

貪食細胞が小腸管腔中へ伸長する 樹状突起の機能解析

東京大学 定量生命科学研究科免疫・感染制御研究分野
森田 直樹

腸管組織を構成する上皮細胞や免疫細胞は、細胞特異的な機能を介して腸管恒常性の維持に寄与することが知られているが、その詳細なメカニズムに関しては不明な点が多い。小腸に存在する自然免疫細胞の一種である貪食細胞は乳酸またはピルビン酸に反応して小腸上皮細胞間から樹状突起を腸管管腔中へ伸長することで、腸管上皮細胞同様に腸管管腔面と接することのできる数少ない細胞種の一つである。腸管管腔面に接する腸管上皮細胞は生理活性分子を管腔中へと分泌することで腸管恒常性維持に寄与している。小腸貪食細胞も樹状突起を介して腸管管腔面に接することから、上皮細胞同様に生理活性分子を腸管管腔中へと分泌することで、正常な腸内細菌叢維持に寄与している可能性が示唆される。これらの仮説をもとに本研究では小腸貪食細胞が管腔中へと分泌する生理活性分子の同定及びそれによる腸管恒常性維持への寄与の解明を目的に研究を行った。

私たちはRNA-seqの結果をもとに腸管組織においてGroup IID-secreted phospholipase A2 (PLA2G2D) と呼ばれる分泌型リパーゼが小腸およびパイエル板のCX₃CR1⁺貪食細胞に高発現していることを明らかにした。本分子はグラム陰性菌には活性がないものの、リステリア菌のようなグラム陽性菌に対して抗菌活性を持つことが報告されている。この分子が腸管組織においてCX₃CR1⁺貪食細胞に特異的に高発現しているかを明らかにするために、腸管上皮細胞および種々の腸管免疫細胞における発現を評価したところ小腸およびパイエル板のCX₃CR1⁺貪食細胞

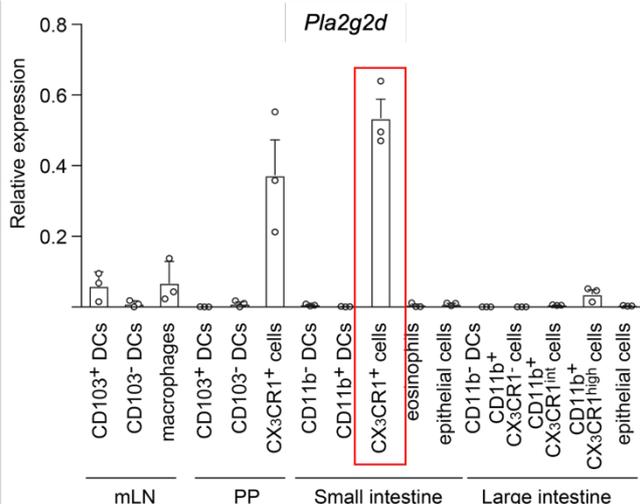


図1:腸管免疫細胞における*Pla2g2d*の発現
各臓器に存在する自然免疫細胞を分取し、RNAを回収後*Pla2g2d*分子の発現をqPCRに測定した。
DC: dendritic cells mLN: mesenteric lymph node
PP: peyer's patches

およびパイエル板のCX₃CR1⁺貪食細胞に局限した高発現が確認された(図1)。これらの結果から、私たちはPLA2G2D分子がCX₃CR1⁺貪食細胞の樹状突起伸長を介して小腸管腔中へと分泌されることで、正常な腸管環境の維持に寄与するのではないかと考え本分子に着目して研究を行った。実際にCX₃CR1⁺貪食細胞の樹状突起依存的に管腔中へとPLA2G2D分子が分泌されているかをELISA法にて検討した。結果、PLA2G2D分子はCX₃CR1⁺貪食細胞が樹状突起を管腔中と伸長している、小腸内容物中でのみ検出され大腸および盲腸内容物中では検出限界以下であった。

私たちは、これまでに樹状突起伸長に必須の分子の一つとして、G-protein coupled receptor 31 (GPR31)分子を同定している。本分子を欠損するマウスでは管腔中へと樹状突起を伸長するCX₃CR1⁺貪食細胞の割合が顕著に低下していることをこれまでに明らかにしている。そこで実際にPLA2G2D分子が小腸CX₃CR1⁺貪食細胞の樹状突起依存的に管腔中へと分泌されているかGPR31欠損マウスを用いて評価した。結果、野生型に比較してGPR31欠損マウスでは小腸管腔中のPLA2G2D分子濃度が有意に低下していることが確認された。上記の結果から、小腸CX₃CR1⁺貪食細胞はGPR31分子に依存した樹状突起を介してPLA2G2D分子を小腸管腔中へと分泌されていることが示唆された。

これまでの研究で、PLA2G2D分子はグラム陽性菌に対して *in vitro* において抗菌活性を持つことが報告されている。そこで私たちは実際に小腸管腔中へと分泌されたPLA2G2D分子が感染性のグラム陽性病原性細菌に対して抗菌活性を持つのかをPLA2G2D分子欠損マウスを用いて実験を行った。私たちは野生型およびPLA2G2D分子欠損マウスにグラム陽性菌である、*Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) を経口的に感染させ、感染後の生存率および体重減少率を観察した。結果、野生型マウスに比較して

PLA2G2D分子欠損マウスでは有意な生存率の低下および体重減少率の増加が確認された(図2)。また、*L. monocytogenes*を腹腔内投与にて全身性に感染させた場合は、野生型およびPLA2G2D分子欠損マウス間で感染感受性に差異が確認されなかった。このことから、腸管腔中を介して感染が生じる場合でのみ、PLA2G2D分子は*L. monocytogenes*に作用していることが示唆された。また、グラム陰性菌である *Salmonella Typhimurium* を経口感染させた場合においても両群間で感染感受性に差異が確認されないことからPLA2G2D分子はグラム陽性菌に対して作用していることが *in vivo* の感染実験においても確認がされた。上記の結果から、小腸CX₃CR1⁺貪食細胞の樹状突起を介して管腔中へと分泌されたPLA2G2D分子は病原性グラム陽性菌に対して防御的に作用することで、これらの感染症に対して防御的に作用していることが明らかとなった。

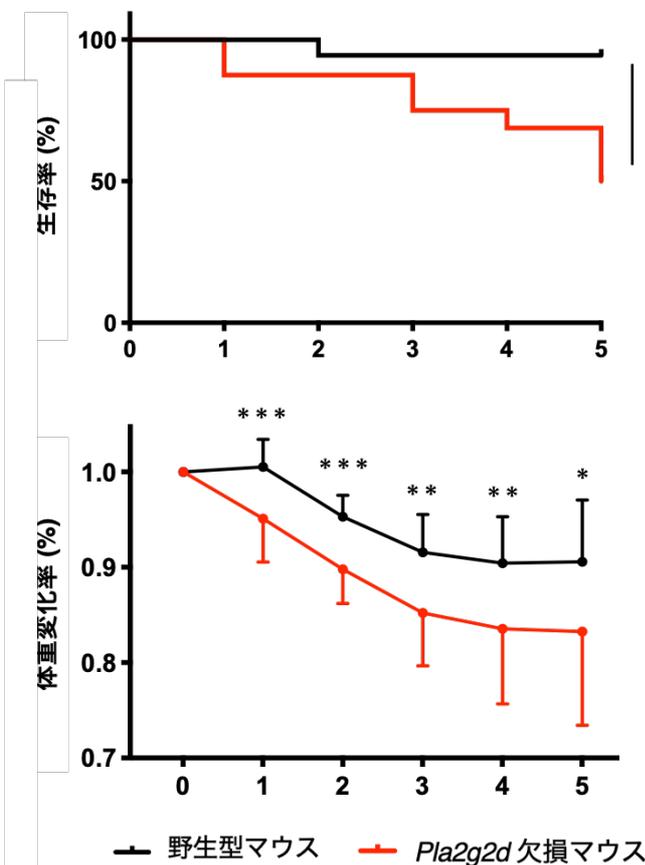


図2: *L. monocytogenes* 経口感染時における PLA2G2D分子が病態感受性に与える影響

L. monocytogenes(5x10⁹ CFU)を経口的に野生型およびPLA2G2D分子欠損マウスに経口的に感染させ感染後の病態感受性を生存率および体重変化を指標に評価した。

Log-rank test *** = $P < 0.005$ Student *t* 検定 * = $P < 0.05$
 ** = $P < 0.01$
 *** = $P < 0.005$

私たちは *L. monocytogenes* の様な病原性細菌のみならず腸内細菌に対しても、小腸CX₃CR1⁺貪食細胞の樹状突起を介して管腔中へと分泌されたPLA2G2D分子が作用しうるかを評価した。若齢期である8-12週齢目の野生型マウスおよびPLA2G2D分子欠損マウス間

においては小腸腸内細菌叢組成に大きな違いが確認されなかった。一方で、マウスが高週齢の40週齢目以降においてはPLA2G2D分子欠損マウスの小腸管腔中においてグラム陽性菌の割合が顕著に増加していた。これに相関してPLA2G2D分子欠損マウスでは加齢に伴い通常食の食餌にも関わらず体重量・肝臓組織重量・白色脂肪組織重量の増加が確認された。これらの症状にグラム陽性菌の増加が関与するかを明らかにするために野生型およびPLA2G2D分子欠損マウスが4週齢目の時点から、グラム陽性菌に対して抗菌活性を持つバンコマイシンを症状が確認された40週齢目まで自由飲水にて投与を行った。結果、バンコマイシンの投与で加齢に伴いPLA2G2D分子欠損マウスで確認された、体重量・肝臓組織重量・白色脂肪組織重量の増加はほとんど認められなかった。加えて肝臓組織においてPLA2G2D分子欠損マウスではグラム陽性腸内細菌依存的に脂肪滴の高度な沈着が確認された。これらの結果からPLA2G2D分子は正常な小腸腸内細菌叢の維持を介して加齢に伴う肥満様症状の制御を行うことが示唆された。