

機関番号：63905

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20599015

研究課題名 (和文) サルモネラ菌感染における腸管上皮バリア維持とサイトカインシグナルのクロストーク

研究課題名 (英文) Crosstalk between epithelial barrier function and cytokine signaling during salmonella infection

研究代表者

稲垣 匡子 (INAGAKI KYOKO)

生理学研究所・発達生理学研究室・特任助教

研究者番号：70363588

研究成果の概要 (和文)：腸管上皮細胞はジャンクション分子を介して結合し、細胞極性をもつ機能的な腸管上皮バリアを形成することで、生体防御の第一線の役割を担っている。本研究では腸管上皮間 T 細胞 (IEL) の腸管バリア機構と宿主免疫応答の制御機構における役割について解明することを目的とした。マウスサルモネラ感染および DSS 腸炎モデルにおいて IEL による自然免疫と獲得免疫の誘導の結果腸管防御免疫が成立し、腸管粘膜バリア保護に働くことを明らかにした。これらの結果は IEL が免疫的バリアのみならず機械的バリアを構築する細胞であることを示すものである。

研究成果の概要 (英文)：The intestinal epithelium has evolved structurally to form a barrier between the antigen-rich environment of the lumen and the sterile internal environment of the organism. In this study, we demonstrated that IEL has an important role in early protection against intestinal infection by *S. typhimurium* and DSS-induced colitis which the escape immediate early protection at the surface of intestinal epithelia. These results indicate that IEL play important multifunctional roles not only in protection of the epithelium against *S. typhimurium* or DSS-induced change by cytokine production but also in direct interaction with the epithelial barrier when intra-EC junctions are down-regulated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	0	1,500,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	570,000	3,970,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学

キーワード：(1)腸管上皮間 T 細胞 (2) 腸管上皮バリア (3)腸管寄生細菌(4)ジャンクション分子 (5) サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

腸管上皮細胞は、ジャンクション分子を介して結合することにより細胞極性をもつ機能的な上皮バリアを形成し、生体防御の第一線の役割を担っている。腸管感染性細菌は腸管上皮バリアを破壊し宿主の感染防御機構の破綻を引き起こす。したがって、腸管の上皮バリア構造と免疫機構の全貌解明は感染予防や病態制御を考える上で必須である。腸管上皮細胞間に T 細胞 (Intraepithelial T Lymphocytes: IEL) が存在するが、IELはこれまでそのサイトカイン産生能などから、上皮バリア機能を調節する制御細胞と考えられており、バリア構造の構成細胞としてはとらえられていなかった。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、腸管上皮間T細胞 (IEL) が、サイトカイン産生により上皮のバリア機能を調節する制御細胞のみならず、occludin やE-cadherinといった上皮細胞と同様なジャンクション分子を発現し上皮バリア構造の構成細胞として重要な役割を果たすことを見出した (Inagaki-Ohara et. al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005)。さらに腸管寄生原虫Eimeria感染においては、感染時の腸管上皮細胞におけるジャンクション分子の発現低下をIELがその発現を維持することで、腸管上皮バリア破綻を阻止しうることを報告した (Inagaki-Ohara et. al., Infect. Immune., 2006)。そこで本研究ではマウスのサルモネラ腸管感染モデルを用いて、消化管感染による上皮粘膜細胞間でのジャンクションおよびサイトカインシグナル伝達制御や両伝達機構のクロストークおよびその破綻、並びにその破綻を補償するIELの意義を検討することにより、腸管バリア機構と宿主免疫応答の

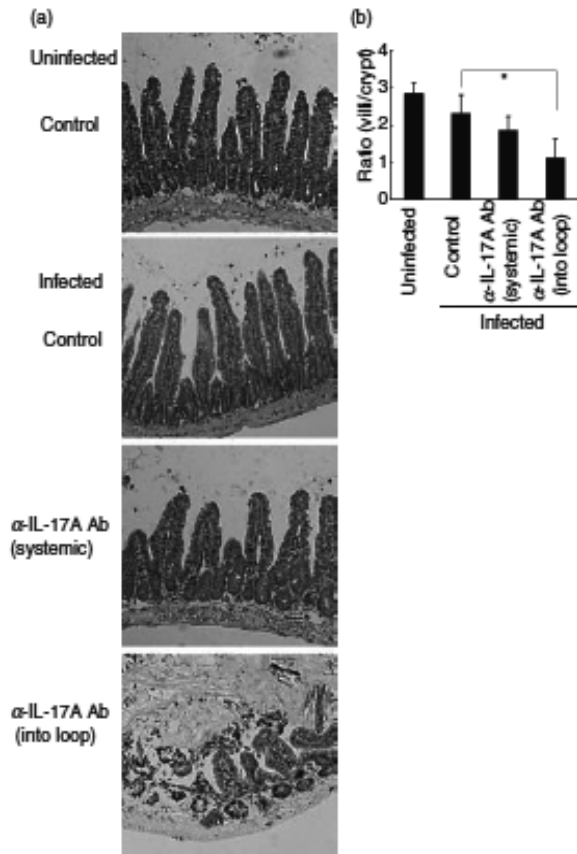
制御機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

サルモネラ感染モデルでは C57BL/6 マウスに、5% NaHCO₃を経口投与し胃酸を中和し 10 分後に 10⁹ CFU の *S. Typhimurium* を経口感染させた。腸炎モデルではマウスに recombinant Adrenomedullin 0.05μg を注腸投与した後、1.8% DSS を水に溶解し自由摂取させた。腸管の病理解析をヘマトキシリンエオジン法、抗菌ペプチドおよびサイトカインの発現を免疫染色法で調べた。細胞表面マーカー、細胞内シグナルの変動、サイトカイン産生について FACS、western blot、ELISA で調べた。腸管バリア機能については Transwell を用い上皮層の電気抵抗値 (TER) を測定した。サルモネラ菌の組織への侵入を詳細に調べるため、CFSE ラベル *S. Typhimurium* をループ結紮した腸管に感染させたのち、組織学的解析を行った。

4. 研究成果

サルモネラ感染実験では、腸管関連免疫組織では非感染状態には IL-17 の誘導する防御因子が準備されおり、侵入してきた菌に対して即時的に菌の増殖抑制に働くと推定された。抗 IL-17 抗体を投与した腸管では β-defensin 3 の発現が減少していた。サルモネラ感染により、管腔内に IL-17 が分泌し、IL-17 およびそれにより誘導される β-defensin 3 などの抗菌ペプチドの即時的防御、その後 IEL を含む細胞から産生される IFN-γ による自然免疫と獲得免疫が誘導され、腸管防御免疫が成立し腸管粘膜バリア保護に働くことを明らかにした (Mayuzumi et. al., 2010)。

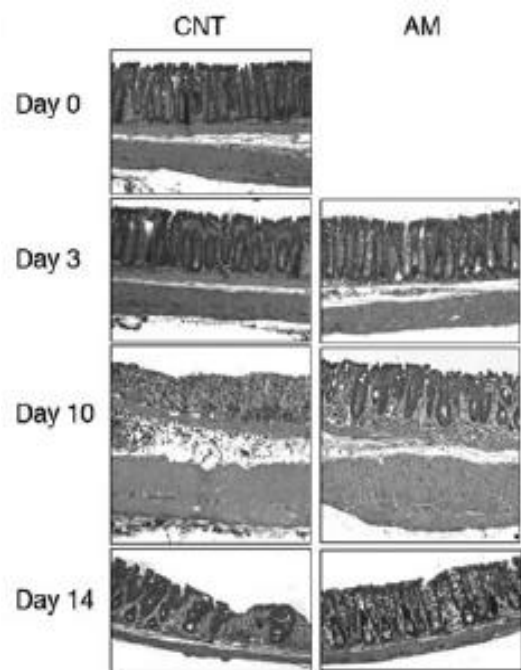


サルモネラ感染時の腸管組織傷害は抗 IL-17 抗体の全身投与により示され、腸管局所投与によりさらに増悪化する (a)。その組織像からクリプトと絨毛の長さの比を定量化した (b)。

(Mayuzumi et al., Immunology, 2010 から引用)。

本研究の過程において、抗菌ペプチドの腸管上皮恒常性における重要性が見出された。Adrenomedullin はヒト褐色細胞腫で発見され血管拡張作用を有する物質として注目されたが、その後の研究から、腸管はじめ様々な組織で産生され、細胞の遊走、分化制御、抗炎症作用を有することがわかってきた。そこで申請者は、Adrenomedullin の腸炎抑制作用について検討を行った。申請者はこれまでに $\gamma\delta$ 型 T 細胞を欠損する $C\delta^{-/-}$ マウスは元来 Th1 タイプを含む炎症性サイトカインを産生し腸炎を発症しやすいこと、その病態が小腸、大腸共に認められることをすでに報告して

いるが (Inagaki-Ohara, et al., J.Immunol., 2004)、本研究においてペプチドホルモンである Adrenomedullin が DSS 腸炎モデルにおいて抗菌活性を示しさらに $\gamma\delta$ 型 IEL 数を維持することにより炎症性サイトカイン産生およびそのシグナル (リン酸化 STAT1, STAT3) の抑制、さらに腸管上皮層 TER の増加と同時に DSS 投与によるジャンクション分子の発現の低下の阻止に働き、ジャンクション分子の発現を維持することにより、腸管バリア破壊抑制に働くことを見出した (Asizuka, et al., 2009)。



Adrenomedullin(AM)投与群では、対照群(CNT)に比べDSS 腸炎による組織破壊が少なく回復も速やかである (Asizuka, et al., Microbiol. Immunol. 2009 より引用)。

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 2 件)

1. Mayuzumi H., Inagaki-Ohara K., Uyttenhove C., Okamoto Y., Matsuzaki, G. Interleukin-17A is required to suppress invasion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to enteric mucosa. **Immunology** (2010) 131:377-385. (査読有)
2. Ashizuka S., Inagaki-Ohara K., Kuwasako K., Kato J., Inatsu H., Kitamura K. Adrenomedullin treatment reduces intestinal inflammation and maintains epithelial barrier function in dextran sulphate sodium-administered mice. **Microbiol. Immunol.** (2009). 53:573-581. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. Kyoko Inagaki-Ohara, Akihiko Yoshimura, Seiya Kato and Goro Matsuzaki
Loss of SOCS3 in gastrointestinal epithelial cells enhances leptin-mediated signaling and confers gastric cancer. (Gordon Research Conference, Oxford, UK, 2009)
2. Kyoko Inagaki-Ohara, Hirokazu Mayuzumi, Masayuki Umemura, Goro Matsuzaki.
Lack of T cells bearing TCR $\gamma\delta$ results in reduction of junctional molecules in small intestine, enhancement of susceptibility to enteric protozoan infection (Keystone Symposia, Colorado, US, 2008)
3. 黛宏和、稲垣匡子、梅村正幸、田中健照、浜田聡、岡本祐子、松崎吾朗
Salmonella enterica serovar Typhimurium の腸管感染による誘導される腸管 T 細胞のサイトカイン発現の解析 (日本細菌学会九州

支部総会、2008 年)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣匡子 (INAGAKI KYOKO)
生理学研究所・発達生理学研究室・
特任助教
研究者番号：70363588

(2) 研究分担者

松崎吾朗 (MATSUZAKI GORO)
琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授
研究者番号：30229455

