

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23859

研究課題名(和文)小腸貪食細胞が小腸管腔中へ伸長する樹状突起の新たな生理的役割の解明

研究課題名(英文)Identification of novel function for transepithelial dendrites in intestinal phagocytes

研究代表者

森田 直樹(MORITA, Naoki)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：80845107

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文):小腸に存在する免疫細胞の一種である貪食細胞は乳酸またはピルビン酸に反応して樹状突起を腸管管腔中へ伸長し管腔内の細菌を補足することがこれまでに報告されているが、樹状突起を介した他の機能に関してはほとんど解析がなされていない。私たちは小腸貪食細胞が分泌型Phospholipase A2分子ファミリーの1つである、Group IID secreted PLA2 (sPLA2-IIID)を特異的に高発現していること、またsPLA2-IIIDが小腸管腔中に多量に存在することを明らかにした。今後管腔中のsPLA2-IIIDの生理的役割をsPLA2-IIID分子欠損マウスを用いて解析する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで小腸上皮細胞のみが生理活性分子を腸管に直接的に分泌し、正常な腸管恒常性の維持に寄与するという概念に一石を投じる。本課題から小腸CX3CR1+貪食細胞も小腸上皮細胞同様に生理活性分子を小腸管腔中へ分泌することで正常な腸内細菌叢の維持や病原性細菌に対する感染防御に寄与するという、新たな腸管恒常性維持機構の解明が期待される。小腸CX3CR1+貪食細胞が小腸管腔中に分泌するsPLA2-IIIDの機能を解析することで、これまでとは異なる新たな腸内細菌叢の制御方法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文):A subset of small intestinal myeloid cells, characterized by high expression of CX3CR1, regulates intestinal homeostasis through unique function. CX3CR1+ cells and other types of intestinal myeloid cells extrude their dendrites into the lumen to take up antigens, thereby inducing commensal bacteria and pathogen specific immune responses. it remains unclear other function of transepithelial dendrites in CX3CR1+ phagocytes. we revealed that intestinal CX3CR1+ phagocytes highly and specifically expressed secretory phospholipase A2 IID (sPLA2IID) which belongs to secretory phospholipase family and there are high amount of sPLA2IID in the lumen of small intestine except cecum and large intestine. We are preparing sPLA2IID-deficient mouse for analyze physiological function of sPLA2IID.

研究分野：腸管免疫学

キーワード：腸管免疫 貪食細胞 腸内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管に存在する免疫細胞は、細胞特異的な機能を介して腸管恒常性の維持に寄与することが知られているが、その詳細なメカニズムに関しては不明な点が多い。小腸に存在する免疫細胞の一種である貪食細胞は乳酸またはピルビン酸に反応して樹状突起を腸管管腔中へ伸長し管腔内の細菌を補足することがこれまでに報告されている。この機能により管腔内の病原性微生物に対する免疫応答を、病原性微生物が宿主に侵入する前に誘導することが可能であると示唆されている。一方で貪食細胞が伸長する樹状突起の機能は小腸管腔中の抗原を補足すること以外は全く不明であることから、本研究では、小腸貪食細胞が小腸管腔中へ伸長する樹状突起の新たな生理的役割の解明を目的とする。本研究の知見は、将来的に貪食細胞の樹状突起伸長を介した新たな腸管免疫機能調節薬剤の開発に応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

腸管粘膜固有層にはリンパ球やミエロイド系細胞を含む多くの免疫細胞が存在し、腸管恒常性の維持に寄与している。小腸ミエロイド系の細胞は(1) CD103⁺樹状細胞 (2) CX₃CR1⁻F4/80⁺古典的マクロファージ (3) CX₃CR1⁺貪食細胞に大きく大別される。とりわけ CX₃CR1⁺貪食細胞は古典的なマクロファージ同様な分化経路を持つものの、古典的マクロファージとは異なり、独特な機能を持つユニークな細胞集団である。小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞は抗炎症性サイトカインの一種である IL-10 を産生し制御性 T 細胞維持に寄与することが報告されている。(Usriansyah H et al. *Immunity*, 2011)。一方で、IL-23 を産生することで上皮細胞から抗菌ペプチドの産生を促し、病原性細菌に対する感染防御も制御している(Murai M et al. *Nat. Immunol.*, 2009)。また小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞は GPR31 分子依存的に腸管上皮間から樹状突起を腸管管腔中へ伸長し管腔中の細菌を捕捉することで病原性細菌に対する感染防御へ寄与することを申請者は報告してきた(Morita N et al. *Nature*, 2019)。この様に小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞は多くの生理活性分子を分泌すると同時に樹状突起を管腔中へ伸長することで腸管機能の維持に寄与すると考えられている。小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞は高い生理活性分子の分泌能と小腸管腔中への樹状突起伸長能を合わせ持つユニークな細胞集団である。このことから、これらの細胞集団が樹状突起を介して小腸管腔中へ直接的に生理活性分子を分泌し、管腔中の細菌に作用することで正常な腸内細菌叢の維持や病原性細菌に対する感染防御に寄与する可能性が考えられる。この仮説から本研究は小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞が小腸管腔中へ分泌する生理活性分子の同定とその生理的役割の解明を目的とする。

3. 研究の方法

マウスを用いて小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞が管腔中へ分泌する分子の同定を行う。小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞が高発現する分子を RNA-sequencing 法にて網羅的に解析する。この解析結果から小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞が高発現し、かつ細胞外へ分泌される標的分子のスクリーニングを行う。上記の結果で得られたターゲット分子が実際に小腸管腔中へ分泌されているかを分子に対する ELISA 法にて評価を行う。さらに樹上突起の伸長に必須の分子である *G-protein coupled receptor 31 (Gpr31)* 欠損マウスにおける腸管管腔中におけるターゲット分子の濃度を野生型マウスと比較検討を行う。

上記の方法で得られた候補分子を欠損したマウスの入手および作成を試みる。野生型またはノックアウトマウスの両群間で腸内細菌叢の変化や病原性細菌に対する感受性等を解析し、ターゲット分子の腸管恒常性維持および宿主防御における個体レベルでの役割を検討する。

小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞が管腔中へ分泌するターゲット分子の生理活性を明らかにする。分子が小腸管腔中に分泌されることから管腔中の腸内常在細菌または病原性細菌に影響を与える可能性が示唆される。そこで同定された分子を善玉菌として知られる *Lactobacillus* 属菌や悪玉菌の *Escherichia* 属菌および病原性細菌の *Citrobacter rodentium* 菌や *Listeria monocytogenes* 菌および *Salmonella typhimurium* 菌と共培養し、培養後の細菌増殖または mRNA 発現を非共培養群と比較検討する。この方法により生理活性が認められた分子をターゲット分子とする。

4. 研究成果

RNA-seq 等の解析から小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞が分泌型 Phospholipase A2 分子ファミリーの 1 つである、Group IID secreted PLA2 (sPLA2-IIID) を小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞が特異的に高発現していることを明らかにした(図 1)。また実際に小腸管腔中における sPLA2-IIID 量を ELISA 法にて確認すると、盲腸や大腸管腔中においては検出限度以下であったのに対して、小腸管腔中では多量に sPLA2-IIID が存在していることが確認された(図 2)。これらの結果から小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞の樹状突起伸長を介して sPLA2-IIID 分子が管腔中へと分泌されていることが示唆された。申請者は実際に小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞が樹状突起を介して sPLA2-IIID 分子を小腸管腔中へ伸長しているかを明らかにするために、樹状突起伸長誘導に必須の分子である *Gpr31* 遺伝子欠損マウスの小腸管腔中における sPLA2-IIID 濃度の

測定を行う予定である。また腸内細菌由来の乳酸およびピルビン酸は GPR31 分子を介して樹状突起の伸長を誘導することがこれまで報告されている。そこで乳酸およびピルビン酸をマウスに経口投与した際に、樹状突起の伸長の増加に伴い小腸管腔中の sPLA2-IIID 分子の分泌が増加するか上記同様に ELISA 法にて検討を行った。結果ピルビン酸をマウスに経口投与することで、小腸管腔中の sPLA2-IIID 分子の濃度が増加することにとどまらず、盲腸や大腸管腔中においても多量の sPLA2-IIID 分子が存在していることが確認された。

現在、分与頂いた sPLA2-IIID 分子欠損マウスのコロニー化を行っており、マウスの準備が出来次第に腸内細菌叢変化および病原性細菌に対する感受性の評価を行う予定である。

また sPLA2-IIID 分子が腸内細菌および病原性細菌に与える影響を分子レベルで解明するためにリコンビナントタンパクの作成を行っている。作成には大腸菌を用いた発現系を使用し、発現したリコンビナントタンパクの精誠を現在行っている。

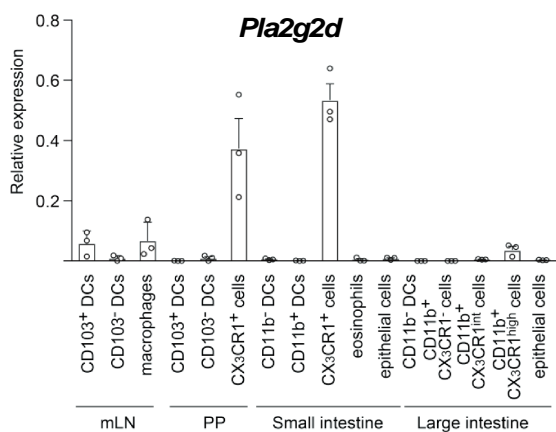


図 1:腸管組織より単離した各細胞ポピュレーションにおける *Pla2g2d* の発現を qPCR にて比較した。(発現量は GAPDH の発現でノーマライズした。)

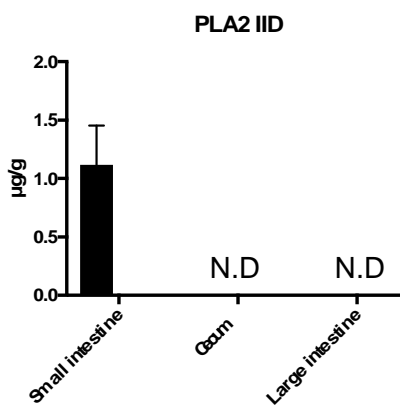


図 2:各腸管腸管管腔中における sPLA2 IID 分子の濃度を ELISA 法にて測定した。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Huynh Hung Hiep, Morita Naoki, Sakamoto Toshihiro, Katayama Takuya, Miyakawa Takuya, Tanokura Masaru, Chiba Yasunori, Shinkura Reiko, Maruyama Jun-ichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Functional production of human antibody by the filamentous fungus <i>Aspergillus oryzae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fungal Biology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40694-020-00098-w	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計3件

1. 著者名 森田 直樹, 竹田 潔	4. 発行年 2020年
2. 出版社 鳥居薬品株式会社	5. 総ページ数 3
3. 書名 感染 炎症 免疫	

1. 著者名 森田 直樹, 竹田 潔	4. 発行年 2020年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 7
3. 書名 消化器・肝臓内科	

1. 著者名 森田 直樹, 新藏 礼子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 消化器学サイエンス	

〔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
---------	---------