



Regulation by gut commensal bacteria of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule expression in the intestinal epithelium

Kitamura, Yasuaki

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6461号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006461>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Regulation by gut commensal bacteria of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule expression in the intestinal epithelium

腸内常在菌による carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule の
腸上皮における発現制御

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

消化器内科学

(指導教員：東 健 教授)

北村 泰明

(目的)

腸内常在菌は免疫細胞のサイトカイン産生や腸上皮細胞の遺伝子発現（細胞間接着や細胞増殖に関わる因子、抗菌ペプチドなど）を制御し、両細胞の機能制御に重要な役割を果たすと考えられている。Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEACAM) ファミリーはイムノグロブリンスーパーファミリーのサブグループの 1 つであり、ヒト、マウスにおいてそれぞれ 12 種類、8 種類の異なる CEACAM が存在する。中でも膜蛋白質である CEACAM1 は、腸管を含む様々な組織に発現している。腸管では腸上皮細胞に発現し、培養細胞や CEACAM1 遺伝子破壊マウスを用いた解析から、細胞増殖を負に制御する因子であることが示唆されている。さらに、炎症性サイトカイン TNF- α や IFN- γ 刺激を受けた大腸癌由来上皮細胞や *Neisseria gonorrhoeae* 感染を受けたヒト卵巣表層上皮細胞において CEACAM1 の発現量の増加が報告されているが、腸内常在菌が正常な腸上皮細胞における CEACAM1 の発現制御に関与しているかについては明らかとはなっていない。また、CEACAM20 も CEACAM1 と同様にヒト、マウスに存在する膜蛋白質であり、マウスでは腸管や精巣にその mRNA の発現が報告されている。最近、ヒトの前立腺上皮細胞において CEACAM1 と CEACAM20 の発現が認められ、両者が *in vitro* の解析から前立腺の形態形成に関わっていることが示唆されている。しかしながら、腸管での CEACAM20 の発現様式やその制御機構についてはほとんど明らかとなっていない。そこで本研究では、腸内常在菌による腸上皮細胞における CEACAM1 と CEACAM20 の発現制御について検討した。

(方法、結果及び考察)

成体マウス腸管における CEACAM1、CEACAM20 の発現及びその局在を検討する目的で、マウスより小腸及び大腸を単離し、パラホルムアルデヒドにて固定後、凍結切片を作製し、抗 β -Catenin 抗体と抗 CEACAM1 抗体又は抗 CEACAM20 抗体を用いた二重免疫染色を行った。その結果、CEACAM1 及び CEACAM20 が共に腸上皮細胞のアピカル面に特異的な発現を示すことが明らかとなった。また、腸上皮細胞の微絨毛に局在する蛋白質 EBP-50 に対する抗体と抗 CEACAM1 抗体による二重免疫染色の結果から、CEACAM1 と EBP-50 の共局在が認められ、さらに、抗 CEACAM1 抗体と抗 CEACAM20 抗体による免疫染色から CEACAM1 と CEACAM20 の共局在が観察され、これらから両 CEACAM は腸上皮細胞の微絨毛に共局在する膜蛋白質であることが強く示唆された。また、抗 CEACAM1 抗体、抗 CEACAM20 抗体及び抗 β -Tubulin 抗体を用いたウエスタンブロットによる解析から、マウス小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（盲腸、近位大腸、遠位大腸）の各部位の腸上皮細胞において両 CEACAM 蛋白質の発現が確認された。

そこで、腸内常在菌が CEACAM1、CEACAM20 の発現制御に関与するかについて検討する目的で、野生型マウスに抗生素（アンピシリン、バンコマイシン、メトロニダゾール、ネオマイシン）を含む飲料水を 4 週間摂取させた後、小腸、大腸より単離した上皮細胞を用い、ウエスタンブロットにより両蛋白質の発現量について定量的解析を試みた。その結果、抗生素投与により小腸上皮細胞では CEACAM1 及び CEACAM20 蛋白質の発現量の著明な低下を認め、一方、大腸上皮細胞では両者の発現量の低下及び上昇を認めなかった。この結果と一致し、免疫組織染色の解析から、抗生素投与後マウスでは、小腸上皮細胞での CEACAM1、CEACAM20 の染色シグナルの著明な減弱を認めた。さらに、小腸上皮細胞より抽出した RNA を用いたリアルタイム PCR による CEACAM1、CEACAM20 の mRNA の発現量の解析からも、両者の mRNA の発現量の著明な低下が抗生素投与マウスにおいて認められた。また、無菌マウスにおいても、小腸上皮細胞での

CEACAM1、CEACAM20 蛋白質及び mRNA の発現量の低下を認めた。以上の結果から、腸内常在菌が小腸上皮細胞での両 CEACAM の mRNA 及び蛋白質の発現を促進することが示唆された。加えて、アンピシリン又はバンコマイシンの単独投与を行ったマウスでは、小腸上皮細胞での CEACAM1、CEACAM20 の著明な蛋白質の発現低下を認めたが、メトロニダゾール又はネオマイシン単独投与マウスでは両蛋白質の発現量の低下を認めなかった。さらに、バンコマイシンを投与したマウスでは、免疫組織染色及びリアルタイム PCR による解析から CEACAM1、CEACAM20 の蛋白質及び mRNA の発現量の著明な低下を認め、一方、ネオマイシン投与マウスでは、同様の低下を認めなかった。バンコマイシン及びアンピシリンは特にグラム陽性菌に対し抗菌作用を示し、ネオマイシンは特にグラム陰性菌に抗菌作用を示すことから、腸内常在菌の中でもグラム陽性菌が、両 CEACAM の発現制御に関与することが示唆された。

腸内常在菌は、免疫細胞による TNF- α や IFN- γ などのサイトカインの産生を促すことが知られている。実際、バンコマイシン 4 週間投与後のマウスの小腸では、TNF- α 及び IFN- γ の mRNA の発現量の低下が確認された。そこで、これらのサイトカインが腸上皮細胞での CEACAM1、CEACAM20 の発現の促進に関与するかについて、腸オルガノイド培養系を用い解析を試みた。腸オルガノイド培養系（腸上皮細胞のみで構成）は、マウス小腸のクリプトを単離し、マトリケル内に上皮細胞増殖因子、R-spondin1 及び Noggin 存在下で培養することでクリプトが細胞増殖と分化を繰り返し、絨毛構造を形成する培養系である。この腸オルガノイド由来上皮細胞では、内在性に CEACAM1 及び CEACAM20 の発現を認め、TNF- α 、IFN- γ 刺激 12 時間後の両者の mRNA の発現量を解析したところ、IFN- γ 刺激では、CEACAM1 及び CEACAM20 の mRNA が、一方、TNF- α では CEACAM1 の mRNA のみの発現量の有意な増加を認めた。さらに、TNF- α 及び IFN- γ 刺激 24 時間後における CEACAM1 及び CEACAM20 蛋白質の発現量についても、IFN- γ 刺激では両蛋白質の増加を、TNF- α では CEACAM1 のみの発現量の増加傾向を認めた。

すなわち、腸内常在菌を介した TNF- α および IFN- γ の産生が、小腸上皮細胞における両 CEACAM の発現の促進に関与すると考えられた。

腸内常在菌は、免疫細胞によるサイトカイン産生を促すのみならず、腸管内の食物繊維を代謝し、短鎖脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸など）を産生することが知られている。また、抗生素投与マウスや無菌マウスでは腸管内での短鎖脂肪酸量が、通常のマウスに比べ減少することが報告されている。そこで、CEACAM1 及び CEACAM20 の発現制御に酢酸、プロピオン酸、酪酸が関与するかについて検討した。腸オルガノイドを各短鎖脂肪酸により 12 時間刺激した後、CEACAM1 及び CEACAM20 の mRNA の発現量を検討したところ、CEACAM1 の mRNA の発現量は各短鎖脂肪酸刺激及び 3 種の短鎖脂肪酸の同時刺激による増加や減少は認めなかった。一方、CEACAM20 は酪酸単独及び 3 種の短鎖脂肪酸の同時刺激によりその mRNA の有意な増加を認めた。また、酪酸刺激 24 時間後における CEACAM1 及び CEACAM20 蛋白質の発現量の解析から、CEACAM20 蛋白質のみ発現量の著明な増加が明らかとなったことから、小腸上皮細胞における CEACAM20 の発現誘導への酪酸の関与が示唆された。さらに、酪酸がヒストン脱アセチル化酵素の阻害活性を有すること、また、MAP キナーゼ（Erk-1/2、p38、JNK）を活性化させることができることから、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタチン A 及び各 MAP キナーゼの阻害剤にて腸オルガノイドを処理したところ、CEACAM20 の mRNA の発現量の増加がトリコスタチン A 処理により認められ、その一方で、JNK の阻害剤により酪酸による CEACAM20 の mRNA の発現量の増加が抑制された。以上の結果から、腸内常在菌の代謝産物である酪酸が、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害、並びに JNK の活性化を介して CEACAM20 の発現量の増加に関与すると考えられた。

（結論）

CEACAM1 及び CEACAM20 は腸上皮細胞の内腔面に局在し、小腸上皮細胞特異的にその発現が腸内常在菌、特にグラム陽性菌により促進的に制御されることが示唆された。また、この腸内常在菌による両 CEACAM の発現制御には、免疫細胞から産生された炎症性サイトカイン IFN- γ 、TNF- α や、食物繊維の代謝産物である酪酸が関与することが強く示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2526 号	氏名	北村 泰明
論文題目 Title of Dissertation	<p>Regulation by gut commensal bacteria of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule expression in the intestinal epithelium</p> <p>腸内常在菌によるcarcinoembryonic antigen-related cell adhesion moleculeの腸上皮における発現制御</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner</p> <p>佐々木 克也</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>南 康博</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>川武 良介</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【研究目的】

腸内常在菌は免疫細胞のサイトカインの遺伝子発現のみならず、腸上皮細胞の遺伝子発現（細胞間接着や細胞増殖に関わる因子、抗菌ペプチドなど）を制御し、腸上皮細胞の機能制御に重要な役割を果たすと考えられている。イムノグロブリンスーパーファミリーに属する膜蛋白質である CEACAM1 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) は、腸上皮細胞に発現が認められ、腸上皮細胞の増殖を負に制御する因子であることが示唆されている。一方で、炎症性サイトカイン TNF- α や IFN- γ 刺激を受けた大腸癌由来上皮細胞や *Neisseria gonorrhoeae* 感染を受けたヒト卵巣表層上皮細胞においてその発現量の増加が報告されているが、腸内常在菌が腸上皮細胞での CEACAM1 の発現制御に関与するかについては明らかではない。また、本研究者らは最近、同じく膜蛋白質である CEACAM20 が腸上皮細胞に発現することを見出しているが、腸管における発現様式やその制御機構についてはほとんど明らかとなっていない。そこで、本研究では腸内常在菌による腸上皮細胞における CEACAM1、CEACAM20 の発現制御について検討を行った。

【研究方法及び結果、考察】

本研究者は、成体マウス腸管における CEACAM1、CEACAM20 の発現及びその局在を検討する目的で、マウスより小腸及び大腸を単離し、固定後、凍結切片を作製し、抗 β -Catenin 抗体と抗 CEACAM1 抗体又は抗 CEACAM20 抗体を用いた二重免疫染色を行った。その結果、CEACAM1 及び CEACAM20 が共に腸上皮細胞のアピカル面に特異的な発現を示すことが明らかとなった。更に、腸内常在菌が CEACAM1、CEACAM20 の発現制御に関与するかについて検討する目的で、野生型マウスに抗生剤（アンピシリン、バンコマイシン、メトロニダゾール、ネオマイシン）を含む飲料水を 4 週間摂取させた後、小腸、大腸より単離した腸上皮細胞を用い、ウエスタンプロットにより両蛋白質の発現量を定量的に解析した。その結果、抗生剤投与により小腸上皮細胞で CEACAM1、CEACAM20 蛋白質の発現量の著明な低下を認めた。更に、バンコマイシン、アンピシリンの単独投与において、著明な小腸上皮細胞での CEACAM1、CEACAM20 の発現低下を認めた一方で、ネオマイシン投与では低下を認めなかった。すなわち、腸内常在菌の中でも特にグラム陽性菌が、両 CEACAM の発現制御に関与することが示唆された。

腸内常在菌は、免疫細胞による TNF- α や IFN- γ などのサイトカインの産生を促すことが知られている。実際、バンコマイシン 4 週間投与後のマウスの小腸では、これらの mRNA の発現量の低下を認めた。更に、腸オルガノイドを TNF- α 又は IFN- γ で刺激後、CEACAM1、CEACAM20 の mRNA、蛋白質の発現量の解析から、TNF- α 刺激では CEACAM1 のみが、IFN- γ 刺激では CEACAM1 及び CEACAM20 の発現の増加を認めた。すなわち、腸内常在菌を介した TNF- α 及び IFN- γ の産生が、小腸上皮細胞における両 CEACAM の発現の促進に関与すると考えられた。また腸内常在菌は、腸管内の食物繊維を代謝し、短鎖脂肪酸

(酢酸、プロピオン酸、酪酸など)を産生することが知られている。興味深いことに、CEACAM20では酪酸単独及び3種の短鎖脂肪酸の同時刺激によりそのmRNAの有意な増加を認めたが、CEACAM1では増加や減少を認めなかった。酪酸がヒストン脱アセチル化酵素の阻害活性を有することから、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタンAにて腸オルガノイドを処理したところ、同様にCEACAM20のmRNAの発現量の増加が認められた。以上の結果から、腸内常在菌の代謝産物である酪酸が、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害を介してCEACAM20の発現量の増加に関与すると考えられた。

【結論】

本研究により、申請者らはCEACAM1及びCEACAM20が腸上皮細胞の内腔面に局在し、小腸上皮細胞特異的にその発現が腸内常在菌、特にグラム陽性菌により促進的に制御されることを明らかにした。また、この発現制御に、炎症性サイトカインTNF- α 、IFN- γ 及び酪酸が関与する可能性が示唆された。

本研究は、腸内常在菌による腸上皮細胞の遺伝子発現の制御機構について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。