

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460499

研究課題名(和文)細胞外酵素ADPリボシルシクラーゼBST-1/CD157の腸管における機能

研究課題名(英文)Function of extracellular ADP-ribosyl cyclase BST-1/CD157 in the intestine

研究代表者

石原 克彦(Katsuhiko, Ishihara)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：10263245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜外ADPリボシルシクラーゼCD157と相同体CD38の単独あるいは二重欠損マウスを用いてCD157の腸管における機能を解析した。CD157とCD38の産生細胞は腸管における局在が異なる。CD157欠損マウスのDSS誘発大腸炎が軽度であったことはCD157の腸炎促進機能を示唆する。無菌化CD157欠損マウスでは、SPFでは認められなかった細胞動態の異常表現型が認められた。二重欠損マウスの糞便T-RFLP解析では、ある種の腸管常在細菌叢の比率が相対的に低下し、血漿メタボローム解析では複数の経路の代謝産物に変動を認めた。ADPリボシルシクラーゼが腸内細菌叢の制御に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow stromal cell antigen-1(BST-1)/CD157 is a GPI-anchored ectoenzyme having cyclase activity that converts NAD to cyclic ADP-ribose. BST-1 is now appreciated as an entero-neuro-immune regulator. Using the knock-out mice (KO) that lack CD157, CD38 or both, the functions of CD157 in the intestine was examined. The cells expressing CD157 or CD38 locate at distinct regions of the gut system. Decreased severity of DDS-induced colitis in CD157KO indicated that CD157 has a function to promote the colitis. Germ-free CD157KO exhibited the abnormal phenotypes in the cellular dynamics that had not been recognized in the SPF condition. T-RFLP analyses of the feces of double(D)KO revealed a reduced frequency of a certain Operational Taxonomic Unit in the microbiota compared with those of wild type mice. The metabolome analyses of the plasma of DKO revealed the changes in the amount of metabolites in the several pathways. These data indicate that ADP-ribosyl cyclases regulates the microbiota.

研究分野：免疫学

キーワード：腸内細菌叢 無菌マウス

## 1. 研究開始当初の背景

内なる環境因子として代謝・免疫・脳神経系疾患の病態に関連する腸内常在細菌叢は粘膜免疫系により制御されている。ADP リボシルシクラーゼ活性を持つ GPI アンカー型細胞外酵素 BST-1/CD157 は B 細胞の生存を支持することにより関節リウマチの病態に関与する。研究代表者は CD157 欠損マウス(CD157KO)を作成し、初期(129 と C57BL/6J との混合遺伝子背景)の表現型解析で粘膜免疫系胸腺依存性抗原に対する IgA 産生が低下していることを明らかにした。一方、CD157 の相同分子である CD38 は 2 型膜貫通タンパク質で B 細胞活性化、細菌感染防御に関与することが報告されている。ほ乳類における ADP リボシルシクラーゼ機能の解明のために作製した CD38/CD157 二重欠損マウス(CD38/CD157DKO)と CD157KO の C57BL/6J への 8 回の戻し交配を完了し、CD38KO も含めて同じ遺伝子背景で表現型を比較解析できる体制を整えた。ゲノムワイド関連解析により CD157 遺伝子がパーキンソン病の危険因子として同定されたことや、カロリー制限時に腸管パネート細胞に発現誘導される CD157 が酵素活性を介して腸管幹細胞の分化を抑制し、分裂を促進することから、今や、CD157 は腸管-神経-免疫制御分子と考えられるようになった。

## 2. 研究の目的

C57BL/6J の遺伝子背景で、CD157 分子の臓器局在、CD157KO の抗体産生と腸管ストレス応答性、腸内細菌叢との関連性を解析し、CD157 の腸管における機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1)CD157 分子の臓器局在

各種臓器より RNA を調製し、リアルタイム PCR 法で遺伝子発現を定量する。ウサギ抗マウス CD157 抗体を用いて臓器凍結切片を免疫染色し局在を解析する。リンパ組織について

は単細胞浮遊液を調製後、細胞系譜・亜集団特異的蛍光標識モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーにより CD157KO におけるリンパ組織構成細胞の変化を解析する。(2)CD157KO の全身性抗体産生応答

血清免疫グロブリンをアイソタイプ別に ELISA で測定する。I 型および II 型胸腺非依存性抗原として TNP(トリニトロフェニル)-LPS, TNP-Ficoll、胸腺依存性抗原としてアラムと混ぜたジニトロフェニル化-卵白アルブミン(DNP-OVA)を腹腔内に投与し、TNP あるいは DNP 特異的抗体をアイソタイプ別に ELISA で測定する。

### (3)無菌化 CD157KO の作出と表現型解析

無菌化 CD157KO を委託作製し、7-8 週齢で受取ってリンパ組織における免疫系細胞構成をフローサイトメーター解析する。

### (4)CD157KO における腸管常在細菌叢

糞便の T-RFLP 解析により、CD157KO において腸内細菌叢が変化しているか調べる。

### (5)CD157KO の腸管ストレス応答

CD157 の腸管幹細胞保護機能について CD157KO に X 線照射し、腸組織における変化を解析する。また、3%デキストラン硫酸(DSS)水摂取による大腸炎誘導実験を行う。

## 4. 研究成果

### (1)CD157 分子の臓器局在

*Cd157* と *Cd38* の臓器別遺伝子発現解析では、肺、腎、肝、胃、小腸、大腸、胸腺、脾臓、表在リンパ節、腸間膜リンパ節、パイエル板において両者の発現が認められた。しかし、心臓、食道では認められなかった。*Cd157* の遺伝子発現が優位な臓器は腎であり、*Cd38* の優位な臓器は、肝臓、大腸、脾臓であった。

腸管に関しては、まず C57BL/6J の十二指腸、空腸、回腸、結腸の凍結切片を作製し、CD38 と CD157 の局在をラット抗 CD38 モノクローナル抗体とウサギ抗 CD157 抗体を用いた蛍光免疫染色法で局在を解析した。抗 CD157

抗体の反応性は空腸粘膜上皮の刷子縁部分が最も強く、絨毛内には陽性細胞が散在した。一方、CD38 は十二指腸から結腸まで上皮細胞から粘膜固有層に至るまでほぼ全ての領域で産生細胞が認められた。CD157 と CD38 の腸管における機能的役割の差異が示唆された。

#### (2) CD157KO の全身性抗体産生応答

全身性抗体産生系の解析では、TNP-LPS に対する抗 TNP-IgM および抗 TNP-IgG 産生が CD157KO で増強していた。このような異常は初期の解析では認められず、C57BL/6J の遺伝子背景によって顕在化したと考えられた。この異常が造血系細胞と非造血系細胞のいずれの CD157 によるものかを明らかにするために骨髓移植キメラを作製し、TNP-LPS 応答を調べたところ、レシピエントにおける CD157 の有無に関わらず、ドナーの CD157 が欠損したキメラマウスにおいて TNP-LPS 応答が亢進したことから、B 細胞表面の CD157 は TNP-LPS 応答を抑制している可能性が示唆された。

#### (3) CD157KO の腸管ストレス応答

全身 X 線照射(12Gy)では、CD157KO の腸管粘膜における障害に顕著な差はなかった。

3%DSS 水摂取による大腸炎誘発実験において、CD157KO の 6-7 日目の体重減少は C57BL/6J と比較して少なく、組織学的にも粘膜破壊像は軽度であった。CD157 の存在は DSS 腸炎の増悪に関与する可能性が示唆された。

#### (4) 無菌化 CD157 の作出と表現型解析

委託により作製した 17 匹の無菌化 CD157KO を 7-8 週齢で解析した。リンパ組織を構成する細胞亜集団に明らかな差異は認めなかったものの、細胞数の解析で無菌化 C57BL/6J と比較して、脾臓細胞の 50%増加、小腸腸管上皮リンパ球、小腸粘膜固有層リンパ球の 40%の減少と腸間膜リンパ節細胞の著増(3 倍以上)の変化が認められた。腸内細菌叢の存在により不顕性となっていた CD157KO の細胞動態に関連する異常表現型の存在が無菌化により明らかとなった。

#### (5) CD157KO における腸管常在菌層

当初、CD157 の腸管免疫制御機構を確認すべく CD157KO の腸内細菌叢を解析する計画であった。しかし免疫染色の結果、CD38 も十二指腸以降の消化管ほぼ全域に発現していたことから、単独欠損マウスの解析ではファミリー分子の相補機能により明確な変化が認められないという可能性が懸念された。そこで両 ADP リボシルシクラーゼを欠損する CD38/CD157DKO と対照 C57BL/6J(8 週齢雄; n=5)の糞便を採取し、T-RFLP 解析により腸内細菌叢を解析した。その結果、代表的腸管常在細菌叢 5 種類の内、1 種類の相対的比率が低下していた。このことは ADP リボシルシクラーゼが腸内細菌叢の制御に関与するとの新しい知見をもたらした。さらに、腸内細菌叢の全身への影響を把握すべく、CE-TOFMS で血漿メタボローム解析を行ったところ、CD38/CD157DKO では野生型対照と比較して複数の経路の代謝産物に変動が認められた。

CD157/ADP リボシルシクラーゼが種々の腸管機能を制御することが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Higashida H, Ishihara K(19 名中 13 番目), 他. An immunohistochemical, exsymatic, and behavioral study of CD157/BST-1 as a neuroregulator. *BMC Neuroscience*(査読有), 2017 18:35.

DOI:10.1186/s12868-017-0350-7

Hirano H, Igarashi H, Morita Y, Ishihara K. TNF receptor type 2 transmits caspase- dependent apoptotic signals in fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid arthritis. *Kawasaki medical journal*(査読有), 2015, 41(2), 29-40.

DOI: 10.11482/KMJ-E41(2)29

Mizuno A, Ishihara K(10 名中 8 番目), Shuto S, Higashida H 他. Lip-oxytocin-1, A

novel oxytocin analog conjugated with two palmitoyl groups, has long-lasting effects on anxiety-related behavior and social avoidance in CD157 knockout mice. *Brain Sci.* (査読有), 2015, 5(1), 3-13. DOI:10.3390/brainsci5010003

Ishihara K, History and perspectives of research in bone marrow stromal cell antigen-1(BST-1)/CD157:A relative of ADP-ribosyl cyclase CD38. *Messenger* (査読無), 2014, 3, 15-20. DOI:10.1166/msr2014.1038

Saeki Y, Ishihara K. Infection-Immunity Liason: Pathogen-driven autoimmunity-mimicry (PDAIM). *Autoimmunity Reviews* (査読有), 2014, 13, 1064-1069. DOI:10.1016/j.autorev.2014.08.024

Lopatina O, Yoshihara T, Nishimura T, Ishihara K (30名中29番目), Higashida H 他. Anxiety- and depression-like behavior in mice lacking the CD157/BST1 gene, a risk factor for Parkinson's disease. *Front. Behav. Neurosci.* (査読有), DOI:10.3389/fnbeh.2014.00133

[学会発表](計 6件)

Yahagi A, Ishihara K, Systemic infection of *Mycoplasma fermentans* facilitates development of arthritis in the knock-in mice gp130F759 through the action of neutrophils. 8<sup>th</sup> International forum on rheumatoid arthritis 2016. 2016年10月21日, 品川プリンスホテル, 東京

Saika T, Yahagi A, Ishihara K, Eosinophils are not essential for pathological reactions in experimental allergic rhinitis, but suppress IgE production. 第45回日本免疫学会学術集会, 2016年12月7日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄 宜野湾市)

Yahagi A, Ishihara K, Padi4 expression by neutrophils in the synovium appears in

the earliest phase of arthritis in gp130F759. 第45回日本免疫学会学術集会, 2016年12月6日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県 宜野湾市)

Ishihara K, Yahagi A, Lack of microbiota revealed the role for BST-1/CD157 to maintain the homeostasis at mucosa-MLN interface. 第45回日本免疫学会学術集会, 2016年12月5日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県 宜野湾市)

Ishihara K, Yahagi A, Enhanced T1-1 antigen responses in BST-1/CD157 knockout mice of C57BL/6J background. 第44回日本免疫学会学術集会, 2015年11月19日, 札幌コンベンションセンター(北海道 札幌市)

Yahagi A, Ishihara K, Critical roles of neutrophils for development of arthritis in the knock-in mouse gp130F759 induced by systemic infection of *Mycoplasma fermentans*. 第44回日本免疫学会学術集会, 2015年11月19日, 札幌コンベンションセンター(北海道 札幌市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石原 克彦 (ISHIHARA, Katsuhiko)  
川崎医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10263245

### (2) 研究分担者

矢作 綾野 (YAHAGI, Ayano)  
川崎医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 10584873  
以下2名、平成26・27年度のみ  
五十嵐 英哉 (IGARASHI, Hideya)  
川崎医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 40291538

### (4) 研究協力者

平野 紘康 (HIRANO, Hiroyasu)  
川崎医科大学・医学部・大学院生