

博士論文（要約）

Probiotic-derived polyphosphate improves the intestinal
barrier function through the caveolin-dependent
endocytic pathway

（腸上皮エンドサイトーシスによる細菌由来ポリリン酸の取り込み
を介した腸管バリア機能増強作用の研究）

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

田中 一之

（藤谷 幹浩，小西 弘晃，上野 伸展，嘉島 伸，笹島 順平，
盛一 健太郎，生田 克哉，田邊 裕貴，高後 裕）

【背景・目的】

腸管内には 1000 種を超える腸内細菌が存在し、宿主の腸管の恒常性を保つと同時に、多くの消化器疾患の病態に強く関連することが示唆されている。腸管上皮における腸内細菌の認識機構として、Toll like receptors (TLRs) や Nods などのパターン認識受容体 (pattern recognition receptors; PRRs) が発見されており、これらは lipopolysaccharide (LPS) や lipoteichoic acid (LTA) などの菌由来成分を認識する。TLR のシグナルは炎症性サイトカインの産生を誘導し、腸管を含め臓器における炎症を引き起こす。Nods は細胞内で細菌成分を認識し、NF-kappaB 経路を活性化する。このように、PRRs は主に病原菌の菌体成分などを認識し腸管炎症を惹起する。

一方、宿主に有益な菌 (プロバイオティクス) に対する認識機構については、その一部が病原菌と同様に PRRs を介する経路であることが知られているが、残りの大部分の菌では認識機構が不明である。我々の研究室では、プロバイオティクスであるバシラス菌由来の competence and sporulation factor (CSF) が、腸管上皮の有機体トランスポーターによって上皮内に取り込まれることで認識され、腸管保護作用を発揮することを明らかにした。その他にも、腸管炎症改善効果を有するプロバイオティクス由来物質として LGG 乳酸菌由来 p40・p75 の報告がある。さらに、我々の研究室では乳酸菌から分泌される腸管保護物質ポリリン酸を同定し、これが腸管炎症や線維化を改善することを突きとめた。この菌由来ポリリン酸は腸管上皮の integrin $\beta 1$ との結合を介して腸管保護作用を発揮することも明らかになり、TLRs や Nods などの PRRs とは異なる経路で腸管上皮細胞に認識され作用を発揮することが示唆された。しかしながら、その詳細なメカニズムは不明である。

本研究では、ポリリン酸が腸管上皮 integrin $\beta 1$ に認識された後の動態および腸管上皮への作用機序について明らかにする。

【方法】

1. ポリリン酸の合成

混合液(50mM Tris -HCl(pH7.4), 40mM ammonium sulfate, 4mM MgCl₂, 40mM creatine phosphate, 20ng/ml creatine kinase, 1mM ATP(pH7.2), 1U の polyphosphate kinase(PPK)を反応させポリリン酸を合成した。

2. 細胞株

Caco2/bbe 細胞(ヒト腸管上皮由来細胞株)を用いた。

3. sh(short hairpin)RNA の導入

レンチウイルス発現ベクターを用いて Caco2bbe 細胞に integrin $\beta 1$, caveolin-1 の shRNA を導入した。ノックダウン効率は Real-time PCR および

Western blotting にて確認した。

4. マンニトール漏出試験

トランスウエルに Caco2/bbe 細胞を培養し, NH_2Cl を用いて酸化ストレスを負荷した。 ^3H 標識マンニトールを上部 well に投与し, 1, 2, 3 時間後に下 well へ漏出したマンニトールを測定することにより腸管バリア機能を評価した。

5. ^{32}P ポリリン酸の動態試験

^{32}P 標識 ATP を用いて上記 1. と同様の方法で ^{32}P 標識ポリリン酸を作製した。 Caco2/bbe 細胞に ^{32}P 標識ポリリン酸を投与後, 培養液および細胞成分に含まれる ^{32}P を測定することにより細胞内外のポリリン酸の分布を評価した。

6. Western blotting

解析対象の細胞から蛋白を精製し SDS-PAGE にて電気泳動を行った。ニトロセルロースメンブレンへ転写し下記に示す一次抗体を用いて特異的な蛋白を検出し, 画像解析ソフト image J で発現量を評価した。用いた一次抗体は、リン酸化 p38 MAPK, HSP27, tumor necrosis factor alpha-induced protein 3(TNFAIP3), thymosin beta 4(TMS β 4) に対する単クローン抗体である。

7. Real-time PCR

解析対象の細胞から RNA を分離し, 逆転写にて cDNA を作製した。これをテンプレートとして integrin β 1, caveolin-1, TNFAIP3, TMS β 4, dual specificity phosphatase 2(DUSP2) の cDNA 配列に特異的な配列を持つプライマーを用いて PCR を行った。

8. High-throughput sequencing

Caco2/bbe 細胞にポリリン酸を投与し, 3 時間後に RNA を分離した。これをテンプレートとして発現量が変化する mRNA を網羅的に解析した。

9. 蛍光免疫染色

Caco2/bbe 細胞にポリリン酸を加え, X-press 配列で標識されたポリリン酸結合蛋白およびこの配列に対する単クローン抗体を用いて腸管上皮内外のポリリン酸の動態を評価した。観察は共焦点顕微鏡にて行った。

10. 統計処理

有意差検定には Student's t-test を用い, $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した。

【結果】

1. ポリリン酸の細胞内への取り込み

^{32}P 標識ポリリン酸は 1 時間後に細胞内へ取り込まれ, その後時間経過とともに細胞外へ移行し, 48 時間後にはほとんどが細胞外へと移行した。蛍光免疫染色でも同様の細胞内外の移動を認めたが, integrin β 1 発現抑制によりポリリ

ン酸の細胞への集積は低下した。integrin β 1 は上皮細胞膜上の脂質ラフトを形成する caveolin-1 との相互作用があることから、ポリリン酸が caveolin-1 依存性のエンドサイトーシスにより細胞へ取り込まれると仮定し、検討を行った。免疫沈降 western blotting を行った結果、ポリリン酸が Caco2/bbe 細胞株において caveolin-1 との複合体を形成することが明らかになった。この複合体は integrin β 1 発現抑制により形成が低下した。 ^{32}P 標識ポリリン酸の細胞内取り込みも caveolin-1 発現抑制によって有意に減少した。以上より、ポリリン酸は腸管上皮 integrin β 1 により認識され、caveolin-1 依存性のエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれることが示された。

2. ポリリン酸の細胞保護作用

Western blotting にて細胞保護蛋白 Hsp27 およびリン酸化 p38 MAPK の発現を検討した結果、ポリリン酸投与に両者とも有意に発現が誘導された。この作用は integrin β 1, caveolin-1 発現抑制により有意に抑制された。マンニトール漏出試験で腸管バリア機能を検討した結果、ポリリン酸投与により腸管バリア機能の増強が認められたが、その作用は integrin β 1, caveolin-1 発現抑制により消失した。以上より、ポリリン酸は integrin β 1-caveolin-1 依存性エンドサイトーシスを介して腸管バリア機能を増強することが示された。

3. ポリリン酸投与による TNFAIP3 の発現誘導

high-throughput sequencing 解析にてポリリン酸投与で 2 倍以上発現変化があり、かつ P 値 0.05 未満であった 154 個の mRNA を抽出し、バリア機能増強作用に関連する TNFAIP3, TMS β 4, DUSP2 を候補分子として同定した。そのうち、細胞株へのポリリン酸投与により mRNA, タンパク発現量ともに有意に発現が変化した分子は TNFAIP3 のみであった。

【考察】

本研究によって、細菌由来のポリリン酸が integrin-caveolin 依存性のエンドサイトーシスにより腸管上皮細胞に取り込まれ、p38 MAPK の活性化と Hsp27 の誘導により細胞保護作用を発揮するという新たな宿主 - 細菌相互作用メカニズムが明らかになった。以前我々はバシラス菌由来の分子が細胞膜トランスポーターによる取り込みを介して認識されることも明らかにしており、プロバイオティクスの認識には PRRs を介さない経路が存在すると考えられる。本研究では細菌由来物質であるポリリン酸がカベオリン依存性エンドサイトーシスにより腸管上皮へ取り込まれることが初めて示された。

また、high-throughput sequencing 解析によりポリリン酸投与によって発現量に変化する主な分子が TNFAIP3 であることを突き止めた。TNFAIP3 は TNF α /NF- κ B シグナルを強力に抑制すること、腸管バリア機能を増強することが

知られており、ポリリン酸は TNFAIP3 の発現誘導を介して腸炎改善や腸管バリア機能の回復などの有益な作用を発揮すると考えられる。

この新規の宿主 - 細菌間の相互作用がさらに解明されることで、PRRs に限定されない種を超えた宿主 - 細菌間クロストーク解明に向けた新分野の創設が期待される。さらには、細菌由来の物質の認識や取り込み機構に着目し、消化器疾患の新たな治療標的の開発が期待される。

【引用文献】

1. Fujiya M, Musch MW, Nakagawa Y, et al. The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. *Cell Host Microbe* 2007;1:299-308.
2. Segawa S, Fujiya M, Konishi H, et al. Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway. *PLoS One* 2011;6:e23278.
3. Kashima S, Fujiya M, Konishi H, et al. Polyphosphate, an active molecule derived from probiotic *Lactobacillus brevis*, improves the fibrosis in murine colitis. *Transl Res.* 2015;166:163-75.