

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592029

研究課題名：口腔常在菌が腸管自然免疫に及ぼす影響

研究課題名（英文） Effect of oral bacteria on intestinal innate immunity

研究代表者

中村 公則（NAKAMURA KIMINORI）

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・助教

研究者番号：80381276

研究成果の概要（和文）：本研究は、口腔常在菌と腸管上皮細胞との相互作用を解析するために、小腸上皮を構成し、 α ディフェンシンを分泌するパネト細胞を含む細胞株の樹立を目指した。通常の上皮細胞の初代培養法で平面培養を行ったところ、通常の上皮細胞の形態を持つ細胞の培養は成功したが、顆粒を持つパネト細胞は得られなかった。次にマウス小腸オルガノイド培養法を行い、得られたオルガノイドがパネト細胞の機能を維持しているのかを解析した。

研究成果の概要（英文）：To analyze the interaction of oral bacteria and intestinal epithelial cells, the aim of this study is to establish a intestinal epithelial cell line containing Paneth cells which secrete α -defensins. In conventional monolayer cell culture, intestinal epithelial cells were observed, however, Paneth cells were not identified. Next, organoid culture were performed by using mouse intestinal crypts. It was analyzed whether obtained organoids were maintaining the function of a Paneth cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：自然免疫学

科研費の分科・細目：歯学・形態基礎歯科学

キーワード：自然免疫、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

口腔と腸管は解剖学的に連続しており口腔常在菌や口腔病原菌が腸管の細菌叢や機能に影響を及ぼすことは容易に考えられる。しかし、今日までに口腔常在菌・病原菌の腸管への影響を詳細に検討した報告はない。この理由の1つとして、*in vitro*で基礎的検討

を行うことが出来る生体の機能に即した、適切な腸上皮培養細胞が存在していない事が挙げられる。小腸上皮は、円柱細胞、消化管内分泌細胞、杯細胞とパネト細胞の4種類の最終分化した上皮細胞とその幹細胞からなり、さまざまな腸管機能を担っている。その中でも、パネト細胞は陰窩の最基底部に位置し、

抗菌ペプチドである α ディフェンシンを分泌する自然免疫担当細胞である。口腔常在菌や口腔病原菌と小腸上皮とのクロストークを理解する上で、このパネト細胞との相互作用の解析が重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では最初にマウス小腸上皮細胞の培養法の確立と細胞株の樹立を目指す。特にパネト細胞が含まれる上皮細胞株の樹立を目指す。次に、得られた細胞に口腔常在菌・病原菌を暴露し腸上皮細胞への影響を細胞から産生される抗菌ペプチド量、殺菌効果で評価する。さらに、口腔関連病原菌等が腸上皮細胞にどの様に認識されているのかを遺伝子発現量測定により解析する。

本研究は腸管での自然免疫系と口腔常在菌とのクロストークを解明することで、腸炎や歯周病などの疾患発症の関与、分子機構および殺菌機能の両面から定量的に評価する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス小腸上皮細胞培養方の確立と細胞株の樹立。

マウス CD-1 (ICR)から小腸組織を採取し、マウス腸上皮細胞培養の最適な条件を確立する。既に報告のあるマウス上皮細胞の初代培養法や、文献等を参考しながら以下の条件を検討した。

①マウス組織からの細胞採取法を検討。

・どの週令のマウスを使用するのが最適か：胎児マウス、新生児マウス、生後何週までが適当か。

・組織から細胞を採取する方法：EDTA、コラゲナーゼなどの濃度、処理時間の検討。

・処理時、組織洗浄時の使用するバッファの種類の検討。

②培養環境の検討。

・培養皿にラミニン、コラーゲン等の細胞外基質コーティングの必要性を検討する。

③培地の検討。

・どの培養液が最適か。

・培地に増殖を亢進させると報告のあるサイトカイン (Epidermal growth factor : EGF 等) を加える必要があるのかを検討する。

(2) オルガノイド培養法を応用したマウス小腸上皮細胞株の樹立。

オルガノイド培養法を応用して最適な培養条件を検討する。既に報告のあるマウス小腸上皮細胞オルガノイド培養法や組織上皮細胞初代培養法に関する文献等を参考しながら以下の条件検討を実施する。実験に必要な細胞数が得やすく、細胞機能を維持しながら培養が可能な小腸上皮培養法を確立する。

① マウス小腸組織からの細胞採取法を

検討 (マウス CD1 から小腸組織を採取)。

・どの週令のマウスを使用するのが最適か (5週~40週令)。

・小腸のどこの部位が最適なのか (空腸~回腸)。

・組織から細胞を採取する方法：EDTA、コラゲナーゼなどの濃度、処理時間、温度。

・処理時、組織洗浄時の使用する緩衝液の種類。

② 培養環境の検討。

・培養にマトリゲル等の細胞外基質コーティングや包埋の必要性を検討する。

③ 培地の検討。

・どの様な培養液が最適か。

・増殖因子である EGF、Noggin、R-spondin1 等、血清等の必要性。

④ マウス小腸オルガノイドの機能解析。

・得られた小腸オルガノイドがパネト細胞を含む4種の上皮細胞と幹細胞を有するのかを各種特異的マーカーの免疫組織染色を行って共焦点レーザー顕微鏡で解析する。

以上を検討項目としてマウス小腸上皮細胞培養の最適条件と細胞株樹立を目指した。

4. 研究成果

(1) マウス小腸上皮細胞培養方の確立と細胞株の樹立。

研究の方法に示した様々な条件検討の結果以下の結果が得られた。

① CD-1 マウス胎生17日から小腸組織を採取し、長軸方向に開き、HBSSに浸した状態で約1mmの長さに切り刻み、洗浄後、培養液(DMEM-10%FBS)で37°C、5%CO₂で培養した。

2日ごとに培地を交換した。培養した組織を位相差顕微鏡で観察した。培養後3日目から小腸組織の周辺に紡錘状の形態をした細胞の増殖が観察された。5日後には小腸組織の裏側に紡錘状細胞に囲まれて、多角形の細胞が増殖してきた。

② マウス小腸組織から得られた培養細胞の免疫染色：上皮細胞のマーカーとしてサイトケラチン抗体 (Wide spectrum Cytokeratin) と E カドヘリン抗体、間葉系細胞のマーカー

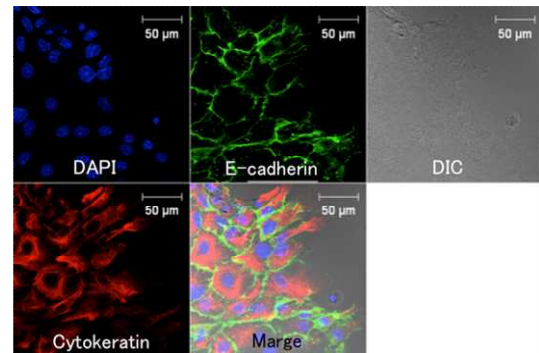


図1、平面培養より得られた小腸上皮細胞の蛍光免疫染色

として α -SMA抗体、ビメンチン抗体を用いて免疫染色を行った。結果、紡錘状の細胞は α -SMAが陽性、あるいはビメンチンが陽性だったことから間葉系細胞だと考えられた。また、多角形の細胞は細胞質がサイトケラチン陽性で細胞膜はEカドヘリン陽性だったことから上皮細胞だと考えられた(図1)。

③ 本研究では小腸上皮細胞株の樹立を目的としているため、間葉系細胞が混在している細胞集団から上皮細胞のみをセルソーターを使用した分離を試みた。培養開始14日目に増殖した細胞を回収し、E-Cadherin抗体で染色した。その後、セルソーターでE-Cadherin陽性分画をソートし、培養を行った。結果、ソート後、増殖してきた細胞は α SMA陽性の間葉系細胞であり、上皮細胞の増殖は見られなかった(図2)。

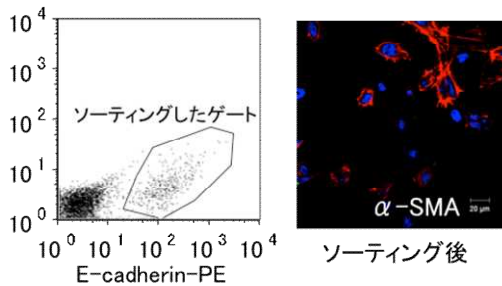


図2、平面培養より得られた小腸上皮細胞のソーティング

以上の培養条件では細胞内に顆粒を持つパネト細胞の形態特徴を持つ細胞は観察出来なかった。そこで次に3次元培養であるオルガノイド培養にて検討を続けた。

(2) オルガノイド培養法を応用したマウス小腸上皮細胞株の樹立。

研究の方法に示した様々な条件検討の結果以下の結果が得られた。

① CD1マウス(11週齢,雄)をジエチルエーテルで麻酔後、頸椎脱臼を行った。CD1の回腸側末端から約20cmを切除し腸管内をゾンデとシリンジを用いてPBSで洗浄した。小腸組織を切断した後、縦切開を行って小腸組織内部を表向きにした状態で、セルスクレーパーで小腸組織に沿って端から端まで絨毛を除去後、PBSで洗浄した。組織を3mM EDTAに室温、30minで反応させた。その後、HBSSに小腸組織を移し、チューブを振盪して小腸組織から陰窩を単離した。単離した陰窩をPBSにて洗浄後、事前に冷やしておいた無血清培地とマトリゲルを同量でよく懸濁して、培養皿に播種した。37℃、30分で重合させ、その後無血清培地を加えた。

② オルガノイド培養法によって単離したマウス小腸陰窩は、培養皿に播種した直後は円筒状であったが約3時間以内に円形を成した。時間経過とともに円形状の陰窩は大きく成

長していき3日目に陰窩様形態が出芽した。さらに陰窩様形態は次々に出芽していき、全体が大きくなって成長していった。7日までに正常小腸組織に類似した陰窩・絨毛構造を持つオルガノイドに成長し、細胞内顆粒をもつパネト細胞が陰窩様形態基部にみられ、中央部分には大きな内腔が存在した(図3)。

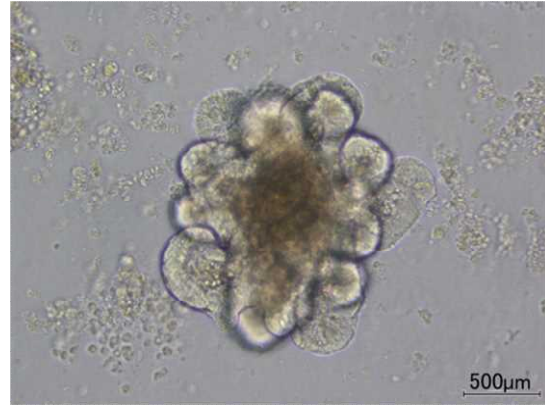


図3、小腸オルガノイド(7日目)

7日毎に継代を行い続け、長期経過していくうちに陰窩様形態は丸みを帯び始め、最長60日まで陰窩様形態を保持した。

③ 得られた培養オルガノイドが小腸上皮細胞マーカーを発現し、その局在が正常組織と同様であるか、また陰窩様形態基部に見られるパネト細胞質が α ディフェンシンを発現しているのかを確認するために、培養開始から19日目のオルガノイドを用いてホルマウント免疫染色を行った。上皮細胞マーカーであるE-Cadherinがオルガノイドを構成する全ての細胞膜表面に発現していた(図4)。

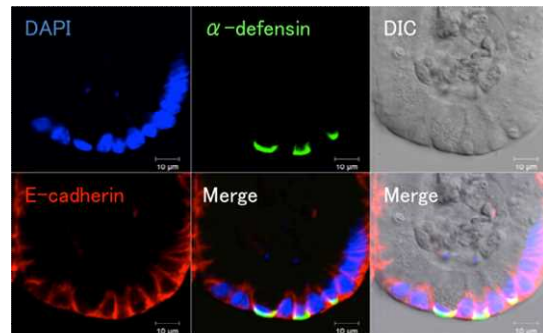


図4、小腸オルガノイドの蛍光免疫染色

したがって、培養オルガノイドは上皮細胞で構成され、パネト細胞の細胞内に α ディフェンシンの発現が見られた。このことより、培養オルガノイドはパネト細胞を含む小腸上皮細胞により構成されていることが示された。

今後、小腸オルガノイド培養法で得られたオルガノイドが、正常小腸上皮細胞の機能を保持しているのかをパネト細胞の顆粒分泌機能に焦点を置いて検討した上で、小腸オルガノイドと α ディフェンシン定量法とを組み合わせて、腸管での自然免疫系と口腔常在

菌とのクロストークを解明することが可能となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

- ① Tanaka M, Kuribayashi K, Kogawa K, **Nakamura K**, Watanabe N. Intracellular superoxide dismutase activity defines invasiveness of the murine T-lymphoma cell line L5187Y-ML25 in vitro and in vivo. *Leuk Res.* 2013; 37(1):89-92. 査読(有)。
- ② Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, Shimoji S, **Nakamura K**, Uryu H, Shimoda S, Iwasaki H, Shimono N, Ayabe T, Akashi K, Teshima T. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of α -defensins. *Blood.* 2012; 120(1):223-31. 査読(有)
- ③ **Nakamura K**, Ayabe T. Paneth cells and stem cells in the intestinal stem cell niche and their association with inflammatory bowel disease. *Inflammation Regeneration.* 2012; 32, 53-60. 査読(有)。
- ④ 綾部時芳、中村公則. 腸内環境を制御するPaneth細胞 α ディフェンシン. 臨床免疫・アレルギー科, 科学評論社, 57(1), 25-31(2012). 査読(無)。
- ⑤ Masuda K, **Nakamura K**, Yoshioka S, Fukaya R, Sakai N, Ayabe T. Regulation of microbiota by antimicrobial peptides in the gut. *Adv Otorhinolaryngol.* 2011; 72:97-9. 査読(無)。
- ⑥ Kawashima R, Abei M, Fukuda K, **Nakamura K**, Murata T, Wakayama M, Seo E, Hasegawa N, Mizuguchi H, Obata Y, Hyodo I, Hamada H, Yokoyama KK. EpCAM- and EGFR-targeted selective gene therapy for biliary cancers using Z33-fiber-modified adenovirus. *Int J Cancer.* 2011; 129(5):1244-53. 査読(有)。
- ⑦ Takahashi S, Kato K, **Nakamura K**, Nakano R, Kubota K, Hamada H. Neural cell adhesion molecule 2 as a target molecule for prostate and breast cancer gene therapy. *Cancer Sci.* 2011; 102(4):808-14. 査読(有)。
- ⑧ Masuda K, Sakai N, **Nakamura K**, Yoshioka S, Ayabe T. Bactericidal activity of mouse α -defensin cryptdin-4 predominantly affects noncommensal bacteria. *J Innate Immun.*

2011; 3(3):315-26. 査読(有)。

- ⑨ 中村公則、綾部時芳. α ディフェンシンによる腸内細菌制御. 実験医学, 羊土社, 29(18), 2955-2961(2011). 査読(無)。

〔学会発表〕(計1件)

- ① **Nakamura K**. Deficiency of secreted cryptdin-4 detected in a mouse model of Crohn's disease using a new sandwich ELISA. Experimental Biology 2012、2012 April 25、San Diego Convention Center (USA)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lfsci.hokudai.ac.jp/labs/inf/sig/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 公則 (NAKAMURA KIMINORI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究所・助教

研究者番号：80381276

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし