

「腸内細菌-腸上皮細胞相関による腸管免疫制御機構の解析」

神戸大学大学院医学研究科

村田 陽二

1 研究の背景と目的

これまで、腸管免疫の制御機構と炎症性腸疾患の病因研究は、腸粘膜に存在する免疫担当細胞とその異常を中心に行われてきた。近年、腸上皮細胞が単なる物理的なバリアとして機能するのみならず、腸内細菌との相互作用により腸管免疫を直接的に制御することが示唆されつつあるが、その機序は大部分が不明である。研究代表者らは、腸上皮細胞の微絨毛に特異的に発現・局在する受容体型チロシンホスファターゼ SAP-1 を発見し、SAP-1 遺伝子破壊 (KO) マウスを用いた解析から、SAP-1 が抗炎症性サイトカイン IL-10 と協調し腸炎発症を抑制的に制御することを見出していた (Murata et al., *PNAS*, 2015)。さらに、SAP-1 のチロシン脱リン酸化基質分子として、微絨毛に局在する膜型分子 CEACAM20 を同定し、CEACAM20 がその細胞内部分のチロシンリン酸化を介して IL-8 などのケモカイン産生を誘導し、炎症を惹起することを明らかにした。すなわち、SAP-1 と CEACAM20 の作用のバランスが腸上皮細胞による腸管免疫の制御に重要であるという新たなモデルを示した (図 1)。興味深いことに SAP-1 と CEACAM20 は共に微絨毛に局在する膜型分子であることから、腸内細菌の菌体成分などが両分子のリガンドとなる可能性がある。さらに、研究代表者らは CEACAM20 の発現が腸内細菌により制御されることも見出していた (Kitamura, Murata et al., *Genes Cells*, 2015)。従って、SAP-1-CEACAM20 系の機能に腸内細菌の寄与が極めて重要であると考えられる (図 1)。そこで本研究では、腸内細菌の SAP-1-CEACAM20 系への関わりを検討することにより、腸上皮細胞による新たな腸管免疫制御機構を明らかにしようとした。

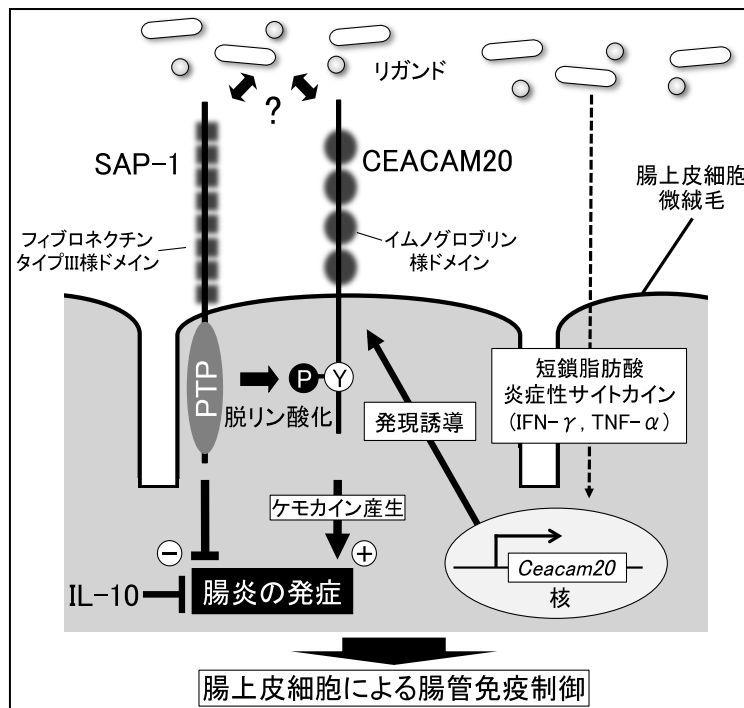


図 1 SAP-1-CEACAM20 系による腸管免疫制御と腸内細菌の役割

2 研究方法・研究内容

1) 腸内細菌による CEACAM20 および SAP-1 の発現制御

研究代表者らは、腸上皮細胞における CEACAM20 の発現制御に腸内細菌由来の短鎖脂肪酸や腸内細菌依存的に免疫細胞により産生されると考えられる TNF- α 、IFN- γ の作用がその発現を制御する可能性を見出していた (Kitamura, Murata et al., *Genes Cells*, 2015)。一方で、CEACAM20 の脱リン酸化を制御する SAP-1 の腸内細菌を介した発現制御については、不明であった。そこで、抗生剤を含む飲料水を摂取させることで腸内細菌を除去した野生型マウスと抗生剤を含む飲料水を摂取していない野生型マウスの小腸上皮細胞における SAP-1 の発現について、ウェスタンブロットにて比較検討した。その結果、両マウス間での SAP-1 の発現に大きな違いは認められなかった (図 2)。一方、CEACAM20 の発現制御に腸内細菌が強く関与するか、さらに、その腸内細菌の候補の同定を進める目的で、SPF 下にて飼育を行った腸内細菌を含むマウスの糞便を回収し、クロロホルム処理を施すことで、芽胞形成を行う腸内細菌を濃縮し、得られたクロロホルム処理後の糞便を無菌マウスに摂取した後、小腸における CEACAM20 の発現を組織免疫染色にて検討した。その結果、クロロホルム処理後の糞便を与えた場合、クロロホルム処理後の糞便を与えないマウスに比べ、小腸における CEACAM20 の免疫染色の増強傾向が認められた。

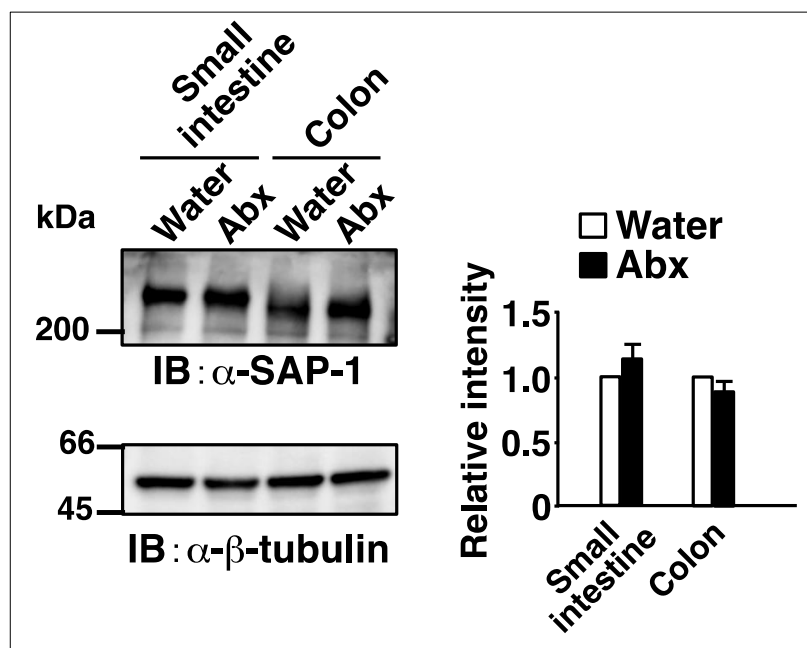


図2 腸内細菌による SAP-1 の発現制御の有無
抗生剤投与マウス(Abx)および非抗生剤投与(Water)マウスの腸上皮細胞における SAP-1 の発現

2) CEACAM20 および SAP-1 を介した腸内細菌の制御

CEACAM20-SAP-1 系が腸内細菌の構成に変化をもたらす可能性があるかについて検討する目的で、CEACAM20 の遺伝子を破壊したマウス (CEACAM20 KO マウス) と野生型マウスの糞便より腸内細菌由来 DNA を回収し、どのような菌種を含むかについて、クロストリジウム属、エンテロバクター属などの代表的な腸内細菌の 16S rDNA を特異的に増幅するプライマーセットを用い判定量的な解析を行った。その結果、CEACAM20 KO マウスと野生型マウス間において、量的変化を示す特異的な腸内細菌の存在は認められないと考えられた。そこで、現在、次世代シーケンサーを用い、糞便中に含まれる腸内細菌由来 16S rDNA

の特定領域の塩基配列を網羅的に決定することで、腸内細菌の構成に変化があるかについて、より詳細な解析を進めるに至っている。

3) 腸内細菌による SAP-1-CEACAM20 系の機能制御とその作用機構の解析

腸内細菌は、腸炎の発症に深く関わることから、腸内細菌により CEACAM20-SAP-1 系が制御される可能性があるかについて解析を行う目的で、腸内細菌依存的に炎症性腸炎を発症するモデルマウスと CEACAM20 KO マウスとの交配を行い、腸炎に与える影響を検討した。その結果、CEACAM20 の遺伝子破壊を行った炎症性腸炎モデルマウスにおいて、その腸炎の症状が強まる傾向が認められた。

また、これまでに、研究代表者らは SAP-1 遺伝子破壊マウスを用いた解析から、SAP-1 の遺伝子欠損が、腸上皮細胞の微絨毛でのタンパク質チロシンリン酸化を増強することを見出していた。そこで、SAP-1-CEACAM20 系が腸内細菌を介して、腸上皮細胞の微絨毛におけるタンパク質チロシン化の制御に関与する可能性を検討する目的で、SAP-1 KO マウスに抗生剤を摂取させた後、腸上皮細胞におけるチロシンリン酸化について抗チロシンリン酸化抗体による免疫染色を試みた。その結果、抗生剤を含まない飲料水にて飼育した SAP-1 KO マウスに比べ、抗生剤を含む飲料水で飼育した SAP-1 KO マウスの小腸上皮細胞の絨毛部におけるチロシンリン酸化タンパク質の免疫染色のシグナルの減弱を認めた。

4) 腸内細菌叢と SAP-1 および CEACAM20 の細胞外領域の相互作用とそのリガンドの探索

CEACAM20 が属する CEACAM ファミリー分子には、その細胞外領域を介して特定の細菌の持つタンパク質との結合活性を有する CEACAM1 や CEACAM6 などが存在する。このことから、ある種の腸内細菌由来タンパク質などが CEACAM20 の細胞外領域に結合するリガンド分子である可能性が考えられる。また、SAP-1 も同様にその腸上皮細胞における局在から、腸内細菌由来タンパク質などの受容体として機能する可能性もある。そこで、SAP-1 および CEACAM20 の細胞外領域に結合するリガンド分子を検索する目的で、ヒト IgG の Fc 領域と SAP-1 および CEACAM20 の細胞外領域の融合タンパク質の発現ベクターを構築し、培養細胞に発現させることで、SAP-1-Fc および CEACAM20-Fc 融合タンパク質の作製を進めた。さらに、CEACAM20-Fc に特異的に結合するタンパク質が存在する可能性について、CEACAM20-Fc を用いたアフィニティー精製を行い、糞便溶液から CEACAM20 の細胞外領域に結合するタンパク質の有無を検討した。その結果、コントロールのヒト IgG とは異なり、複数の糞便中に含まれるタンパク質が CEACAM20-Fc と特異的に結合する可能性が示唆された。

3 研究成果

- 1) SAP-1 の基質分子であり膜型分子である CEACAM20 は、腸内細菌依存的な発現変化を示すが、SAP-1 は CEACAM20 と異なり、腸内細菌依存的な発現調節を受けない可能性が高いと考えられた。一方、CEACAM20 の腸上皮細胞における発現制御には、芽胞形成を行う腸内細菌が関与する可能性が示唆された。
- 2) CEACAM20 遺伝子破壊マウスを用いた解析から、CEACAM20 が非常にダイナミックな腸内細菌の変動を生み出す可能性は低いと考えられた。
- 3) 腸内細菌とその発症が密接に関連する炎症性大腸炎のモデルマウスにおいて、CEACAM20 の欠損が、その腸炎の増悪化に繋がる可能性が示唆された。
- 4) 腸内細菌依存的な腸上皮細胞におけるタンパク質チロシンリン酸化の制御に、SAP-

1 が制御する可能性があると考えられた。

- 5) 腸内細菌を含む腸内容物中に CEACAM20 の細胞外領域に特異的に結合する可能性のあるタンパク質が存在し、そのタンパク質が CEACAM20 のリガンド分子となりうる可能性が示唆された。

4 生活や産業への貢献および波及効果

近年、腸内細菌がクローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患や大腸がんのみならず、糖尿病、自閉症や関節リウマチなどの自己免疫疾患の発症に密接に関わることが明らかとなりつつある。従って、本研究成果を基礎に、さらに SAP-1 や CEACAM20 を介した腸内細菌の変化、また腸内細菌と CEACAM20 や SAP-1 との相互作用を介した腸上皮細胞による腸管免疫制御機構の解明を行うことは、今後、腸疾患のみならず、様々な自己免疫疾患や精神疾患など様々な疾患の診断や治療法の開発に貢献する可能性がある。さらに、そのことにより CEACAM20 や SAP-1 の機能を制御する薬剤の開発が進むことで、多大な社会的価値・経済的価値の創出をもたらすことが期待される。