

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16276

研究課題名(和文)小腸貪食細胞が腸管腔中へ分泌する生理活性分子の探索及び生理的役割の解明

研究課題名(英文) Searching and understanding of physiological function of secreted molecule(s) from CX3CR1+ phagocyte

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：正常な腸内細菌叢は様々な環境因子や宿主細胞由来の分泌性分子によって、制御を受けている。申請者は小腸腸管に存在する貪食細胞の一種であるCX3CR1+細胞が分泌型PLA2G2D分子を高発現していることを明らかにした。分泌型PLA2G2D分子はグラム陽性菌に対して抗菌活性を持つことが報告されている。そこで分泌型PLA2G2D分子欠損マウスの腸内細菌叢を調べたところ加齢に伴うグラム陽性菌の増加が確認された。また、加齢による腸内細菌叢の変化に伴う非アルコール性肝障害(NAFLD)や肝がんの発症が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は小腸腸管に存在する貪食細胞の一種であるCX3CR1+細胞が分泌型PLA2G2D分子を高発現していることを明らかにした。分泌型PLA2G2D分子はグラム陽性菌に対して抗菌活性を持つことから、リステリア菌に対する感染実験を行なったところ、野生型マウスに比較して分泌型PLA2G2D分子欠損マウスは高い感受性を示すことが明らかになった。また分泌型PLA2G2D分子欠損マウスは加齢に伴うグラム陽性腸内菌の増加やそれに伴う肝臓疾患の発症・増悪することを明らかにした。これらの結果から、正常な腸内細菌叢の維持にCX3CR1+細胞由来の分泌型PLA2G2D分子が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intestinal microbiota plays a vital role in maintaining the physiological homeostasis of our body. The maintenance of a homeostatic environment in the intestinal lumen which harbors pathogenic and non-pathogenic microbiota, is regulated by host cell-derived secretory molecules

I found that intestinal CX3CR1+ phagocyte which take up luminal antigens by protruding their dendrites into the lumen, highly expressed Group IID secreted PLA2 (PLA2G2D). PLA2G2D work as not only enzyme of lipase but also antimicrobial molecule to gram-positive bacteria. Based on the function of CX3CR1+ phagocyte and expression of PLA2G2D in CX3CR1+ phagocyte. I observed that Pla2g2d -/- mice show dysbiosis in small intestinal microbiota associated with increasing of gram-positive microbiota at ageing. Pla2g2d -/- mice onset nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and progression of hepatocarcinoma with increasing of senescent cells in a gram-positive microbiota dependent manner.

研究分野：粘膜免疫

キーワード：粘膜免疫 腸内細菌 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

腸管恒常性は腸管管腔と腸管組織とを物理的及び化学的に隔てる腸管上皮細胞と腸管組織へと侵入した病原体に対して防御反応を示す腸管免疫細胞によって維持されている。腸管上皮細胞は抗菌ペプチドやムチンなどの様々な生理活性分子を腸管管腔中へ分泌することで、病原性細菌や腸内細菌の侵入を防ぐだけでなく、正常な腸内細菌叢の維持に寄与することが明らかになっている。一方、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、腸管機能の恒常性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)。このように CX₃CR1⁺貪食細胞はサイトカインを含む種々の生理活性分子を分泌することで腸管恒常性維持に寄与している。加えて、小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞は GPR31 分子依存的に腸管上皮細胞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これまでに報告してきた(Morita N et al. Nature, 2019)。

2. 研究の目的

小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞は様々な生理活性分子の分泌能を有すると同時に樹状突起を管腔中へ伸長することで直接的に腸管管腔面に接することができる数少ない免疫細胞集団である。これらの小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞の機能的特徴を踏まえると、腸管上皮細胞同様に小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞も樹状突起を介して生理活性分子を腸管管腔中へと分泌することが可能になり得る。そこで本課題では、これまでは腸管組織において腸管上皮細胞が生理活性分子を腸管管腔中へ分泌することで管腔中の恒常性が維持されると考えられてきたが、上皮細胞のみならず小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞も樹状突起を介して生理活性分子を管腔中へ分泌することで正常な腸管管腔環境の維持に寄与するという、新たな小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞の生理的役割の解明を目的とする。申請者はオープンデータベースから小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞が高発現する分泌性分子の候補を絞り込むことに成功している。その中でも Phospholipase A2 分子ファミリーの 1 つである

Group IID secreted PLA2 (sPLA2-IIID)が腸管組織において小腸 CX₃CR1⁺貪食細胞に特異的に高発現していることが明らかになった。sPLA2-IIID は細菌に対して高い抗菌活性を持つことがこれまでの研究で報告されている(Rao SK et al. J. Biol. Chem. 2002)。このことから樹状突起により管腔中へと分泌された sPLA2-IIID 分子が抗菌機能を介して腸管管腔内の恒常性維持に寄与する可能性が示唆される。そこで本研究では sPLA2-IIID 分子が腸管管腔中における正常な恒常性維持への寄与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)腸管におけるグラム陽性菌感染症へ sPLA2-IIID 分子が与える影響の解明

野生型および sPLA2-IIID 遺伝子欠損マウスに *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) 菌を経口感染させる。感染させた後にマウスの体重減少率および生存率を評価する。また、マウスの腸管管腔内および宿主組織中におけるリステリア菌の菌量を測定する。

(2) sPLA2-IIID 分子が腸内細菌叢制御に与える影響の解明

野生型および sPLA2-IIID 遺伝子欠損マウスの小腸および大腸内の管腔内内容物サンプルを回収し、次世代シーケンサーを用いて腸内細菌叢解析を実施した。

(3) sPLA2-IIID 分子が腸内細菌叢制御変化を伴う加齢性疾患へ与える影響の解明

野生型および sPLA2-IIID 遺伝子欠損マウスが 40 週齢時の個体体重がおよび肝臓重量を比較する。また、60 週齢時における 7,12-dimethylbenz()anthracene 誘導性肝がんの重症度を比較検討する。

4. 研究成果

sPLA2IIID 分子は分泌型リパーゼとして細胞外に分泌されることで、生理活性脂質分子の産生を誘導し生体恒常性の維持に寄与することが知られている。分泌型リパーゼとしての機能に加え、sPLA2IIID 分子はグラム陽性菌に対する抗菌活性を持つことが報告されている。申請者らは先行研究として sPLA2IIID 分子がグラム陽性菌に作用するのか、グラム陽性病原性細菌である *L. monocytogenes* 菌を用いた経口感染実験を行った。体重変化や死亡率などの感染感受性を指標に評価したところ、野生型マウスに比較して sPLA2GIID 分子欠損マウスは *L. monocytogenes*

に対して有意に高い感染感受性の増加を認めた。とりわけ小腸管腔中の *L. monocytogenes* 量は野生型に比較して sPLA2IID 分子欠損マウスでは 500 倍以上に増加していた。その一方でグラム陰性病原性細菌である *Salmonella typhimurium* 感染に対しては野生型マウスと sPLA2GIID 分子欠損マウス間で有意な差は認められなかった。この結果から、申請者は既に生理的条件下において sPLA2IID 分子が小腸管腔中のグラム陽性菌に対して作用することを明らかにした。

また小腸腔中へ分泌された PLA2GIID 分子分子が腸内細菌叢制御に寄与しているか解析したところ、若齢期(12 週齢)のマウスでは野生型と sPLA2GIID 分子欠損マウス間で小腸・大腸細菌叢の変化は認められなかった。一方で老年期(45 週齢)のマウスにおいては小腸細菌叢の大きな変化は確認できなかったが、小腸細菌叢において sPLA2GIID 分子欠損マウスでは、グラム陽性菌の増加を伴う有意な腸内細菌叢変化が確認された。つまり、宿主の機能が低下する加齢時において小腸 CX3CR1+ 貪食細胞が樹状突起を介して腸管腔中へ sPLA2GIID 分子欠損マウス分子を分泌することで老年期における腸内細菌叢を制御する可能性が示唆された。また sPLA2GIID 分子欠損マウスでは野生型に比較し加齢に伴う非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) および肝癌の疾患感受性が増加することも同時に確認された。さらに、NAFLD の症状が腸内細菌に依存しているかを明らかにするためにグラム陽性菌に抗菌活性をもつバンコマイシンをマウスへ自由飲水により投与した。バンコマイシンの投与を受けた sPLA2GIID 分子欠損マウスでは上記の NAFLD 様の症状は確認されなかった。さらに sPLA2GIID 分子欠損マウスにバンコマイシンを投与することで、肝癌の症状が抑えられることが確認された。これらの結果から、小腸 CX3CR1+ 貪食細胞が腸管腔へ分泌する sPLA2GIID 分子が加齢に伴う、グラム陽性菌の増殖を抑制することで、老化に伴う NAFLD や NAFLD 移行性肝癌の発症を抑制していることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 Gao Peng, Adachi Takahiro, Okai Shinsaku, Morita Naoki, Kitamura Daisuke, Shinkura Reiko	4. 巻 34
2. 論文標題 Integrin CD11b provides a new marker of pre-germinal center IgA+ B cells in murine Peyer's patches	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 249 ~ 262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab113	査読の有無 無
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 -

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 無
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0件

〔図書〕 計8件

1. 著者名 森田 直樹, 竹田 潔	4. 発行年 2021年
2. 出版社 生化学	5. 総ページ数 2
3. 書名 腸内細菌が作る乳酸・ピルビン酸による腸管免疫の活性化	

1. 著者名 森田 直樹, 新藏 礼子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学の歩み	5. 総ページ数 9
3. 書名 腸内細菌と免疫 腸管IgA抗体による腸内細菌制御	

1. 著者名 森田 直樹, 竹田 潔	4. 発行年 2021年
2. 出版社 栄養	5. 総ページ数 2
3. 書名 乳酸菌および乳酸菌由来代謝産物による腸管免疫制御の新知見	

1. 著者名 森田 直樹, 新藏 礼子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 月刊臨床免疫・アレルギー科	5. 総ページ数 4
3. 書名 腸管IgA抗体による疾患制御	

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	

1. 著者名 森田 直樹, 新藏 礼子	4. 発行年 2023年
2. 出版社 公益財団法人 腸内細菌学会	5. 総ページ数 8
3. 書名 腸内細菌学会誌	

〔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
---------	---------