

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：25301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700917

研究課題名(和文)腸管マクロファージにおける腸管病原細菌に対する応答性の解析

研究課題名(英文)Response of intestinal macrophage to intestinal bacteria

研究代表者

中田 和江 (Nakata, Kazue)

岡山県立大学・保健福祉学部・助教

研究者番号：60411740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：腸管マクロファージの貪食能は、E. coli、V. parahaemolyticus、S. aureusに比べ、L. caseiで有意に低かった。経時的な殺菌能は、それぞれの菌によって異なった。TNF- α 、IL-12産生では、LPS刺激よりもE. coli、V. parahaemolyticus、S. aureusで有意に高く、L. caseiは産生されなかった。IL-10産生は、LPSと全ての菌で同程度の産生が認められた。TNF- α やIL-12産生は貪食阻害によって抑制されることが明らかとなった。腸管マクロファージでは炎症性サイトカイン誘導に貪食が重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The study aimed to clarify the mechanism of foreign substances recognition and elimination by intestinal macrophages and to identify selective intestinal macrophage responses, such as phagocytosis, bactericidal activity, and cytokine production, induced by nonpathogenic E. coli, V. parahaemolyticus, S. aureus, and L. casei. The phagocytosis of L. casei by intestinal macrophages was significantly lower than that of E. coli, V. parahaemolyticus, S. aureus. The bactericidal activities of intestinal macrophages differed for different bacterial species. TNF- α and IL-12 production induced by E. coli, V. parahaemolyticus, and S. aureus stimulation was significantly higher than that induced by LPS but not L. casei. IL-10 production was same for LPS and all bacteria. The production of TNF- α and IL-12 in intestinal macrophages may be related to phagocytosis. These results confirmed that intestinal macrophages show different responses to individual bacteria species.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：腸管マクロファージ 腸管感染症 感染防御 組織特異性

1. 研究開始当初の背景

(1)国内外の研究動向および位置づけ

近年、腸管の免疫機構は、全身の免疫力向上においても重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。それに伴い、腸管免疫制御を通じた生体調節を、生活習慣病の予防や治療に活用できるように腸管免疫系の制御機構の解明が進められている。マクロファージは免疫機構の制御において重要な役割を果たしている細胞である。マクロファージは免疫成立の最前線で働き、自然免疫だけでなく獲得免疫の誘導にも働いている。一方、消化管は、栄養分の消化・吸収ばかりでなく食中毒等、腸管感染症の感染経路として最も重要な組織の一つである。しかし、腸管病原細菌に関する研究の多くは、菌側の毒素など病態に関わる病原因子の同定が主流であり、感染成立時に働く因子と生体防御機構との相互作用についての詳細はまだ明らかにされていない。腸管病原細菌に関する研究において、現在主に使用されているマクロファージは、RAW264.7やTHP-1などの培養細胞株や腹腔マクロファージ、末梢血単球などである。しかしながら、腸管マクロファージを対象とした研究は殆どみられない。マクロファージは生体内のあらゆる組織に存在しているが、その機能は存在する組織環境により多様に分化している。特に腸管は、外部環境との接面が生体内で最も広く、常に細菌や食物等の異物に晒されている。そのような環境の中で、腸管マクロファージは不要な炎症が起きないように制御され、他の組織マクロファージよりも異物に対する応答性が低く、炎症性サイトカインの産生や抗原提示能もみられない。しかし、この腸管マクロファージの低応答性がどのような機構により制御されているのか、非病原細菌と病原細菌をどのように識別し処理を行っているのか、その詳細は殆ど明らかにされていない。したがって、腸管感染症の感染機構成立において、これまで行われてきた腸管マクロファージ以外の細胞での結果がそのまま腸管にもあてはまることは考え難く、腸管マクロファージの異物識別機構やその後の応答機構を他の組織マクロファージと比較し解明することは、腸管病原細菌に対する感染防御機構解明のためにも非常に重要であると考えられる。

(2)これまでの経緯

腸管マクロファージの異物に対する低応答性については、異物に対するレセプター (CD14、TLR4/MD-2 等) が発現しておらず、それに伴いサイトカインの分泌など異物に対する応答反応が他の組織マクロファージと比べ低いと云われていた (Weber B *et al.*, *Semin Immunopathol.* 17, 171-84 (2009))。しかし、研究代表者らは腸管マクロファージの細胞内に CD14 のタンパク質が存在することを明らかにし (Nakata K *et al.*, *Clin Exp Immun.* 143, 484-93 (2006)) また IgA で腸

管マクロファージを刺激すると LPS 応答性が回復すること (Nakata K *et al.*, *Int J Colorectal Dis.* 21, 339-47 (2006))、さらに、CD14 の発現が IgA 刺激により細胞膜上に誘導されることを見出した。この CD14 の発現制御機構について研究代表者らは腸管マクロファージの CD14 が他のマクロファージと分子量が異なることを明らかにし、発現に伴うタンパク質の修飾違いで発現が抑制されている可能性を見出した (H20・若手研究 (B))。

また最近、腸管マクロファージでは各リガンドに対する応答性は無いが、TLR3 (ウイルス特異的 dsRNA のレセプター)、TLR5 (細菌の鞭毛のレセプター)、TLR6 (シアルリポタンパク質のレセプター)、TLR7 (ウイルス由来一本鎖 RNA のレセプター)、TLR8 (TLR7 と同様)、TLR9 (細菌、ウイルス由来 CpG DNA のレセプター) が発現していること (Lesley ES *et al.*, *J Bio Chem.* 285, 19593-604 (2010))、単球を腸管由来の細胞等と共培養すると腸管マクロファージ様細胞に分化すること (Lesley ES *et al.*, *J Clin Inv.* 115, 66-75 (2005)) が報告されている。以上のことは、腸管マクロファージの異物に対する低応答が、生来のものではなく環境により制御されていることを示唆している。

2. 研究の目的

H20・若手研究(B) (腸管マクロファージの CD14 発現制御機構に関する研究)の継続研究として、腸管マクロファージの異物識別機構について、(1)腸管病原細菌に対する特異的応答機構、(2)組織マクロファージ特異的応答機構を明らかにすることを目的に解析を行った。

3. 研究の方法

(1)腸管マクロファージの単離

BALB/c マウスより大腸 (盲腸下から直腸まで) を回収し、DTT・EDTA により粘膜や上皮細胞を除去した。その後、酵素 (dispase、collagenase、DNase) 処理をし、不要な組織の除去を行った。Percoll 密度勾配遠心法により単核細胞分画の細胞を回収した。得られた細胞にマグネチック標識-抗マウス CD11b 抗体を付加し、マグネットを利用して、CD11b 陽性細胞を得た。得られた細胞は、フローサイトメトリー法によりマクロファージ特異的抗原 (CD68、F4/80) の発現から精製度を解析した。

(2)菌体刺激による異物応答性の解析

菌体

グラム陰性細菌として、非病原性の *E. coli*, C600、食中毒菌として知られる *V. parahaemolyticus*, SH411 を用いた。グラム陽性細菌としてプロバイオティクス等で利用されている *L. casei*, Shirota, 食中毒菌として知られる *S. aureus* (臨床単離株)

を用いた。

FITC 標識細菌に対する貪食能

FITC 標識した死菌を細胞に添加し (細胞:細菌=1:10) 6h 培養した。培養後、細胞を回収し、洗浄後、細胞内に細菌を取り込んだ細胞の割合をフローサイトメトリー法により解析を行った。

殺菌能

細胞に生菌を添加し (細胞:細菌=1:10) 2h 培養後に抗生剤入り培地に置換後、30min、120min、240min 後に TritonX を加えた培養液を寒天培地に撒いて、細胞内に生残した細菌のコロニー数をカウントした。

サイトカイン産生能

細胞に LPS (0.1 μ g/ml) 各菌 (細胞:細菌=1:10) を添加し 6h 後の培養上清を用いて TNF- α と IL-10 を、24h 後の培養上清を用いて IL-12 を測定した (ELISA 法)。

(3) 腸管マクロファージにおける TNF- α 、IL-12 産生誘導経路の解析

貪食阻害によるサイトカイン産生への影響

細菌添加 30 分前に 10 μ M サイトカラシン D (CyD) で前処理を行い、(2)と同様に培養上清を回収し、ELISA 法にて TNF- α 、IL-12 を測定した。

シグナル伝達分子の発現解析

無刺激の細胞、LPS および *E. coli* で 30min 刺激した細胞を lysis buffer で処理し、タンパク質を抽出した。SDS-PAGE を行った後、ウェスタンブロッティング法により PVDF にタンパク質を吸着させ抗 CD14 抗体、抗 TLR4 抗体、抗 MyD88 抗体、抗 p-I κ B 抗体を用いて検出を行った。

4. 研究成果

(1) 腸管マクロファージの単離

本単離方法により、CD11b 陽性細胞 (腸管マクロファージ) として、マウス 1 匹あたり $1.1 \pm 0.4 \times 10^6$ cells を得ることが出来た。得られた細胞の精製度は、抗 CD11b 抗体付加前の細胞で F4/80: 5.5 \pm 4.8%、CD68: 26.9 \pm 12.2% だったが、CD11b 陽性細胞では F4/80: 34.8 \pm 17.5%、CD68: 60.1 \pm 16.6% であった。

(2) 菌体刺激による異物応答性の解析

FITC 標識細菌に対する貪食能

細菌をはじめ異物排除において、マクロファージの貪食能はもっとも基本的な機能であり、腸管マクロファージにおいても、他の組織マクロファージと同程度あることがすでに確認されている (Smythies LE *et al.*, J Clin Invest. 115, 66-75(2005))。しかし、細菌の種類によって違いがあるかを比較した報告は少なく、どのような細菌が積極的に排除されるのか等、マクロファージの細菌選択性については十分明らかにされていない。*E. coli*、*V. parahaemolyticus*、*S. aureus*、

L. casei に対する貪食率を比較した結果、*E. coli*: 55.1 \pm 18.1%、*V. parahaemolyticus*: 31.5 \pm 5.1%、*S. aureus*: 49.8 \pm 4.3%、*L. casei*: 2.6 \pm 0.2% で、*L. casei* に対する貪食能が統計学的に有意に低いことが示された。この細菌に対する貪食能の違いは RAW264.7 細胞や腹腔マクロファージでも同様に認められた。

殺菌能

次に取り込まれた細菌に対する殺菌能について経時的な解析を行った。抗生剤入り培地に置換後 30min では、細胞外に残った細菌は全て殺菌されており、この時に細胞内に生残していた細菌数を 1 とした。腸管マクロファージでは、120min 後、*E. coli* で約 1/100 になったが、*V. parahaemolyticus*、*S. aureus*、*L. casei* は、ほとんど変化がなかった。240min 後、*V. parahaemolyticus* では約 1/10 に、*L. casei* は約 1/100 となったが、*S. aureus* は殆ど殺菌されなかった。この傾向は RAW264.7 や腹腔マクロファージではそれぞれ異なっていたため、殺菌能は細菌によって異なること、組織マクロファージによっても異なることが示された。

サイトカイン産生能

これまでの研究では、IM は LPS や PGN、フラジェリン等、PAMPs による刺激では炎症性サイトカインの産生がほとんどないことが報告されている (Smythies LE *et al.*, J Bio Chem. 285, 19593-604(2010))。しかし、IL-12 産生の誘導には細菌の貪食が重要になっているとの報告もあり (Naruse H *et al.*, Clin Exp Immun. 164, 137-44(2011))、腸管マクロファージでは貪食能も殺菌能も有していることから、LPS と細菌では炎症性サイトカイン誘導に違いがあるのではないかと考えた。腸管マクロファージの TNF- α 産生は、LPS で 0.1 \pm 0.1ng/ml あり、RAW264.7 や腹腔マクロファージに比べ約 1/100 程度の産生であった。しかし、*E. coli* では 0.3 \pm 0.2ng/ml、*V. parahaemolyticus* 0.3 \pm 0.2ng/ml、*S. aureus* 0.2 \pm 0.3ng/ml と、*E. coli* と *V. parahaemolyticus* では LPS に比べ有意に産生が高かった。また、RAW264.7 や腹腔マクロファージでは *L. casei* での産生が認められたが、腸管マクロファージではほとんど認められなかった。IL-12 産生も、LPS で 6.2 \pm 8.1 pg/ml、*E. coli* 18.9 \pm 18.1pg/ml、*V. parahaemolyticus* 25.7 \pm 25.4pg/ml、*S. aureus* 27.3 \pm 30.1pg/ml と、LPS に比べ *E. coli*、*V. parahaemolyticus*、*S. aureus* で有意に産生が高く、*L. casei* では産生が認められなかった。抗炎症性サイトカインである IL-10 では、LPS と全ての細菌で産生され、有意な差は認められなかった。これらの結果から、腸管マクロファージでは炎症性サイトカインの TNF- α 、IL-12 は *E. coli*、*V. parahaemolyticus*、*S. aureus* によって誘導されることが示された。グラム陰性菌の *E. coli*、*V. parahaemolyticus* では産生に有意

な差は認められず、非病原性細菌と病原性細菌の差異は確認されなかった。一方、グラム陽性菌の *S. aureus*、*L. casei* では非病原性細菌である *L. casei* において炎症性サイトカインの応答は認められなかった。腸管マクロファージがどのように細菌を識別し異なる応答を誘導しているのか、その詳細については今後細菌の種類を増やすなど、さらに検討を進める必要があると考えられた。

(3) 腸管マクロファージにおける TNF- α 、IL-12 産生誘導経路の解析

食食阻害によるサイトカイン産生への影響

RAW264.7 細胞や腹腔マクロファージでは全ての細菌で TNF- α 、IL-12 が産生されたが、腸管マクロファージでは *E. coli*、*V. parahaemolyticus*、*S. aureus* で産生が確認された。産生が確認された3つの細菌は、食食率が高く、産生の確認されなかった *L. casei* の食食率は低かったことから、これらのサイトカイン誘導に食食が関与しているのではないかと考えた。*E. coli*、*S. aureus* の TNF- α 、IL-12 産生について、食食阻害剤である CyD 添加有無で比較した結果、TNF- α 、IL-12 とともに CyD によって有意に産生が抑制された。特に IL-12 産生は殆ど産生が認められなくなった。したがって、腸管マクロファージの TNF- α 、IL-12 は食食により誘導されることが示唆された。

シグナル伝達分子の発現解析

TNF- α や IL-12 産生に関与するシグナル伝達分子 (CD14、TLR4、MyD88、p-I κ B) の発現をウェスタンブロッティング法により解析を行った。無刺激、LPS 刺激、*E. coli* 刺激の比較から、腸管マクロファージでは LPS 刺激によって、TLR4 の発現が増加する傾向が見られたが、他の分子の変化は見られなかった。一方で *E. coli* 刺激では全ての分子で発現が増加する傾向が認められた。今回の研究では CyD 有無のシグナル伝達分子の発現変化まで確認することが出来なかった。しかし、これまでの研究から、腸管マクロファージの CD14 や TLR4 は細胞膜上ではなく、細胞内に発現していることを確認しており、LPS と *E. coli* 刺激でシグナル伝達分子の発現が異なったことから、腸管マクロファージの異物排除には食食が重要なトリガーとなっているという新たな知見を提示する結果が得られたと考えられた。

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1件)

1) K. Nakata, M. Yamamoto, H. Inagawa, G. Soma. Effects of interactions between intestinal microbiota and intestinal macrophages on health. *Anticancer*

Research, 33, 2849-53 (2013) 査読有

[学会発表](計4件)

1) K. Nakata, K. Morikami, T. Ehara, K. Yamamoto. Cellular response to *Vibrio vulnificatus* by intestinal macrophages. The 7th Joint Conference on Nutrition of Okayama Prefectural University, Woosong University and Sichuan University, 2011.8.17 (又松大学)

2) K. Nakata, M. Yasuda, K. Yamamoto. Response of intestinal macrophage to non-pathogenic and pathogenic bacteria. International Conference on Biologically Active Substances, Bioactive Okayama 2012, 2012. 9. 13-14, Okayama University

3) 中田和江、安田美穂、山本耕一郎、稲川裕之、杉源一郎. 病原性/非病原性細菌に対する腸管マクロファージの応答性. 第16回バイオ治療法研究会学術大会(東京)平成24年12月8日

4) 中田和江、山本真衣、山本耕一郎. 腸管病原性/非病原性細菌に対する腸管マクロファージの応答. 第86回日本細菌学会総会(千葉)平成25年3月18日-20日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田和江 (NAKATA, Kazue)

岡山県立大学・保健福祉学部・助教

研究者番号：60411740