

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580403

研究課題名(和文)消化管等における自然免疫系を介する常在細菌制御機構の解明

研究課題名(英文)Clarification of the natural host defense system against indigenous bacteria in alimentary tract

研究代表者

北川 浩(KITAGAWA, Hiroshi)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環・教授

研究者番号：40125307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：消化器系における自然免疫系を介する常在細菌制御に関して、小腸や大腸の粘膜上皮における各種膜型TLRの発現と常在細菌定着との関係や分泌型TLRと常在細菌制御との関係、さらに各種抗菌物質分泌と常在細菌種定着の変化との関係を明らかにした。また腸管付属リンパ組織の濾胞付属腸陰窩における上皮細胞分化の特殊性や食道や皮膚における常在細菌の過剰増殖に対するアポトーシスによる防御機構の詳細を明らかにした。加えて小腸において乳ビ球が従来直接入らないとされてきた門脈血中に直接流入することを証明し、これに関与する内皮細胞の受容体を特定するとともに、呼吸器系における各種TLRの発現・分泌機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The research achievements on the natural host defense against indigenous bacteria (IB) in animals is as follows: the clarification of the relationship between IB settlement and membranous Toll-like receptor (mTLRs)/secretory TLRs (sTLRs) in small and large intestines, the clarification of the relationship between the alternation of IB settlement and the bactericidal substance secretion in small intestine, the clarification of the peculiar epithelial differentiation in the follicle-associated intestinal crypts of gut-associated lymphatic tissue, the clarification of the detailed host defense with epithelial apoptosis against IB hyperproliferation in esophagus and epidermis, the demonstration of the direct transportation of chylomicrons from the intestinal epithelium into the hepatic portal blood and the endothelial receptor for chylomicron transportation, the clarification of the recognition system with mTLRs and secretion of sTLRs against IB in the respiratory tract.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：生体防御機構 消化管 常在細菌 自然免疫 Toll-like receptor 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

常在微生物は経口免疫寛容の導入や粘膜免疫の賦活等を介して宿主の健康維持に深く関わるとされるが、宿主の構成細胞数をはるかに超える常在微生物に対して宿主側がどのようにして応答・制御し、常在微生物の定着を可能としているのかに関しては殆ど解明されていない。一方、微生物の病原関連分子パターンを認識する受容体として Toll-like receptor (TLR) の重要性が注目され、同受容体が特定の分泌液されること明らかになりつつあるが、分泌機構を含めた *in vivo* での解明はなされていない。また消化管等における生体防御機構を解明する上で不足している基礎的知見や修正を要する基礎的知見が多数存在している。研究代表者等は、従来消化管等を中心として、常在細菌と宿主との応答や常在細菌定着の仕組みに関する基礎的研究を行い、多くの成果を得てきている。

2. 研究の目的

研究代表者等が従来明らかにしてきた常在細菌と宿主との応答や常在細菌定着の仕組みに関する様々な基礎的研究成果を基に、本研究では *in vivo* の視点から TLR を含めた常在細菌制御のメカニズム、さらにこの基礎となる事象についての解明を *in vivo* の視点からさらに推し進めることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 消化管一般粘膜上皮に発現する各種 TLR の免疫組織化学的解析

生理学的条件下にあるラットの十二指腸、空腸近位部、空腸遠位部、回腸近位部、回腸遠位部の一般粘膜上皮に発現する各種 TLR の発現を免疫組織化学的に精査し、常在細菌の定着等との関係を探った。

(2) 消化管付属外分泌腺に発現する各種 TLR の免疫組織化学的解析

生理学的条件下にあるラットを用いて、消化管内に分泌物を流入させる涙腺、眼窩外涙腺、ハーダー腺及び消化管に付属する舌腺、耳下腺、下顎腺、舌下腺、噴門腺、胃底腺、幽門腺、肝臓、膵臓、粘膜下腺や小腸から大腸に至る腸陰窩を免疫組織化学的に精査し、各種 TLR を分泌する外分泌腺について解析した。

(3) 小腸一般粘膜上皮における常在細菌の増殖に対する調節と定着菌種との関係の解明

生理学的条件下にあるラットの十二指腸、空腸近位部、空腸遠位部、回腸近位部及び回腸遠位部を用いて、グラム染色や各種抗菌物質の分泌と常在細菌コロニーの局所的増殖との関係を免疫組織化学的及び定着菌種との関係を定量組織学的に精査し、常在細菌増

殖に対する制御の仕組みを解析した。

(4) 大腸の集合リンパ小節に付属する腸陰窩における上皮細胞化の特性の解明

生理学的条件下のラットの大腸集合リンパ小節を用いて、各種抗菌物質を免疫組織化学的に観察し、併せて各種多糖体染色に観察するとともに透過型電子顕微鏡的に濾胞付属腸陰窩を精査し、濾胞付属腸陰窩における上皮細胞分化の特殊性を調べた。

(5) 上行結腸における常在細菌の定着部位の特定、定着と TLR 発現との関係及び常在細菌の過増殖に対する上皮細胞性の調節機構の免疫組織化学的及び定量組織学的解析

生理学的条件下にあるラットの上行結腸近位部を、免疫組織化学的及び定量組織学的手法に常在細菌の定着部位を特定するとともに、細菌の定着と TLR 発現との関係並びに常在細菌の過増殖に対する上皮細胞性の調節機構について解析した。

(6) 呼吸器系粘膜上皮に発現する各種 TLR の免疫組織化学的解析

生理学的条件下にあるラットの鼻腔、喉頭、気管、気管支及び肺の組織について免疫組織化学的に TLR の発現及び各種 TLR を分泌する外分泌腺を詳細に解析した。

(7) 食道及び皮膚粘膜上皮におけるアポトーシスの誘導・実行・調節機構及び常在細菌の過増殖時におけるアポトーシス機構の変化の解明

生理学的条件下のラットの食道及び皮膚の上皮について、アポトーシスの誘導・実行・調節に関わる蛋白質を免疫組織化学的に検出し、アポトーシスに関与する蛋白質の時系列的な発現と常在細菌が上皮上で過増殖した部位における関連蛋白質の発現の変化を解析した。

(8) 深麻酔のラットの空腸を一部結紮して 3 つのループを作製し、各々のループにラット IgG の Fc ないし実験対象としての Fab 及びカゼイン蛋白を被覆した粒子を注入して 30 分後にループを摘出・固定した。パラフィン切片を作製した後、腸絨毛からの粒子の取り込みを光学顕微鏡的及び定量組織学的に解析した。

(9) 小腸における乳ビ球の輸送経路とそのメカニズムの解明

生理学的条件下にあるラットの空腸を採取・固定し、透過型電子顕微鏡下で定量組織学的に観察して上皮細胞で産生された乳ビ球の輸送経路を解析するとともに、血中リポ蛋白に対する受容体を免疫組織化学的に検出し、血行性に輸送されるメカニズムを解析した。

4. 研究成果

(1) 生理学的条件下のラットの小腸の上皮では、TLR-2 が小腸全長の上皮細胞に発現し、TLR-4 及び-9 は十二指腸の上皮細胞で発現したことから、上部消化管における常在細菌に対する監視部位としての十二指腸の重要性が明らかになるとともに、TL-2 が腸絨毛の先端部で欠損し、これが常在細菌の定着に貢献することを定量組織学的に明らかにした。

(2) 生理学的条件下のラットの消化管における分泌型 TLR-2, -4 及び-9 の分泌部位を特定するとともに、膜型 TLR によるリガンドの認識の調節における分泌型 TLR の重要性を指摘した。

(3) 生理学的条件下のラットの小腸における常在細菌の基本的な定着部位が腸絨毛先端のアポトーシス後期の上皮細胞であるが、これを起点として常在細菌が腸絨毛間隙内に増殖すると、腸陰窩のパネート細胞からリゾチームや sPLA2 が一過性に放出され、これによってグラム陰性菌よりもグラム陽性菌が優先的に排除されるため、消化管前位におけるグラム陽性菌優位が消化管後位におけるグラム陰性菌優位に変わる一因であることを明らかにした。

(4) 生理学的条件下のラットの大腸では、集合リンパ小節内を含む近傍の腸陰窩内のみパネート細胞が出現し、超微形態学的特徴、多糖体染色特性並びに分泌顆粒内の抗菌物質の種類についても小腸のパネート細胞と同一であることを明らかにした。また、同腸陰窩内では杯細胞からパネート細胞への分化・移行が起こることも明らかにした。

(5) 従来常在細菌の正確な定着部位が不明であった上行結腸において常在細菌の定着部位が腸間膜付着部の粘膜中の腸表面上皮細胞上であり、同細胞上の TLR-2, -4 及び-9 の発現が他部位より弱いことが常在細菌の定着に貢献することを明らかにしている。また常在細菌の腸陰窩内への過増殖が上皮細胞増殖による防御応答の亢進を誘導し、細胞分化し終えた杯細胞の分裂をも誘導することを明らかにした。

(6) 生理学的条件下の呼吸器系の粘膜上皮における TLR-1 から-9 の膜型受容体の発現を部位別に細胞種ごとに明らかにするとともに、各種 TLR を分泌する上皮内腺及び上皮外腺を特定し、呼吸器系における微生物認識の特性を明らかにした。

(7) 重層扁平上皮で構成される食道及び皮膚の上皮細胞が、生理学的条件下では Fas 及び Fas-L の結合によるアポトーシスの非ミトコンドリア経路の活性化に並行して細胞成熟を進行するが、最終的にミトコンドリア経

路の活性化によって細胞死に至ることを明らかにした。また上皮細胞上で常在細菌が過増殖すると、TNF と TNF-L の結合が起こり、ミトコンドリア経路の急激な亢進によって細胞死が早められることが明らかになった。

(8) 従来研究代表者等が明らかにした、腸管腔から食餌性の未消化の蛋白質や粒子状物が特異抗体と免疫複合体を形成して体循環血へ輸送される現象 (persorption) に、上皮細胞に発現した Fc 受容体が関与することを明らかにした。

(9) 従来小腸の上皮細胞で形成された乳ビ球がリンパ管を介して全身輸送され、血行性には輸送されないとされてきたが、直径 75 nm 以下の小型の乳ビ球が毛細血管を介して輸送されることを超微形態学的に証明するとともに、毛細血管への輸送には VLDL receptor が関与することを明らかにした。

<まとめと展望>

本研究では、消化管等において、国内外を通じて解明が全く遅れていた常在細菌の定着や増殖に対する生体防御の一端を明らかにすることができた。消化管における常在細菌との応答は、全身における様々な免疫応答や経口免疫寛容の成立に重要な影響を与えるとされることから、本研究で得られた成果は、今後感染症の予防やアレルギーの予防・治療に大きく貢献することが期待される。また宿主の健康の維持に特に重要な役割を演じるとされる消化管に関しては膨大な基礎的知見が明らかにされてきたが、中には再検討を要する重要な知見が存在しており、これらの問題点にも目を向けた研究の展開が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

Mantani, Y., Nishida, M., Yuasa, H., Yamamoto, K., Takahara, E., Omotehara, T., Udayanga, K. G. S., Kawano, J., Yokoyama, T., Hoshi, N. and Kitagawa, H., Ultrastructural and histochemical study on the epithelial differentiation to Paneth cells in the rat ascending colon, *Anatomical Record (accepted)*, 査読有, 2014, DOI: 10.1002/ar.22937.

Mantani, Y., Yuasa, H., Nishida, M., Takahara, E., Omotehara, T., Udayanga, K. G. S., Kawano, J., Yokoyama, T., Hoshi, N. and Kitagawa, H., Peculiar composition of epithelial cells in follicle-associated intestinal crypts of Peyer's patches in the rat small intestine. *The Journal of Veterinary Medical Science*

(in press) 査読有, 76, 2014, 833-838, DOI:10.1292/jvms.14-0026.
Takahara, E., Mantani, Y., Udayanga, K. G. S., Qi, W.-M., Tanida, T., Takeuchi T., Yokoyama, T., Hoshi, N. and Kitagawa, H., Ultrastructural demonstration of the absorption and transportation of minute chylomicrons by subepithelial blood capillaries in rat jejunal villi. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 査読有, 75, 2013, 1563-1569, DOI:10.1292/jvms.13-0310.
Mantani, Y., Takahara, E., Takeuchi, T., Kawano, J., Yokoyama, T., Hoshi, N. and Kitagawa, H., Histoplanimetric study on the relationship between invasion of indigenous bacteria into intestinal crypts and proliferation of epithelial cells in rat ascending colon. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 査読有, 75, 2013, 939-947, DOI:10.1292/jvms.13-0036.
Mantani, Y., Yokoo, Y., Kamezaki, A., Udayanga, K. G. S., Takahara, E., Takeuchi, T., Kawano, J., Yokoyama, T., Hoshi, N., Kitagawa, H., Immunohistochemical detection of the Toll-like receptor-2, -4 and -9 in exocrine glands associated with rat alimentary tract. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 査読有, 74, 2012, 1429-1438, DOI:10.1292/jvms.12-0146.
Yuji, M., Fujimoto, M., Qi, W.-M., Takahara, E., Takahara, E., Udayanga, K. G. S., Takeuchi, T., Warita, K., Yokoyama, T., Hoshi, N., Kitagawa, H., Persorption of IgG-Fc-coated particulates from intestinal lumen into portal blood via villous columnar epithelial cells in rat small intestine. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 査読有, 74, 2012, 1447-1452, DOI: 10.1292/jvms.12-0111.
Udayanga, K. G. S., Yamamoto, K., Miyata, H., Yokoo, Y., Mantani, Y., Takahara, E., Qi, W.-M., Kawano, J., Yokoyama, T., Hoshi, N., Kitagawa, H., Alteration in the apoptosis process of rat esophageal epithelium with hyperproliferation of indigenous bacteria un a physiological condition. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 査読有, 74, 2012, 597-605, DOI: 10.1292/jvms.11.0516.
Yokoo, Y., Miyata, H., Udayanga, K. G. S., Qi, W.-M., Takahara, E., Yokoyama,

T., Kawano, J., Hoshi, N., Kitagawa, H., Immunohistochemical study on the secretory host defense system of bactericidal peptides in rat digestive organs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 査読有, 73, 2011, 217-225, <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.10-0293>.
Yokoo, Y., Miyata, H., Udayanga, K. G. S., Qi, W.-M., Takahara, E., Mantani, Y., Yokoyama, T., Kawano, J., Hoshi, N., Kitagawa, H., Immunohistochemical and histoplanimetric study on the spatial relationship between the settlement of indigenous bacteria and the secretion of bactericidal peptides in rat alimentary tract. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 査読有, 73, 2011, 1043-1050, <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.11-0114>.
Yokoyama, T., Etoh, T., Udayanga, K. G. S., Qi, W.-M., Warita, K., Matsumoto, Y., Miki, T., Takeuchi, Y., Hoshi, N., Kitagawa, H., Immunohistochemical detection of phosphatidylserine and thrombospondin on the denucleating erythroblasts in rat bone marrow. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 査読有, 73, 2011, 949-952, <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.10-0437>.
Mantani, Y., Kamezaki, A., Udayanga, K. G. S., Takahara, E., Qi, W.-M., Yokoyama, T., Kawano, J., Hoshi, N., Kitagawa, H., Site differences of the Toll-like receptor expression in the mucous epithelium of rat small intestine. *Histology and Histopathology*, 査読有, 26, 2011, 1295-1303, http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_26/26_10/26_10_1295.htm.
Udayanga, K. G. S., Miyata, H., Yokoo, Y., Qi, W.-M., Takahara, E., Mantani, Y., Yokoyama, T., Hoshi, N., Kitagawa, H., Immunohistochemical study of the apoptosis process in epidermal epithelial cells of rats under a physiological condition. *Histology and Histopathology*, 査読有, 26, 2011, 811-820, http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_26/26_7/26_7_811.htm.

〔学会発表〕(計12件)

万谷 洋平, 高原 英一郎, 河野 潤一, 横山 俊史, 星 信彦, 北川 浩, ラット上行結腸における酸性顆粒を有する腸陰窩上皮胞に関する形態学的研究,

第89回日本解剖学会近畿支部学術集会,
2013年11月30日, 生駒市.

又吉 緑, 万谷 洋平, 高原 英一郎, 横
山 俊史, 河野 潤一, 星 信彦, 北川
浩, ラットの消化器系における補体成分
C3とC4の産生部位に関する免疫組織化
学的研究, 第156回日本獣医学会学術集
会, 2013年9月20-22日, 岐阜市.

万谷 洋平, 高原 英一郎, 河野 潤一,
横山 俊史, 星 信彦, 北川 浩, ラッ
ト上行結腸の集合リンパ小節近傍の腸
陰窩に出現するパネート細胞様外分泌
細胞に関する超微形態学および組織
化学的研究, 第156回日本獣医学会学術
集会, 2013年9月20-22日, 岐阜市.

高原 英一郎, 万谷 洋平, 横山 俊史,
星 信彦, 北川 浩, ラット空腸の腸絨
毛における小型乳ビ球の門脈血への移
行の仕組みに関する免疫組織化学的研
究, 第156回日本獣医学会学術集会, 2013
年9月20-22日, 岐阜市.

万谷 洋平, 高原 英一郎, 河野 潤一, 横
山 俊史, 星 信彦, 北川 浩, ラット上行
結腸腸陰窩における常在細菌の増殖に対
する生体防御に関する研究, 第 88 回日
本解剖学会近畿支部学術集会, 2012 年 12
月 1 日, 神戸市.

又吉 緑, 万谷 洋平, 高原 英一郎, 河野
潤一, 横山 俊史, 星 信彦, 北川 浩, ラ
ット肝臓における補体 C3 および C4 の産
生に関する免疫組織化学的研究, 第 88
回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2012
年 12 月 1 日, 神戸市.

縦山 真丈, 万谷 洋平, 高原 英一郎, 河
野 潤一, 横山 俊史, 星 信彦, 北川 浩,
ラット十二指腸粘膜上皮における
Myeloid differentiation factor-2 と
Toll-like receptor-2 の発現に関する免
疫組織化学的研究. 第 88 回日本解剖学会
近畿支部学術集会, 2012 年 12 月 1 日,
神戸市.

山本 教司, 縦山 真丈, Udayanga K. G.
S., 万谷 洋平, 高原 英一郎, 竹内 崇師,
横山 俊史, 河野 潤一, 星 信彦, 北川 浩,
ラット小腸腸陰窩上皮細胞の細胞死に関
する超微形態学および免疫組織化学的
研究, 第 154 回日本獣医学会学術集会,
2012 年 9 月 14-16 日, 岩手市.

万谷洋平, 高原英一郎, 竹内崇師, 河野
潤一, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩, ラ
ットの上行結腸における常在細菌の定着
とその制御に関する定量組織学的研究,
第 154 回日本獣医学会学術集会, 2012 年
9 月 14-16 日, 岩手市.

Udayanga K. G. S., Yamamoto K.,
Mantani Y., Takahara E., Tanida T.,
Yokoyama T., Kawano J., Hoshi N.,
Kitagawa H. (2011): Acceleration of
epithelial apoptosis in anterior

epithelial column of filiform papilla
in rat tongue by indigenous bacterial
settlement, 第 152 回日本獣医学会学術
集会, 2011 年 9 月 19-21 日, 堺市.

亀崎 青沙, 万谷 洋平, Udayanga K. G.
S., 高原 英一郎, 谷田 任司, 河野 潤一,
横山 俊史, 星 信彦, 北川 浩, ラット
呼吸器系上皮における Toll-like
receptor の局在に関する免疫組織化学的
研究, 第 152 回日本獣医学会学術集会,
2011 年 9 月 19-21 日, 堺市.

Udayanga K. G. S., Miyata H., Yokoo Y.,
Takahara E., Mantani Y., Yokoyama T.,
Hoshi N., Kitagawa H.,
Mitochondria-Dependent Pathway as a
Final Apoptosis Process Secondarily
Induced in Rat Esophageal Epithelium
under a Physiological Condition.
Mitochondria, *Apoptosis and Cancer
Conference*, 27th-29th, October, 2011,
National University of Singapore,
Singapore.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 浩 (KITAGAWA, Hiroshi)
神戸大学・自然科学系先端融合研究環・教
授
研究者番号: 4 0 1 2 5 3 0 7

(2) 研究分担者

河野 潤一 (KAWANO, Junichi)
神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教
授
研究者番号: 4 0 1 2 7 3 6 1