

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19780104

研究課題名（和文） 腸管の恒常性の破綻機構の解明と食品成分によるその制御

研究課題名（英文） Mechanisms of a failure in the intestinal homeostasis and its regulation by food

研究代表者

高橋 恭子（TAKAHASHI KYOKO）

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：70366574

研究成果の概要：腸管の恒常性の破綻に関与する過程として、腸管上皮細胞の腸内共生菌に対する過剰応答、マスト細胞の活性化の2つに着目した。前者に関しては、微生物菌体の認識に関わる分子の腸管上皮細胞特異的な転写制御機構の一端を明らかにし、後者についてはマスト細胞のアレルギー応答が菌体成分を認識する受容体の1つである Toll like receptor 2 を介した刺激により抑制されることを示した。これらは、腸管の恒常性の破綻を食品成分により抑制するための標的として有用である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：食品免疫学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：腸管上皮細胞、マスト細胞、腸内細菌

## 1. 研究開始当初の背景

腸管には、生体で最大の免疫系が存在する。腸管免疫系は、食餌成分、腸内共生菌、病原性微生物を正確に認識して、生体に有益なものに対しては攻撃・排除せず、生体に有害なもののみを攻撃する巧妙な機構を保持している。この恒常性が何らかの理由で破綻すると、過剰な炎症反応が引き起こされ、食物アレルギーや炎症性腸疾患など様々な疾患につながる事となる。腸管の免疫系の恒常性

の維持機構、およびその破綻から罹患へと至る過程を解明し、その制御方法を見出すことは、これらの疾患に対する治療・予防へ応用できることが期待できる。

本研究では、腸管の恒常性の破綻から罹患に至る様々な過程のうち、まず、1つは、炎症性腸疾患において腸内細菌に対する上皮細胞の過剰な応答が観察されるケースが多いことから、腸管上皮細胞(IEC)の腸内細菌に対する応答性に着目した。腸管上皮において

は、菌体成分を認識する受容体である Toll-like receptor (TLR)の発現が低いこと、また、TLR からのシグナルを負に制御する分子である Toll-interacting protein(Tollip)の発現が亢進していることが報告されており、IEC が腸内共生細菌に対して過剰に応答することなく、恒常性を維持するための1つの機構として機能していると考えられている。これらの分子の発現は、IEC においては単球など他の種類の細胞とは異なる特有の機構で制御されていると考えられるが、その機構は明らかにされていない。

また、腸管の恒常性の破綻に関与するもう1つの過程として、マスト細胞の活性化に着目した。アレルギーの責任細胞として広く知られているマスト細胞は、主に外界と接する粘膜や皮膚に存在し、本来は、自然免疫応答を誘導することにより、生体防御の役目を果たしている。腸管に存在するマスト細胞も、口から侵入してくる病原菌等に対する防御機能を担っているが、その一方で、食物や腸内細菌といった抗原に対しては過剰に反応しないような機構が備わっていると考えられる。しかし、食物アレルギーや炎症性腸疾患においては、何らかの理由でこの恒常性が崩れ、これらの抗原に対するマスト細胞の過剰な応答が観察される。食物アレルギーや炎症性腸疾患の病変部では、実際にマスト細胞数の増加が認められ、マスト細胞が、症状へ直結する腸管上皮の透過性の亢進等を誘導して病態形成に関与していることが知られている。

## 2. 研究の目的

本研究は、腸管の恒常性の破綻から罹患に至る様々な過程のうち、(1) 腸内共生細菌に対する腸管上皮細胞の過剰応答、(2) マスト細胞の活性化の2つの過程の分子機構を解明することを目的とする。さらに、その制御方法を開発することを目指し、特に、食品成分による制御方法の開発を主な目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 腸内共生細菌に対する腸管上皮細胞の過剰応答の制御

まず、ヒト IEC 株および単球株における TLR2、TLR4、Tollip の mRNA および細胞内外のタンパクの発現、遺伝子の5'領域の転写活性化能をそれぞれ定量 PCR、免疫沈降、

FACS、レポーターアッセイにより測定した。その結果、転写レベルでの制御が重要であることが明らかになった TLR4、Tollip 遺伝子について、レポーターアッセイにより、5'領域の転写制御エレメントを IEC 株および単球株で比較した。細胞株より調製した核抽出物を用いたゲルシフトアッセイ等により、同定した転写制御エレメントを介した IEC 株に特異的な転写制御機構についての詳細な解析を行った。

## (2) マスト細胞の活性化の制御

IEC 株とマスト細胞の *in vitro* 共培養系を用い、IgE/抗原、菌体成分を添加してマスト細胞を刺激し、透過性の変化を TER(transsepithelial electrical resistance)を指標として経時的に測定した。一方、ラット好塩基球性白血病株 RBL-2H3 及びマウス骨髄由来培養マスト細胞(BMMC)を用い、*in vitro* において *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCM 7041(Bp)菌体超音波破砕物、Bp 由来菌体成分、合成 TLR2 リガンド Pam3CSK4 が IgE 及び抗原刺激時の脱顆粒、アラキドン酸代謝産物の産生、炎症性サイトカインや Th2 サイトカインの産生にどのように作用するかを解析した。さらに、マスト細胞が誘導する *in vivo* での血管透過性の亢進に及ぼす影響を評価した。また、細胞内シグナル分子の活性化に及ぼす影響をウェスタンブロッティングにより解析した。

## 4. 研究成果

(1) 腸内共生細菌に対する腸管上皮細胞の過剰応答の制御

TLR2 及び TLR4 リガンド刺激による IEC 株の IL-8 産生量は、細胞表面上の各 TLR の発現量に依存し、TLR2 では主に翻訳後レベルで、TLR4 では主に転写レベルで決定されることが示された。さらに、TLR4 遺伝子の転写レベルでの発現制御に関わる IEC 特異的な転写抑制エレメント及びこのエレメントに結合する核因子の存在が示唆された。また、IEC 株においては5'領域の DNA メチル化とヒストン脱アセチル化により、TLR4 遺伝子の転写が抑制され、LPS に対する応答性が低く保たれることが明らかとなった。一方、TLR からのシグナルを負に制御する Tollip をコードする遺伝子の5'領域の転写活性化能は単球株より IEC 株で強く、単球と IEC における転写制御には異なる核因子が関

与していた。また、5'領域中の転写制御に重要な配列に結合する転写因子の1つとして Elf-1 を同定した。Elf-1 はヒト単球株では Tollip 遺伝子の転写を抑制したが、IEC 株では抑制作用を示さなかった。

これらの菌体認識に関わる分子の IEC 特異的な制御機構が腸内細菌との共生の維持、そしてアレルギーの制御等に関与する可能性が考えられる。

#### (2) マスト細胞の活性化の制御

マスト細胞のIgE/抗原刺激による活性化が IEC の透過性亢進を誘導することを *in vitro* にて確認した。脱顆粒の程度と透過性亢進の度合いは相関しており、マスト細胞の脱顆粒により放出される成分が透過性の亢進を誘導すると考えられた。また、マスト細胞の活性化に必須のFcεRI鎖の発現を協調的に活性化する転写因子を同定した。

Bp菌体あるいはPam3CSK4 による前処理によりRBL-2H3 及びBMMCのIgE/抗原刺激時の脱顆粒が抑制された。Pam3CSK4 はRBL-2H3 細胞のロイコトリエンC<sub>4</sub>、IL-13、TNFα の産生も抑制した。一方、MyD88<sup>-/-</sup>BMMCでは、Bpによる抑制効果は部分的にのみ認められ、Pam3CSK4 による抑制効果は認められなかった。したがって、Bpによる抑制効果の一部がTLR2 依存的事であることが明らかとなった。さらに、Pam3CSK4 はマスト細胞が誘導する *in vivo* における血管透過性の亢進をMyD88 依存的に抑制した。また、Pam3CSK4 処理により、IgE/抗原刺激時の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇、Erkの活性化の抑制が観察された。

以上の結果から、特定の腸内細菌あるいはプロバイオティクスが TLR2 を介してマスト細胞のアレルギー応答を調節する可能性が示された。

#### 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6件)

- ① Kasakura K, Takahashi K, Aizawa T, Hosono A, and Kaminogawa S. A TLR2 ligand suppresses allergic inflammatory reactions by acting directly on mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* in press (査読有)
- ② Tsuda M, Hosono A, Yanagibashi T, Hachimura S, Hirayama K, Umesaki Y, Itoh K, Takahashi K, and Kaminogawa S. Intestinal Bifidobacterium association in germ-free T cell receptor transgenic mice down-regulates dietary antigen-specific

immune responses of the small intestine but enhances those of the large intestine.

*Immunobiology* 214:279-289, 2009.

(査読有)

- ③ Yanagibashi T, Hosono A, Oyama A, Tsuda M, Hachimura S, Takahashi Y, Itoh K, Hirayama K, Takahashi K, and Kaminogawa S. Bacteroides induce higher IgA production than Lactobacillus by increasing activation-induced cytidine deaminase expression on B cells in murine Peyer's patches. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:372-377, 2009. (査読有)
- ④ Takahashi K, Hayashi N, Shimokawa T, Umehara N, Kaminogawa S, and Ra C. Cooperative regulation of Fcγ gene expression by multiple transcription factors including Sp1, GABP and Elf-1. *J. Biol. Chem.* 283:15134-15141, 2008. (査読有)
- ⑤ Hiramatsu Y, Hosono A, Takahashi K, and Kaminogawa S. Bifidobacterium components have immunomodulatory characteristics dependant on the method of preparation. *Cytotechnology* 55:79-87, 2007. (査読有)
- ⑥ Tsuda M, Hosono A, Yanagibashi T, Hachimura S, Hirayama K, Itoh K, Takahashi K, and Kaminogawa S. Prior stimulation of antigen-presenting cells with Lactobacillus regulates excessive antigen-specific cytokine responses *in vitro* when compared with Bacteroides. *Cytotechnology* 55: 89-101, 2007. (査読有)

[学会発表] (計20件)

- ① 笠倉和巳、高橋恭子、細野朗、上野川修一「マスト細胞のアレルギー応答のTLR2依存的な抑制」日本農芸化学会2009年度大会 2009年3月29日 福岡国際会議場(福岡)
- ② 杉由高、高橋恭子、細野朗、上野川修一「腸管上皮細胞におけるTollip遺伝子の発現制御機構」日本農芸化学会 2009 年度大会 2009年3月29日 福岡国際会議場(福岡)
- ③ 國井潤一、高橋恭子、笠倉和巳、細野朗、上野川修一「腸内細菌がマスト細胞の最終分化に及ぼす影響」日本農芸化学会2009年度大会 2009年3月29日 福岡国際会議場(福岡)
- ④ Kasakura K, Takahashi K, Hosono A, Kaminogawa S. Suppressive effects of TLR2 ligands on allergic reactions of mast cells. 日

本免疫学会第38回学術集会 2008年12月3日 国立京都国際会館(京都)

- ⑤ Takahashi K, Sugi Y, Hosono A, and Kaminogawa S. Regulatory mechanisms of TLR4 gene transcription in intestinal epithelial cells. 日本免疫学会第 38 回学術集会 2008 年 12 月 2 日 国立京都国際会館(京都)
- ⑥ Sugi Y, Takahashi K, Hosono A, and Kaminogawa S. IEC-specific regulation of Tollip gene expression. 日本免疫学会第 38 回学術集会 2008 年 12 月 2 日 国立京都国際会館(京都)
- ⑦ 杉由高、高橋恭子、細野朗、上野川修一「腸管上皮細胞におけるTollip遺伝子の発現制御機構」第 11 回腸内細菌学会 2008 年 6 月 12 日 東京大学弥生講堂(東京)
- ⑧ 笠倉和巳、高橋恭子、細野朗、上野川修一「TLR2リガンドによるマスト細胞のアレルギー応答の抑制」日本食品免疫学会 2008年度大会 2008年5月13日 駒場エミナース(東京)
- ⑨ 杉由高、高橋恭子、細野朗、上野川修一「腸管上皮細胞におけるTollip遺伝子の発現制御機構」日本農芸化学会 2008 年度大会 2008 年 3 月 28 日 名城大学天白キャンパス(名古屋)
- ⑩ 笠倉和巳、高橋恭子、細野朗、上野川修一「TLR2 を介したマスト細胞のアレルギー応答の抑制とその機序」日本農芸化学会 2008 年度大会 2008 年 3 月 28 日 名城大学天白キャンパス(名古屋)
- ⑪ 柳橋努、細野朗、津田真人、八村敏志、高橋宜聖、平山和弘、伊藤喜久治、高橋恭子、上野川修一「腸内細菌は小腸におけるIgA産生より大腸におけるそれに強く影響する」日本農芸化学会 2008 年度大会 2008 年 3 月 28 日 名城大学天白キャンパス(名古屋)
- ⑫ 津田真人、細野朗、柳橋努、八村敏志、平山和弘、伊藤喜久治、高橋恭子、上野川修一「腸内細菌はパイエル板細胞の経口抗原に対するサイトカイン産生の抑制と制御性T細胞の発現を誘導する」日本農芸化学会 2008 年度大会 2008 年 3 月 28 日 名城大学天白キャンパス(名古屋)
- ⑬ Takahashi K, Hosono A, Kaminogawa S. Regulation of TLR gene expression in intestinal epithelial cells. 日本免疫学会第 37 回学術集会 2007 年 11 月 21 日 グランドプリンスホテル新高輪(東京)
- ⑭ Harata G, Takahashi K, He F, Kubota A, Hosono A, Kaminogawa S. Direct effects of *Lactobacillus* GG and *L. gasseri* TMC0356 on

mast cells. 日本免疫学会第 37 回学術集会 2007 年 11 月 21 日 グランドプリンスホテル新高輪(東京)

- ⑮ Harata G, He F, Kawase M, Kubota A, Hiramatsu M, Hosono A, Takahashi K, Kaminogawa S. Differentiated implication of *Lactobacillus* GG and *L. gasseri* TMC0356 on gut-associated immune lymphoid tissues. The 4th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria. 2007 年 10 月 14 日 Shanghai Everbright Convention & Exhibition Centre International Hotel (China)
- ⑯ Tsuda M, Hosono A, Yanagibashi T, Hachimura S, Hirayama K, Itoh K, Takahashi K, Kaminogawa S. Murine intestinal commensal *Lactobacillus* modulates antigen-specific cytokine production via antigen-presenting cells differently to *Bacteroides*. 13th International Congress of Mucosal Immunology 2007年7月11日 品川プリンスホテル(東京)
- ⑰ Yanagibashi T, Hosono A, Tsuda M, Hachimura S, Takahashi Y, Hirayama K, Itoh K, Takahashi K, Kaminogawa S. *Bacteroides acidofaciens* induces differentiation of IgM+ cells into IgA-plasma cells from the large intestine. 13th International Congress of Mucosal Immunology 2007年7月11日 品川プリンスホテル(東京)
- ⑱ 相澤奉文、高橋恭子、笠倉和巳、細野朗、上野川修一「腸内細菌由来菌体成分によるマスト細胞のアレルギー応答の調節」日本動物細胞工学会2007年度大会 2007年7月4日 高崎シティギャラリー(高崎)
- ⑲ 平松靖浩、細野朗、高橋恭子、上野川修一「処理条件の異なる*Bifidobacterium* 菌体調製物とその免疫修飾作用の相関について」日本動物細胞工学会2007年度大会 2007年7月4日 高崎シティギャラリー(高崎)
- ⑳ 平松靖浩、細野朗、高橋恭子、上野川修一「調製法の異なる*Bifidobacterium*菌体成分が修飾する免疫応答の特徴」第11回腸内細菌学会 2007年6月14日 北里大学薬学部(東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 恭子(TAKAHASHI KYOKO)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：70366574