

機関番号：12601
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009 ～ 2010
 課題番号：21780090
 研究課題名（和文） 免疫機能に有用な食品の探索を目的とした腸管上皮細胞株の樹立と機能解析
 研究課題名（英文） Establishment and analysis of immune functions of intestinal epithelial cell lines aimed at screening immunity-modulating functional foods
 研究代表者
 岩本 拓 (IWAMOTO TAKU)
 東京大学大学院・農学生命科学研究科・リサーチフェロー
 研究者番号：00401191

研究成果の概要（和文）：種々な微生物や食品成分に直接曝されている腸管上皮細胞(IEC)が、どのような免疫応答の機構を有しているか解析することは、生体に有用または有害な菌体、食品成分を選別、解析する上で重要である。本研究では胎仔と成体マウス由来の小腸、大腸 IEC の培養株の樹立に成功し、幾つかの免疫関連因子の発現が生体内の小腸、大腸 IEC と一致していることを示した。これらの IEC 株を用いた解析から、機能性脂質の代謝産物スフィンゴシン-1-リン酸が IEC での免疫関連液性因子の発現に関与していることを示した。以上の結果から、本研究で樹立したマウス由来 IEC 株群は IEC の免疫機能や IEC を標的とした食品成分を探索する上での有用なモデル系になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The intestines are constantly exposed to commensal and pathogenic microbes and dietary substances including food antigens; therefore, intestines have a unique immune system to fight against or to cope with them. Intestinal epithelial cells (IECs), which are located at the surface of intestinal mucosa, play an important role in regulating the intestinal immune system. Thus it would appear that it is important for analysis of the effects of immunity-modulating drugs and functional foods on immune function of IECs. In this work, we try to establish and analyze of immune functions of intestinal epithelial cell lines. We successfully established mouse epithelial cell lines from fetal and adult mouse small and large intestine. Expression pattern of some immune regulatory molecules in small and large intestinal epithelium corresponds to those in small and large IEC lines respectively. We have also found using these IEC lines that treatment with sphingosine-1-phosphate regulates the mRNA expression and secretion of some cytokines and chemokines. These *in vitro* model systems may prove useful for detailed analysis of the immune regulatory functions of the small and large intestinal epithelia, and for screening immunity-modulating drugs and functional foods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：細胞応答

1. 研究開始当初の背景

腸管は生体に必須な栄養素や生体内在性の細菌のみならず、様々な異物や病原性の細菌等に曝されており、有用な物質や生体内在性細菌は受け入れ、有害な物質や細菌を排除するといった適切な免疫応答を起こす機構が存在している。腸管の免疫機構の破綻は、腸管での重度の炎症や、近年大きな問題となっている食物アレルギー等を引き起こすと考えられていることから、腸管における免疫機能のメカニズムの解析は重要である。

腸管において直接菌体や外来抗原と接触する部位である腸管上皮細胞 (IEC) は食物の消化や吸収に関与する。さらに、抗原の提示細胞や免疫関連液性因子群(サイトカイン群やケモカイン群)の産生細胞として、あるいは形質細胞から産生された免疫グロブリン A の腸管への放出などを行うことから、IEC は腸管免疫系の応答の制御にも関与することが知られている。

免疫担当細胞の取得やハプロタイプを一致させることが容易である点から、免疫学的な研究においてマウスは非常に有用なツールとして用いられている。胎仔、及び成体マウスからの初代培養 IEC 取得法が確立されているが、得られる細胞数に制限があり実験計画上の問題点となっている。

一方、小腸と大腸は組織の構造上の違いがあるばかりでなく、リンパ球の数やケモカイン発現等の免疫機能が異なっていることが知られている。さらに、小腸と大腸の IEC では CD4 T 細胞に抗原を提示する主要組織適合複合体(MHC)クラス II 分子やケモカインの発現パターンが異なっていることが報告されている。一方、成体の IEC では微生物成分に対する不応答化が起こるなど、新生児などとは異なる免疫応答を示すことが報告されている。従って、IEC を標的とした腸管の免疫機能改善に関与する食品因子や有効成分を探索する上において、小腸、大腸間、成体、胎仔間の免疫機能の違いは大きな意味を持ってくると考えられる。

2. 研究の目的

以上の背景から、マウスの胎仔、成体由来の小腸、大腸 IEC 株の樹立を試みた。さらに、腸管上皮細胞は未成熟型から成熟型に分化することが知られていることから、成熟型に分化する小腸 IEC 株を作製し、その免疫機能の解析も行った。

3. 研究の方法

胎仔 BALB/c マウスから取得した初代培養 IEC、及び成体 BALB/c マウスの陰窩 (クリプト)画分より取得した初代培養 IEC にレトロウイルスによる遺伝子導入系を用いて、不死化遺伝子である SV40 large T 抗原 (TAg) を遺伝子導入し、サブクローニングの後、IEC 株を取得した。成熟型に分化する株はテトラサイクリン依存性の転写発現調節システム (Tet off システム) を用いて不死化遺伝子の発現を制御することで樹立することを試みた。取得した IEC 株での免疫関連遺伝子の発現、微生物成分や食品成分に対する応答を、定量的 RT-PCR 法、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA 法)、蛍光免疫染色法、フローサイトメトリー法を用いて、mRNA レベル、タンパク質レベルで検討した。IEC 株の機能が生体内の IEC の機能と一致しているかを検討する為に、生体から小腸、大腸の IEC 画分を取得し、mRNA の発現を、腸管組織切片を作成し、タンパク質の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 樹立した腸管由来の細胞株群が上皮細胞であることの検討

本研究で樹立した胎仔、成体由来 IEC 株は、位相差顕微鏡での観察の結果、全て上皮細胞の特徴である敷石状の形状を示し、上皮細胞の分子マーカーであるサイトケラチンの発現が観察され、間葉細胞のマーカーであるビメンチンの発現は見られなかった。さらに、IEC の特徴である上皮細胞間の密着結合 (タイトジャンクション) を形成するタンパク質群 (ZO-1、オクルディン) が細胞間の接着部位に見られた (図 1: 成体由来大腸 IEC 株)。従って、本研究で樹立した細胞株群は腸管上皮細胞であることが示された。

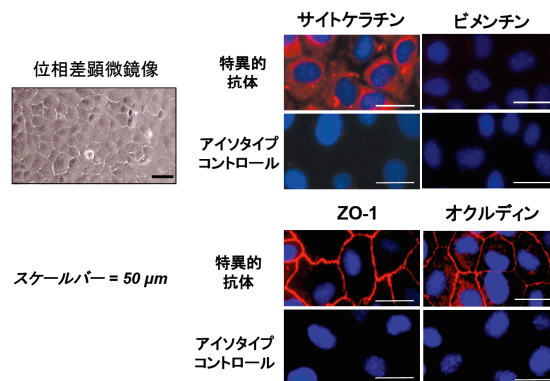


図 1

(2) 胎仔由来の IEC 培養株の樹立

胎仔マウス由来の初代培養 IEC から小腸株として MoS13、大腸株として MoC5 を樹立した。アルカリフォスファターゼやジペプチジルペプチダーゼ IV、MHC クラス II 分子の IEC 株での発現は、小腸 IEC 株で大腸 IEC 株よりも高く、生体の小腸、大腸 IEC の発現パターンと一致していることを示した。さらに、微生物成分を認識する Toll 様受容体(TLR)の小腸、大腸 IEC 株での発現パターンは、生体の小腸と大腸の腸管上皮の発現パターンの特徴を反映している結果を得た。中でも、リポ多糖の認識に関わる TLR4 の補助受容体である CD14 の発現は、IEC 株、生体 IEC で共に大腸側で特に高いことを示した。一方、サイトカイン mRNA 発現には生体の小腸と大腸の腸管上皮の間で大きな違いが見られることを示した。IEC 株でのサイトカイン mRNA 発現パターンは生体から取得した IEC での発現パターンと異なっていた。しかし、腸管上皮間に存在するリンパ球が産生するサイトカイン IFN γ や、TLR のリガンドを添加することにより、IEC 株で一部のサイトカインの発現は、生体 IEC の mRNA 発現に近づくことが分かった。従って、IEC のサイトカイン発現は非炎症時においても微生物成分やサイトカインにより制御されていることが示唆された。

(3) 成体クリプト由来の IEC 培養株の樹立

成体マウスのクリプト由来の初代培養 IEC から小腸株として aMoS7、大腸株として aMoC1 を樹立した。成体由来の小腸、大腸 IEC 株での MHC クラス II 分子の発現は小腸 IEC 株で高く、小腸と大腸の IEC の差を反映していること(図 2)、さらに TLR リガントに対する応答が、大腸 IEC 株よりも小腸 IEC 株で高いことを示した。

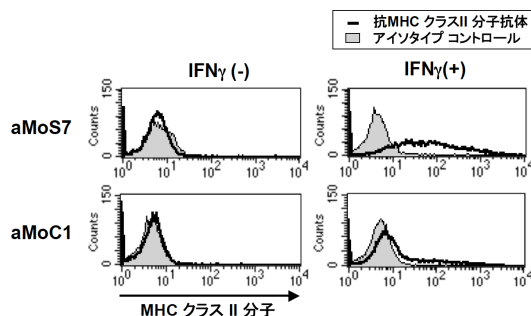


図 2

(4) 成熟型に分化する小腸 IEC 培養株の樹立

胎仔マウス由来の初代培養小腸 IEC から分化誘導型の IEC 株として iMoS 3、4 株を樹立した。テトラサイクリンのアナログであるドキシサイクリン(DOX)を添加することにより、不死化遺伝子 TAg の発現の抑制、細胞増殖能

の低下が見られる事を示した。さらに、小腸腸管上皮の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼの活性、ジペプチジルペプチダーゼの細胞内発現、微絨毛形成に関与するエズリンの発現も DOX の添加により増加した。さらに微絨毛の形成も DOX 添加により顕著な増加が見られた。従って、iMoS 株群は DOX の添加により成熟型に分化する IEC 株であることが示された。分化した IEC で発現の高い、MHC クラス II 分子の発現も DOX 添加により増加した。さらに、分化した IEC で発現が高いサイトカイン TGF- β の mRNA 発現は DOX の添加で増加し、未成熟 IEC で発現の高いケモカイン CCL25 の mRNA 発現も DOX の添加により低下することを示し、免疫機能においても分化誘導を反映している事を示した。さらに、DNA マイクロアレイを用いた解析から、DOX による分化誘導により、菌体成分であるリポ多糖を認識する受容体群の発現が増加することを示した。

(5) 腸管上皮に対するスフィンゴシン-1-リン酸(SIP)の作用

上記の IEC 株を用いることで、IEC の免疫機構の制御に関与する食品成分を探索することが可能かを検討した。その結果、機能性食品成分であるスフィンゴ脂質の代謝産物 SIP が、TLR リガントにより誘導されるサイトカイン産生に関与していることを示した。また、生体内の腸管上皮、及び IEC 株は共に SIP2 受容体の発現が他の 4 種の受容体よりも顕著に高いことを見出し、さらに IEC での SIP によるサイトカイン発現増強には SIP2 受容体が必要であることを示した。

(6) 総括

本研究では、胎仔、成体マウスの小腸、大腸から IEC 株を樹立し、免疫機能の一部が生体の IEC の機能と一致していることを示した。また、これらの細胞株を用いた実験で SIP の IEC の免疫機能に対する作用の一端を解明することに成功した。従って、本研究で樹立したマウス由来 IEC 株群は、IEC の免疫機能や IEC を標的とした食品成分を探索する上で有用なモデル系の一つとなることが期待出来る。

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 Establishment of intestinal epithelial cell lines from adult mouse small and large intestinal crypts Taku IWAMOTO, Kiyoshi

YAMADA, Makoto SHIMIZU and Mamoru TOTSUKA Biosci Biotechnol Biochem. 査読有 Vol. 75、No.5、2011

- ② Disaccharide derived from chondroitin sulfate A suppressed CpG-induced IL-6 secretion in macrophage-like J774.1 cells Miao Jin, Taku Iwamoto, Kiyoshi Yamada, Hideo Satsu, Mamoru Totsuka and Makoto Shimizu, Cytokine、査読有、 Vol. 51、No. 1、2010、pp.53～59

〔学会発表〕（計7件）

- ① 岩本 拓、山田 潔、清水 誠、戸塚 護 「成体マウス由来小腸及び大腸上皮細胞株の樹立と免疫機能解析」 日本農芸化学会関東支部 2011 年度大会 京都 2011 年 03
- ② Taku IWAMOTO, Kiyoshi YAMADA, Ryo HATANO, Makoto SHIMIZU, Mamoru TOTSUKA Comparative analysis of the expression of Toll-like receptors and cytokines in epithelial cell lines and *ex vivo* cells from mouse small and large intestines 14th International Congress of Immunology (ICI2010), Kobe, Japan, Aug. 2010,
- ③ 岩本 拓、戸塚 護、清水 誠、薩 秀夫 「TLR リガンドにより誘導される腸管上皮サイトカイン産生に対するスフィンゴシン-1-リン酸の作用解析」 日本食品免疫学会 第 6 回学術大会 東京 2010 年 6 月
- ④ 岩本 拓、戸塚 護、清水 誠、薩 秀夫 「腸管上皮細胞において TLR リガンドで誘導されるサイトカイン産生に対するスフィンゴシン-1-リン酸の作用とその機構解析」 日本農芸化学会 2010 年度大会 東京 2010 年 3 月
- ⑤ 岩本 拓、戸塚 護、清水 誠、薩 秀夫 「腸管上皮細胞のサイトカイン産生に対するスフィンゴシン-1-リン酸の作用」 第 2 回セラミド研究会学術集会 札幌 2009 年 11 月
- ⑥ 岩本 拓、山田 潔、清水 誠、戸塚 護 「分化誘導により成熟型の性質を示すマウス小腸上皮細胞株の増殖型と成熟型の免疫機能の比較解析」 日本農芸化学会関東支部 2009 年度大会 東京 2009 年 11 月

- ⑦ 岩本 拓、山田 潔、戸塚 護、清水 誠 「マウス小腸、大腸由来上皮細胞株における免疫関連分子の発現および微生物成分に対する応答の比較解析」 日本食品免疫学会 第 6 回学術大会東京 2009 年 5 月

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩本 拓 (IWAMOTO TAKU)
東京大学大学院・農学生命科学研究科・
リサーチフェロー
研究者番号：00401191

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し