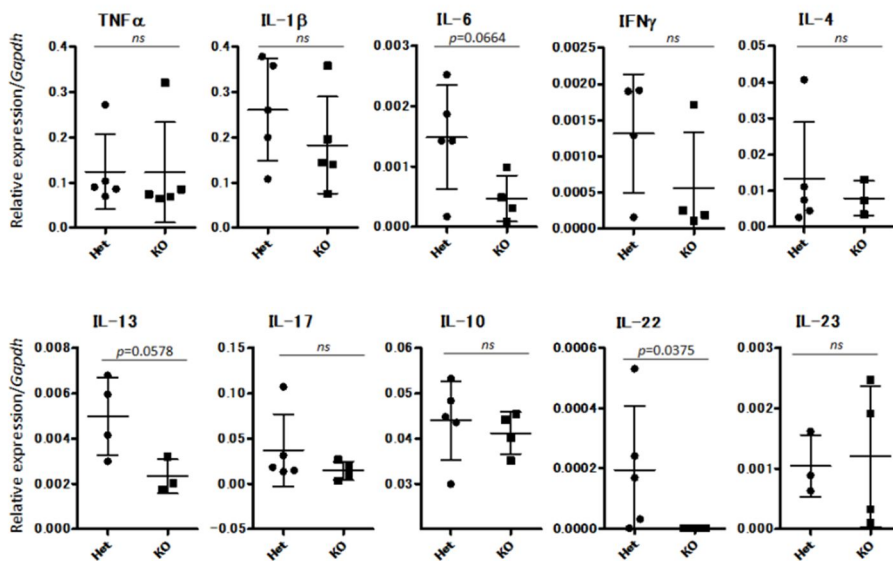


図1; 定常時の大腸粘膜細胞の免疫細胞におけるサイトカイン解析(qRT-PCR)

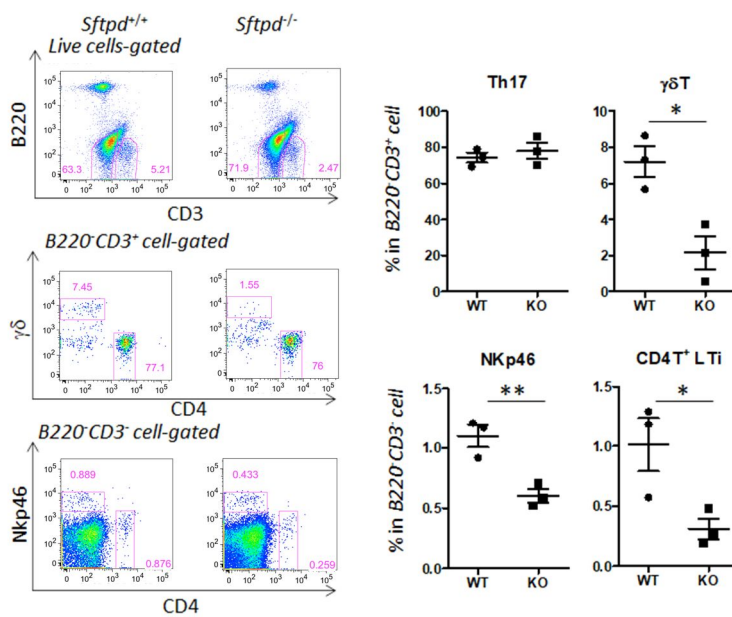


図2; フローサイトメトリーによる定常時の大腸粘膜細胞の免疫細胞のIL-22産生細胞の解析。腸管におけるIL-22産生細胞には、B220⁺CD3⁺CD4⁺(Th17)細胞、B220⁺CD3⁺gdTCR⁺(gdT)細胞、CD45⁺Lin⁻CD3⁻NKp46⁺(NKp46細胞)、CD45⁺Lin⁻CD3⁻CD4⁺(CD4⁺LTI)細胞が主な細胞である。左図; 典型的なdot-plot。右図; *Sftpd*^{+/+}、*Sftpd*^{-/-}マウス各N=3の結果をグラフで示したもの。

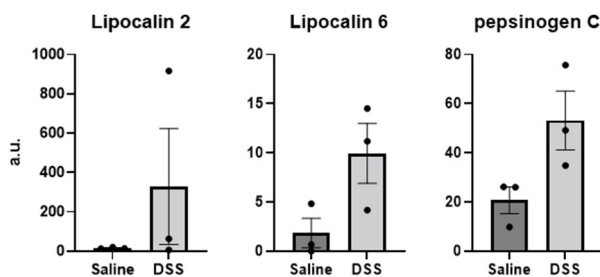


図3大腸炎罹患後に発現が増加した抗菌ペプチドの遺伝子発現。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名 Nishio Junko, Negishi Hideo, Yasui-Kato Mika, Miki Shoji, Miyanaga Kazuhiko, Aoki Kotaro, Mizusawa Takuma, Ueno Masami, Ainai Akira, Muratani Masafumi, Hangai Sho, Yanai Hideyuki, Hasegawa Hideki, Ishii Yoshikazu, Tanji Yasunori, Taniguchi Tadatsugu | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Identification and characterization of a novel Enterococcus bacteriophage with potential to ameliorate murine colitis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 20231 ~ 20231 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-99602-4 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Muraoka Sei, Kaneko Kaichi, Motomura Kaori, Nishio Junko, Nanki Toshihiro | 4. 巻 146 |
| 2. 論文標題 CX3CL1/fractalkine regulates the differentiation of human peripheral blood monocytes and monocyte-derived dendritic cells into osteoclasts | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cytokine | 6. 最初と最後の頁 155652 ~ 155652 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cyto.2021.155652 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Mizutani Satoshi, Nishio Junko, Kondo Kanoh, Motomura Kaori, Yamada Zento, Masuoka Shotaro, Yamada Soichi, Muraoka Sei, Ishii Naoto, Kuboi Yoshikazu, Sendo Sho, Mikami Tetuo, Imai Toshio, Nanki Toshihiro | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Treatment with an Anti-CX3CL1 Antibody Suppresses M1 Macrophage Infiltration in Interstitial Lung Disease in SKG Mice | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Pharmaceuticals | 6. 最初と最後の頁 474 ~ 474 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ph14050474 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Muraoka Sei, Nishio Junko, Kuboi Yoshikazu, Imai Toshio, Nanki Toshihiro | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Rationale for and clinical development of anti-fractalkine antibody in rheumatic diseases | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Expert Opinion on Biological Therapy | 6. 最初と最後の頁 1309 ~ 1319 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14712598.2020.1764931 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Yamada Soichi, Miyoshi Shion, Nishio Junko, Mizutani Satoshi, Yamada Zento, Kusunoki Natsuko, Sato Hiroshi, Kuboi Yoshikazu, Hoshino-Negishi Kana, Ishii Naoto, Imai Toshio, Mikami Tetsuo, Nakano Hiroyasu, Kawai Shinichi, Nanki Toshihiro | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Effects of CX3CL1 inhibition on murine bleomycin-induced interstitial pneumonia | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 European Journal of Inflammation | 6. 最初と最後の頁 1~10 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2058739220959903 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Negishi H, Endo N, Nakajima Y, Nishiyama T, Tabunoki Y, Nishio J, Koshiba R, Matsuda A, Matsuki K, Okamura T, Negishi-Koga T, Ichinohe T, Takemura S, Ishiwata H, Iemura SI, Natsume T, Abe T, Kiyonari H, Doi T, Hangai S, Yanai H, Fujio K, Yamamoto K, Taniguchi T. | 4. 巻 116 |
| 2. 論文標題 Identification of U11snRNA as an endogenous agonist of TLR7-mediated immune pathogenesis. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A | 6. 最初と最後の頁 23653-23661 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1915326116 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 西尾純子、貴田 (更級) 葉奈、谷口維紹 | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 胆嚢由来サーファクタントプロテインDによる新規の腸管恒常性維持機構 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科 | 6. 最初と最後の頁 3 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kimura Yoshitaka, Negishi Hideo, Matsuda Atsushi, Endo Nobuyasu, Hangai Sho, Inoue Asuka, Nishio Junko, Taniguchi Tadatsugu, Yanai Hideyuki | 4. 巻 109 |
| 2. 論文標題 Novel chemical compound <scp>SINCRO</scp> with dual function in <scp>STING</scp> type I interferon and tumor cell death pathways | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 2687~2696 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13726 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Junko Nishio, Hideo Negishi, Sho Hangaia, Hideyuki Yanaia, and Tadatsugu Taniguchia |
| 2. 発表標題 Bacteriophages play a role in regulating intestinal homeostasis and inflammation |
| 3. 学会等名 日本免疫学会学術集会（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Satoshi Mizutani, Kanoh Kondo, Syotaro Masuoka, Soichi Yamada, Sei Muraoka, Natsuko Kusunoki, Naoto Ishii, Yoshikazu Kuboi, Toshio Imai, Junko Nishio, Toshihiro Nanki |
| 2. 発表標題 The effect of anti CX3CL1 monoclonal antibody treatment in arthritis and interstitial lung disease of SKG mice. |
| 3. 学会等名 Keystone symposia; Fibrosis and Tissue Repair: From Molecules and Mechanics to Therapeutic Approaches（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号） | 所属研究機関・部局・職 （機関番号） | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|