

49. ATP 依存的な腸管恒常性の維持機構の解明

竹田 潔

大阪大学 大学院医学系研究科 免疫制御学

Key words : ATP, 腸管粘膜, 膜型 ATP 分解酵素, 形質細胞様樹状細胞

緒 言

細胞外のアデノシン 3 リン酸 (adenosine 5'-triphosphate: ATP) は、死細胞や活性化された細胞などから分泌され、免疫細胞を含めた様々な細胞に P2X や P2Y などのプリン受容体を介して作用し、細胞活性化や細胞死を誘導する。細胞外 ATP は、宿主組織内ばかりでなく、腸管腔にも高濃度存在し、腸管粘膜固有層の免疫細胞に作用し、腸管粘膜免疫応答を制御していることが知られている。そのため、腸管腔内の ATP 濃度を制御するため、腸管上皮細胞には、ecto-nucleotide triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPD) や ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) などの膜型 ATP 分解酵素が発現している。しかし、腸管上皮に発現している膜型 ATP 分解酵素による腸管免疫応答制御機構については、まだ解析が進んでいない。本研究では、小腸上皮に高発現する E-NPP3 に着目し、E-NPP3 による腸管粘膜免疫応答の制御機構を解析した。

方法および結果

1. E-NPP3 は小腸上皮に高発現する

これまでの報告で、E-NPP3 は、活性化された肥満細胞・好塩基球と網膜や子宮内膜の上皮に発現することが報告されている¹⁾。そこで、E-NPP3 の腸管における発現を E-NPP3 に対する単クローナル抗体を作製し、免疫染色により解析した。小腸の上部から下部 (part 1 から part 4) をそれぞれ抗 E-NPP3 抗体で染色すると、E-NPP3 は、小腸の上皮の内腔に接する最上層部分に高発現し、小腸上部に発現が高いことが明らかになった (図 1A)。次に、ATP 分解酵素である E-NPP3 が、小腸管腔内の ATP 濃度を制御するかどうかを *Enpp3* 欠損マウスを用いて解析した。*Enpp3* 欠損マウスでは、小腸のどの部位の内腔においても、ATP 濃度が高くなっていた (図 1B)。以上の結果から、E-NPP3 は、小腸上皮に発現し、小腸管腔内の ATP 濃度を制御することが明らかになった。

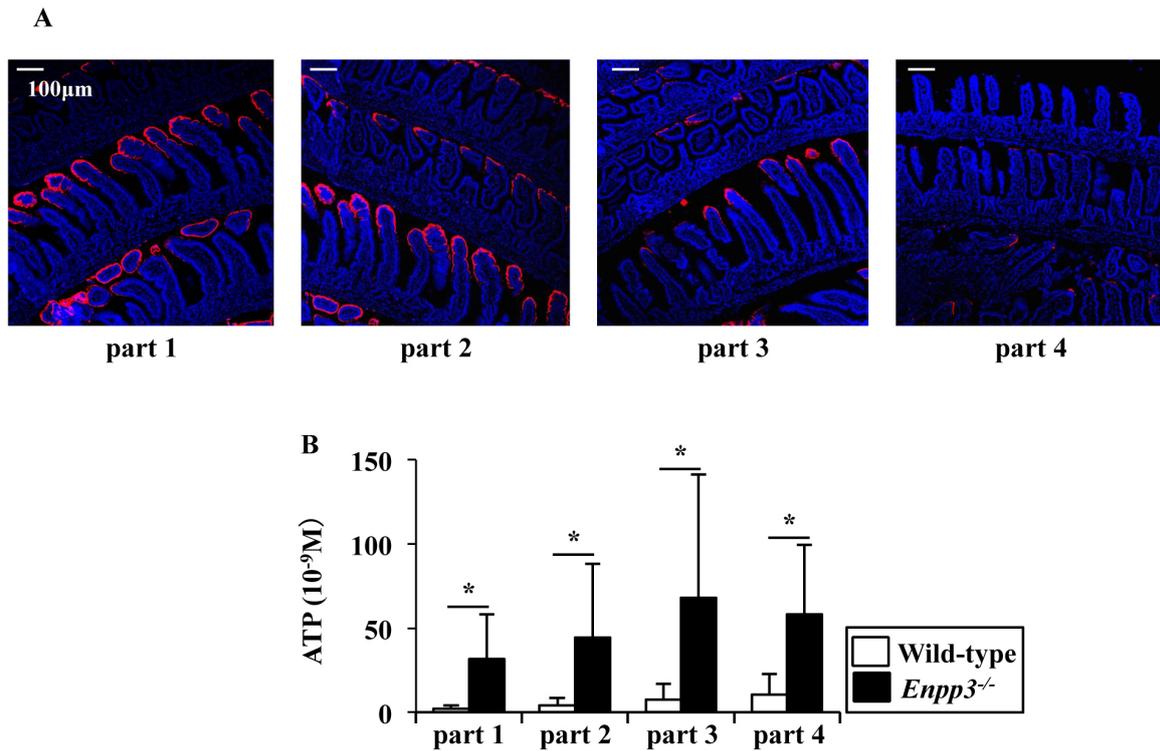


図 1. E-NPP3 は小腸上皮の管腔側に発現しており、腸管内腔 ATP 濃度を調節する

(A) マウス小腸の凍結切片を、抗 E-NPP3 抗体 (赤) と DAPI (青) にて免疫染色を行った。小腸の上部から下部 (part 1 から part 4) をそれぞれ観察したところ、E-NPP3 は小腸絨毛の先端部に発現しており、さらに上部小腸に高発現していた。

(B) Wild-type マウスと *Enpp3* 欠損マウスの小腸内腔の ATP 濃度を、上部から下部 (part 1 から part 4) にかけて、それぞれの部位で測定した。*Enpp3* 欠損マウスでは、いずれの部位においても ATP 濃度は高くなっていた。*: $P < 0.05$ (student's t-test) .

2. *Enpp3* 欠損マウスは、小腸の形質細胞様樹状細胞数が減少する

腸管内の ATP が腸管粘膜固有層の Th17 細胞の数を制御していることが報告されている^{2,3}。そこで、*Enpp3* 欠損マウス的小腸組織内の免疫細胞を解析した。既報にあるように、小腸管内の ATP 濃度の上昇と相まって、小腸粘膜固有層 (SILP) 内の Th17 細胞の数が増加していた。さらに、SILP 内で、CD11c^{med} PDCA-1⁺ の形質細胞様樹状細胞 (pDC) の数が有意に減少していた (図 2A)。CD11c^{high} 古典的樹状細胞 (cDC) の数は変化がなかった。SILP だけでなく腸管関連リンパ組織であるパイエル板 (PP) でも pDC の数が減少していた。次に、SILP で pDC が減少するメカニズムを解析した。*Enpp3* 欠損マウスの SILP や PP の pDC では、アポトーシス細胞で増加する annexin V 陽性細胞と active caspase-3 陽性細胞の数が、wild-type マウスより増加していた (図 2B, C)。以上の結果から、*Enpp3* 欠損マウス的小腸組織の pDC は、アポトーシスが亢進することにより、細胞数が減少していることが明らかになった。

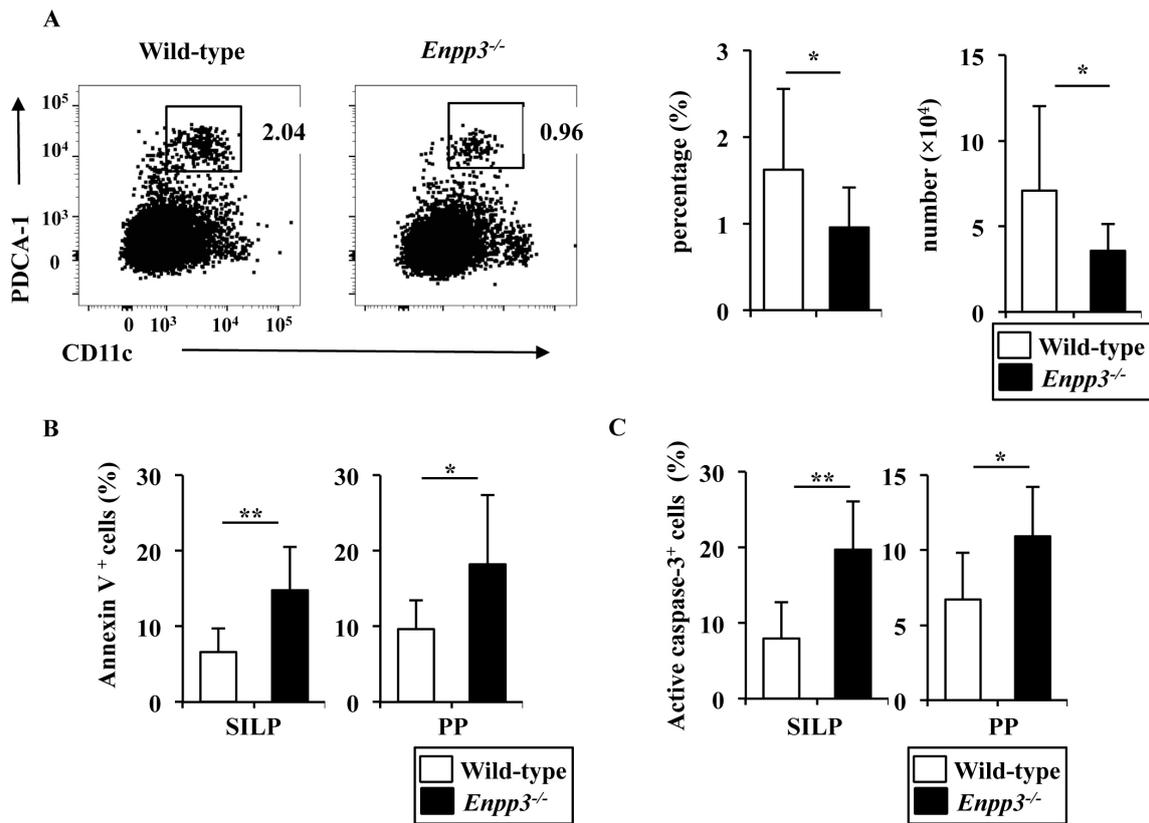


図 2. *Enpp3*欠損マウスの小腸 pDC ではアポトーシスが亢進し細胞数が減少している (A) Wild-type マウスと *Enpp3*欠損マウスの、小腸粘膜固有層内における形質細胞様樹状細胞 (pDC) をフローサイトメトリーで解析した。*Enpp3*欠損マウスにおいては pDC の細胞数が減少していた。(B, C) 小腸粘膜固有層 (SILP) およびパイエル板 (PP) の、pDC における annexin V 陽性細胞 (B) と active caspase-3 陽性細胞 (C) を解析した。Wild-type マウスの pDC に比較して *Enpp3*欠損マウスの pDC では、いずれの陽性細胞も増加しており、アポトーシスが亢進していることが明らかになった。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (student's t-test) .

3. 形質細胞様樹状細胞は ATP 誘導性アポトーシスに対する感受性が高い

次に、*Enpp3*欠損マウスの pDC でアポトーシスが亢進するメカニズムを解析した。ATP が細胞死を誘導することが報告されている。そこで、腸間膜リンパ節細胞を様々な濃度の ATP で 3 時間培養し、 $CD11c^{med} PDCA-1^{+}$ の pDC と $CD11c^{high} cDC$ における annexin V 陽性細胞と active caspase-3 陽性細胞の数を測定した。その結果、cDC では ATP を高濃度にしても annexin V 陽性細胞、active caspase-3 陽性細胞ともにそれほど増加しないが、pDC では、ATP 濃度依存性に陽性細胞が有意に増加した (図 3A, B)。以上の結果から、pDC は ATP 依存性のアポトーシスに対する感受性が極めて高いことが明らかになった。

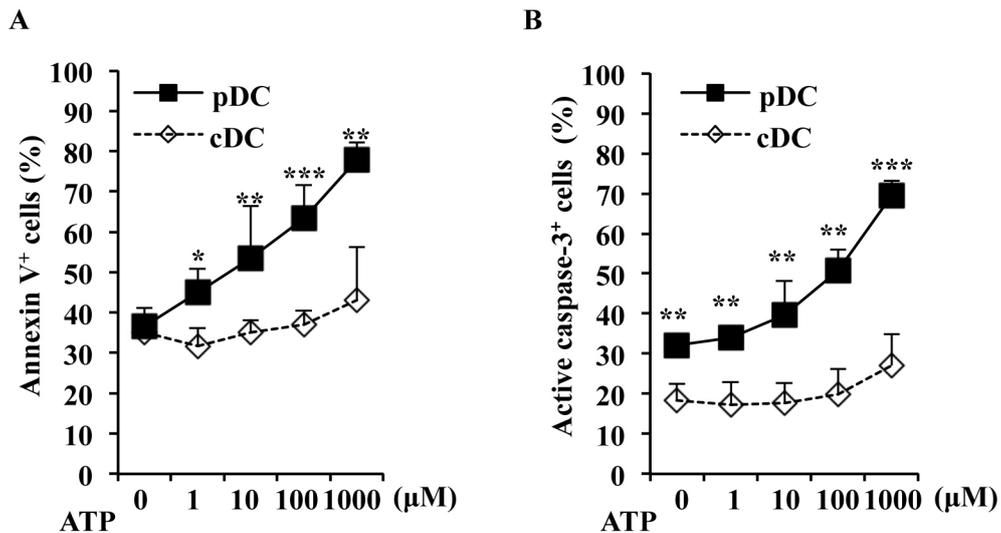


図3. pDCはATP依存性のアポトーシスに対する感受性が高い

(A, B) 腸間膜リンパ節細胞を様々な濃度のATPと共に培養し、形質細胞様樹状細胞(pDC)および古典的樹状細胞(cDC)における、annexin V陽性細胞(A)およびactive caspase-3陽性細胞(B)の数を測定し、誘導されるアポトーシスについて解析した。cDCではアポトーシスがほとんど誘導されないが、pDCではATP濃度依存的にアポトーシスが誘導された。pDCがATPに対して高感受性で、アポトーシスが誘導されることが示された。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ (student's t-test) .

4. ATPはP2X7を介し形質細胞様樹状細胞のアポトーシスを誘導する

ATPはP2X、P2Yのプリン受容体を介して細胞に作用する。中でもP2X7やP2X4がATP依存性のアポトーシス誘導に関与していることが報告されている。また、P2X7がpDCで高発現していた。そこで、ATP依存性のpDCのアポトーシス誘導におけるP2X7の役割を*P2rx7*欠損マウスを用いて解析した。Wild-typeマウスおよび*P2rx7*欠損マウスの腸間膜リンパ節よりpDCを単離し、種々の濃度のATPで3時間培養し、annexin V陽性細胞とactive caspase-3陽性細胞の数を解析した。Wild-typeマウスのpDCでは、ATP濃度依存的にannexin V陽性細胞、active caspase-3陽性細胞の数が増加するのに対し、*P2rx7*欠損pDCでは、annexin V陽性細胞、active caspase-3陽性細胞の増加がwild-typeに比べると低かった(図4A, B)。そこで、*Enpp3*と*P2rx7*の二重欠損マウスを作製した。*Enpp3*/*P2rx7*二重欠損マウスでは、SILPとPPのpDCの数が正常になった(図4C, D)。以上の結果から、ATPは、P2X7を介し、pDCに作用しアポトーシスを誘導することが明らかになった。

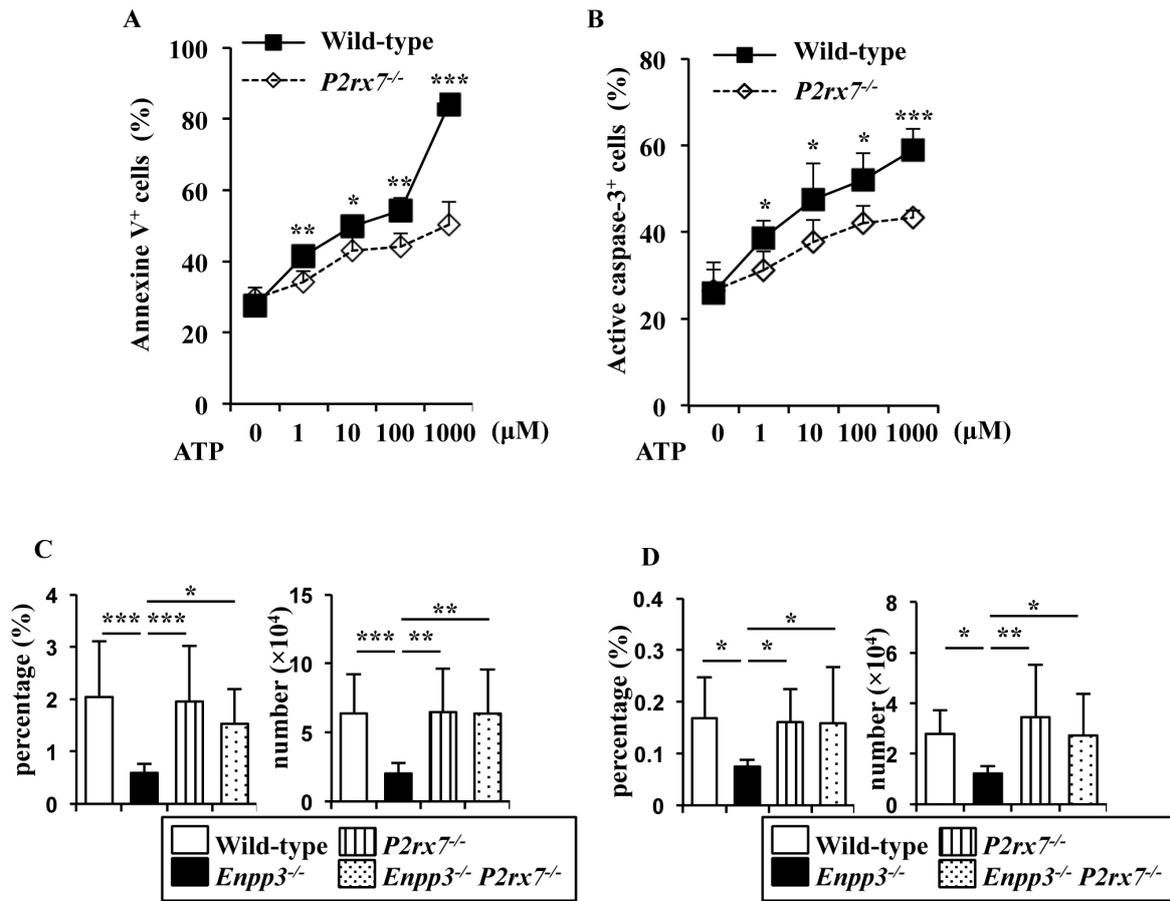


図4. ATPはP2X7を介してpDCにアポトーシスを誘導する

(A, B) Wild-type マウスおよび *P2rx7* 欠損マウスより腸間膜リンパ節細胞の形質細胞様樹状細胞 (pDC) を単離し、種々の濃度の ATP と共培養し、annexin V 陽性細胞 (A) および active caspase-3 陽性細胞 (B) の数を解析した。*P2X7* を欠損した pDC では、wild-type の pDC に比較して、誘導されるアポトーシスは少なかった。

(C, D) *Enpp3* および *P2rx7* の二重欠損マウスを作製して、小腸粘膜固有層 (C) およびパイエル板 (D) における pDC の細胞数をフローサイトメトリーにて解析した。*Enpp3*/*P2rx7* 二重欠損マウスにおいて、pDC の細胞数は wild-type と同等で、正常になっていた。ATP が *P2X7* を介して、pDC にアポトーシスを誘導し、細胞数を減少させていることが示された。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ (student's t-test) .

考 察

小腸上皮に発現する膜型 ATP 分解酵素 E-NPP3 が、小腸管腔内の ATP 濃度を調節し、小腸粘膜組織内の pDC の数を制御していることが明らかになった⁴⁾。pDC は、ウイルス感染時にウイルスを認識し、抗ウイルスサイトカインである I 型インターフェロンを産生する細胞である。ウイルスは感染細胞内で積極的に ATP を産生し、ウイルス増殖に利用するという報告がある。ウイルスが産生した ATP が、抗ウイルス活性を有する pDC の細胞死を誘導し、ウイルスにとって好ましい環境を作り出そうとしているかもしれない。そして、そのウイルスによる免疫回避システムを予防するため腸管上皮に発現する E-NPP3 が ATP を分解することにより、ATP 依存性の pDC の細胞死を抑制していることが考えられる。

文 献

- 1) Tsai SH, Kinoshita M, Kusu T, Kayama H, Okumura R, Ikeda K, Shimada Y, Takeda A, Yoshikawa S, Obata-Ninomiya K, Kurashima Y, Sato S, Umemoto E, Kiyono H, Karasuyama H, Takeda K. The ectoenzyme E-NPP3 negatively regulates ATP-dependent chronic allergic responses by basophils and mast cells. *Immunity*. 2015 Feb 17;42(2):279-93. doi: 10.1016/j.immuni.2015.01.015. PubMed PMID: 25692702.
- 2) Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, Yagita H, Ishii N, Evans R, Honda K, Takeda K. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature*. 2008 Oct 9;455(7214):808-12. doi: 10.1038/nature07240. Epub 2008 Aug 20. PubMed PMID: 18716618.
- 3) Kusu T, Kayama H, Kinoshita M, Jeon SG, Ueda Y, Goto Y, Okumura R, Saiga H, Kurakawa T, Ikeda K, Maeda Y, Nishimura J, Arima Y, Atarashi K, Honda K, Murakami M, Kunisawa J, Kiyono H, Okumura M, Yamamoto M, Takeda K. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7 controls Th17 cell responses through regulation of luminal ATP in the small intestine. *J Immunol*. 2013 Jan 15;190(2):774-83. doi: 10.4049/jimmunol.1103067. Epub 2012 Dec 14. PubMed PMID: 23241884; PubMed Central PMCID: PMC3539688.
- 4) Furuta Y, Tsai SH, Kinoshita M, Fujimoto K, Okumura R, Umemoto E, Kurashima Y, Kiyono H, Kayama H, Takeda K. E-NPP3 controls plasmacytoid dendritic cell numbers in the small intestine. *PLoS One*. 2017 Feb 22;12(2):e0172509. doi: 10.1371/journal.pone.0172509. eCollection 2017 Feb 22. PubMed PMID: 28225814; PubMed Central PMCID: PMC5321438.