

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09398

研究課題名(和文)腸管内の食事細菌抗原のペプチドトランスポーターによる吸収を標的とした腸炎制御

研究課題名(英文) PEPT1 ENHANCED BACTERIAL PEPTIDE TRANSPORT INTO INFLAMED COLONIC EPITHELIUM AND INDUCES NEUTROPHIL RECRUITMENT

研究代表者

渡邊 知佳子 (WATANABE, CHIKAKO)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・内科学・講師)

研究者番号：90365263

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)：腸管炎症において、原因となる食物や細菌の分解産物のペプチドが、腸管内腔から門戸である腸上皮細胞層をいかに通過するのか、直接観察の報告は少ない。ペプチド輸送体は、非炎症時の大腸にはないが、炎症性腸疾患患者の大腸に発現し、病態への関与が推測される。今回はマウスを用いて、腸管内腔に投与した細菌由来ペプチドが腸上皮細胞のペプチド輸送体を介して上皮細胞内に取り込まれ、炎症の本態である炎症担当細胞の遊走の亢進に関与する様子を生体顕微鏡を用いて観察した。さらに、腸上皮細胞内のインフラマソームNLRP3を介する炎症性サイトカインIL1bの活性化がメカニズムのひとつであることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸炎において、腸管内腔の炎症の原因物質(細胞分解産物など)を腸上皮細胞内に取り込む細胞内ルートの門戸を制御することは、腸炎の新規治療のターゲット候補と成り得る。今回は炎症時にのみ大腸の粘膜上皮細胞に発現するペプチド輸送体に着目し、これが細胞内ルートの門戸である可能性についてin vivo観察し、さらに好中球遊走に関与していることから、ペプチド輸送体が腸管炎症の病態に関与していることを示した。

研究成果の概要(英文)：Peptide transporter (PEPT) 1, a transporter responsible for peptide absorption, is mainly expressed in the small intestine. Recently it has been reported the expression is upregulated in the inflamed colon, possibly contributing to the development of inflammatory bowel disease by transporting bacterial or food derived peptides. However, there is no direct evidence how PEPT1 is involved in neutrophil recruitment to colonic microcirculation in the inflamed colon. The aim of this study is to investigate the dynamic process in vivo how PEPT1-mediated bacterial derived peptide transport affects neutrophil trafficking in the inflamed murine colonic mucosa.

PEPT1 expression in the inflamed colonic epithelium facilitated bacterial derived peptide uptake, and dramatically enhanced neutrophil trafficking to the colonic mucosa, in which IL1 and NLRP3 were possibly involved.

研究分野：腸管免疫

キーワード：ペプチド 輸送体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

炎症は、有害な抗原を免疫機構が排除しようとする際の生体反応であり、免疫担当細胞が多数、炎症局所へ遊走・集積する現象として観察される。多くの腸管炎症では腸内細菌や食事由来の抗原をトリガーとして炎症が誘導され、細菌分解産物や食物由来抗原が腸管内腔から粘膜内に取り込まれる上皮細胞層の門戸は、細胞間隙と細胞内が想定される。しかし、腸管内の微生物や食事抗原の質量は細胞間隙より大きく、慢性腸炎においては、炎症によって惹起された細胞内ルートによって、管腔内から腸粘膜内に抗原ペプチドが輸送されて持続的炎症がおきている可能性が考えられ、その細胞内ルートと制御メカニズムの解明は、慢性炎症を制御する新規治療のターゲット候補となる可能性がある。たとえば、小麦蛋白グルテンによる自己免疫疾患セリアック病では、活動期にはグルテン分解産物を腸管内腔から取り込むトランスフェリン受容体が腸上皮細胞に発現することが報告され、新規治療のターゲット候補となった。

今回我々は、ペプチドトランスポーター(PEPT1)に着目した。PEPT1は通常は小腸で栄養素(ペプチド)の吸収を担っており、大腸での発現はほとんどみられないが、ヒト炎症性腸疾患で発現することが報告されている。腸内細菌由来ペプチドがPEPT1の基質となりうることが *in vitro* で報告され、炎症性腸疾患の病態への関与も示唆されるが、実態は不明であり、本研究では、その基礎的検討を加えることとした。

### 2. 研究の目的

大腸炎の本態は、炎症担当細胞の大腸粘膜微小血管へのリクルートメントとされるが、PEPT1の炎症細胞リクルートメントにおける直接的観察はこれまでに報告がない。今回は multi-photon 共焦点レーザー顕微鏡を用いて *in vivo* 観察をおこなった。さらにPEPT1機能を阻害して、炎症サイトカイン産生と好中球遊走に関するパラメーターの変化を比較し、腸管内からの腸内細菌関連ペプチドの腸上皮細胞内輸送による炎症メカニズムについて解析、腸管炎症の治療への応用の可能性について、基礎的検討を加えた。

### 3. 研究の方法

C57BL6 マウスを用いた。一部のマウスに LPS を腹腔内投与して炎症を惹起したのち大腸を採集し、PEPT1 の発現とその部位を評価し(免疫染色・ウェスタンブロット法) コントロール(非炎症時)と比較した。

細菌由来ペプチド MDP を腸管内腔に直接投与した。蛍光標識して投与し、PEPT1 と相互作用して腸管内腔より上皮細胞内へ取り込まれる様子を、multi-photon レーザー顕微鏡を用いてリアルタイムに *in vivo* で観察した。

大腸内に MDP を投与し、炎症性サイトカインの産生について、RT-PCR/ELISA 法で測定した。また PEPT1 の機能を阻害し、各サイトカイン産生への影響を比較した。

PEPT1 を介する炎症性サイトカイン産生に関する細胞内の免疫応答システムとして、インフラマソームに着目し、MDP 投与/PEPT1 阻害によりどのように変化するのか、比較した(RT-PCR/ウェスタンブロット法)。

大腸内に MDP を投与して引き起こされる炎症担当細胞、とくに好中球の遊走の様子を生体顕微鏡を用いて生態観察した。好中球の遊走における PEPT1 の関与について、PEPT1 の競合的阻害によって比較評価した。

### 4. 研究成果

非炎症時の大腸には PEPT1 の発現はほとんどみられなかったが、LPS 腹腔内投与し炎症を惹起すると、大腸に PEPT1 の発現が確認された。免疫組織染色で、大腸粘膜上皮細胞の刷子縁側に発現がみられた。

細菌由来ペプチド MDP を蛍光標識し腸管内腔へ直接投与し、大腸粘膜刷子縁に発現した PEPT1 がその MDP を摂取している様子を multi-photon レーザー顕微鏡で観察した。

大腸に細菌由来ペプチド MDP を腸管内に還流すると、LPS 投与し PEPT1 の発現を惹起した大腸粘膜では、炎症性サイトカイン(IL1b, TNF)の産生が亢進した。特に、IL1b は灌流する MDP の濃度依存的に発現が亢進し、PEPT1 の競合的阻害によってその発現上昇が阻害された。なお、非炎症大腸粘膜においては、MDP を還流しても炎症性サイトカインの発現は有意には亢進しなかった。

IL1b の産生に重要な、細菌由来の成分を認識して細胞質で働くパターン認識受容体(Nod like receptors) ファミリーの NLRP3 の発現に着目した。LPS 投与して PEPT1 の発現を惹起した大腸に細菌由来ペプチド MDP を腸管内に還流すると、NLRP3 の発現が亢進した。

炎症細胞(好中球)の腸管粘膜へのリクルートメントを生体顕微鏡で観察し、好中球から放

出されるミエロペルオキシダーゼ塩素化活性 (MPO activity) を測定した。LPS 投与により好中球の大腸粘膜へのリクルートメントが誘導され、腸管内腔に MDP を還流すると、さらに好中球のリクルートメントが上昇した。PEPT1 の競合的阻害によって MDP 灌流で上昇した好中球リクルートメントが阻害された。

PEPT 輸送体は、マクロファージにも発現していることが知られている。クロドロン酸(マクロファージをアポトーシスさせるビスフォスフォネート)を内包したリポソームを予め投与して、マクロファージ枯渇状態の大腸粘膜において、同様の検討をおこなった。結果、LPS 投与により PEPT1 の発現を誘導した大腸粘膜における NLRP3-IL1b の発現亢進、好中球リクルートメントを反映した MPO activity の上昇がむしろ顕著で、この現象は PEPT1 の競合的阻害によって阻害された。

以上より、LPS 投与により大腸上皮細胞の刷子縁に発現が誘導された PEPT1 は大腸粘膜において内腔から上皮細胞内へ細菌由来ペプチド MDP を輸送し、好中球のリクルートメント亢進に関与していること、また、上皮細胞内の NLRP3 を介した IL1b の産生亢進がこの現象に関与している可能性が示された。

今後は、ヒト炎症性腸疾患における検体を用いて、PEPT1 の発現と細胞由来抗原の取り込みと炎症惹起への関与について解析をすすめる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maruta K, Watanabe C, Hozumi H, Kurihara C, Furuhashi H, Takajo T, Okada Y, Shirakabe K, Higashiyama M, Komoto S, Tomita K, Nagao S, Ishizuka T, Miura S, Hokari R	4. 巻 104
2. 論文標題 Nicotine treatment ameliorates DSS-induced colitis by suppressing MAdCAM-1 expression and leukocyte recruitment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Leukoc Biol.	6. 最初と最後の頁 1013-1022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/JLB.3A0717-304R	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Chikako Watanabe, Kenichi Inaba, et al
2. 発表標題 PEPT1 ENHANCED BACTERIAL PEPTIDE TRANSPORT INTO LPS-TREATED COLONIC EPITHELIUM AND INDUCES NEUTROPHIL RECRUITMENT
3. 学会等名 米国消化器病学会 DDW2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenichi Inaba, Chikako Watanabe, et al
2. 発表標題 Increased Basophil recruitment to the colon of UC patients and oxazolone-induced mice colitis
3. 学会等名 米国消化器病学会 DDW2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chikako Watanabe, Soihiro Miura, Ryota Hokari
2. 発表標題 UPREGULATION OF PEPT1 AND BACTERIAL DERIVED PEPTIDES TRANSPORT MAY ENHANCE THE NEUTROPHIL TRAFFICKING IN LPSINDUCED COLONIC INFLAMMATION
3. 学会等名 DDW 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chikako Watanabe, Soihiro Miura, Ryota Hokari
2. 発表標題 PEPT1 facilitates bacterial derived peptide transport into LPS-treated colonic epithelium and induces neutrophil recruitment
3. 学会等名 DDW 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koji Maruta, Chikako Watanabe, Soichiro Miura, Ryota Hokari
2. 発表標題 Nicotine Ameliorates Colonic Inflammation via Inhibition of Leukocyte Interaction to Colonic Microvessels and Down-Regulation of MAdCAM-1
3. 学会等名 D D W 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 総編集 佐々木裕	4. 発行年 2017年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 323
3. 書名 プリンシプル 消化器疾患の臨床2	

1. 著者名 佐々木裕、木下芳一、下瀬川徹、渡辺 守	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 480
3. 書名 最新ガイドライン準拠消化器疾患 診断・治療指針	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----