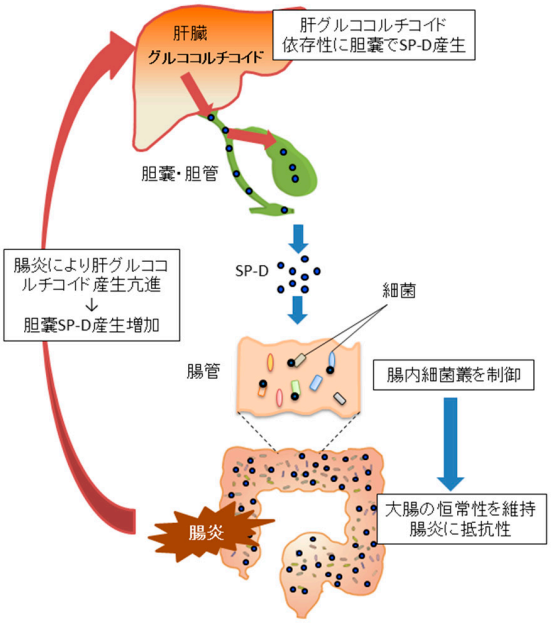
58	Surfactant protein Dによる新規の腸管細菌叢制御機構	西尾　純子

【目的】サーファクタントプロテイン D（SP-D）は、肺胞上皮細胞から主に分泌される抗菌タンパクとして呼吸器系の感染病原体の排除に貢献していることが知られている。しかし、他の臓器における SP-D の役割は知られていない。そこで、SP-D の消化器系臓器での役割を検討することを目的として本研究を行った。

【方法】臓器及び培養細胞の SP−D 遺伝子（*Sftpd*）発現の検討には quantitative RT-PCR（qRT-PCR）法を用いた。胆汁、培養上清中の SP-D 濃度は ELISA にて行った。糞便中の SP-D の検出には、免疫沈降後ウェスタンブロット法にて行った。腸内細菌叢および SP-D 結合細菌の解析には、細菌 16S リボソーマル RNA 解析により行った。SP-D の腸内細菌への結合性の検討では、糞便より採取した細菌を抗 SP-D 抗体と蛍光標識二次抗体で染色し、フローサイトメトリー解析を行うと同時に、セルソーターを用いて SP-D 結合細菌と非結合細菌を分離採取した。SP-D による *Lactobacillus murinus* の増殖抑制の検討には、MRS broth 中にリコンビナント SP-D を添加し、CTC アッセイにて生菌数を測定した。デキストラン硫酸塩（DSS）誘導性大腸炎は、野生型マウス、SP-D 欠損（SP-D$^{-/-}$）マウス、または、これらのマウスの糞便を経口投与した無菌マウスに 3〜3.5% DSS を飲水に入れて 7〜9 日間投与し誘導した。疾患活動性スコア（DAS）は、体重変化、糞便性状をもとに決定した。各臓器のコルチコステロイド濃度の検討には、臓器ホモジナイズの上清あるいは組織培養上清を用い ELISA 法で測定した。

【結果】消化器系臓器の中では特異的に胆嚢で SP-D が産生され、胆汁を介して消化管内へ分泌されていた。SP-D$^{-/-}$マウスでは、野生型マウスと比べて腸内細菌叢が変化しており、*Clostridia* IV 群や XIVa 群に分類される数種の細菌が減少し、*L. murinus* が著しく増加していた。細菌フローサイトメトリー解析により、腸内細菌中の *L. murinus* は SP-D と直接結合していることが判明した。実際 *in vitro* では SP-D が *L. murinus* の増殖を抑制することを見出した。さらに、SP-D$^{-/-}$マウスでは、DSS 誘導性腸炎に対する感受性が増強していたこと、また、SP-D$^{-/-}$マウスあるいは野生型マウスの糞便を投与した無菌マウスで DSS 誘導性腸炎を誘導すると、SP-D$^{-/-}$マウス糞便を投与したマウスで大腸炎が有意に重篤になったことから、SP-D が腸内細菌叢を制御し腸管恒常性維持に貢献していることが示された。一方、大腸炎においては、肝臓におけるグルココルチコイドの産生が亢進し、それにより胆嚢における SP-D の発現が高まることをも見出した。一連の結果から、“肝—胆—腸内細菌叢を軸とした SP-D による腸管恒常性の維持機構”が存在することが示唆された。

肝—胆嚢—腸内細菌叢を軸とする SP-D による恒常性維持機構



58. Surfactant protein D による新規の腸管細菌叢制御機構

西尾　純子

東京大学 生産技術研究所 炎症・免疫制御学社会連携研究部門

Key words：サーファクタントプロテイン D，腸内細菌叢，胆嚢，腸炎，グルココルチコイド

緒　言

サーファクタントプロテイン D（SP-D）は、肺の 2 型肺胞上皮細胞から主に分泌されるコレクチンファミリーに属する抗菌タンパクであり、インフルエンザウイルス排除などに貢献していることが知られている［1～3］。SP-D の抗菌作用は、C 末端領域の糖鎖結合部分が細菌、ウイルス、真菌の糖鎖に結合することにより、病原体の増殖を抑制することがわかっている［1～3］。一方、SP-D が肺以外に皮膚、涙腺など外界と接触する組織で発現しているという過去の報告が散見され、SP-D が侵入病原体に対する防御に寄与することが推測されるが、肺以外の臓器における役割については今まで検討されてこなかった。そこで、私たちは、SP-D の消化器系臓器での役割を検討することを目的として研究を行った。

本研究により、以下のことが明らかになった。消化器系臓器の中では特異的に胆嚢で SP-D が産生され、胆汁を介して消化管内へ分泌されていた。SP-D 欠損（SP-D$^{-/-}$）マウスでは、野生型マウスと比べて腸内細菌叢が変化しており、*Clostridia* Ⅳ群や XIVa 群に分類される数種の細菌が減少し、*Lactobacillus murinus* が著しく増加していた。腸内細菌のフローサイトメトリー解析、及びセルソーターで分離採取した SP-D 結合細菌及び非結合細菌の細菌 16S リボソーマル RNA（rRNA）解析により、腸内細菌中の *L. murinus* は SP-D と直接結合していることが判明した。*In vitro* では SP-D が *L. murinus* の増殖を抑制していることが証明された。さらに、SP-D$^{-/-}$マウスでは、DSS 誘導性腸炎に対する感受性が増強していたこと、また、SP-D$^{-/-}$マウスの糞便を投与した無菌マウスでは、野生型マウス糞便を投与した無菌マウスより DSS 誘導性腸炎が有意に重篤になった。これらの結果から SP-D が腸内細菌叢を制御し腸管恒常性維持に貢献していることが示された。一方、大腸炎においては、肝臓におけるグルココルチコイドの産生が亢進し、それにより胆嚢における SP-D の発現が高まることをも見出した。一連の結果から、“肝―胆―腸内細菌叢を軸とした SP-D による腸管恒常性の維持機構”が存在することが示唆された［4］。

方法および結果

1. 胆嚢における SP-D の発現

最初に、野生型マウスの各消化器系臓器の SP－D 遺伝子（*Sftpd*）の発現について、quantitative RT-PCR（qRT-PCR）にて検討した。その中で、胆嚢における *Sftpd* の発現は際立って高かった（図 1A）。胆嚢免疫組織染色では、胆嚢上皮に限局した SP-D タンパクの発現が確認された（図 1B）。ELISA 法により胆汁中にも SP-D 蛋白が検出された（図 1C）。さらに、ウエスタンブロット法により SP-D タンパクは腸管内容物中にも検出された。この腸内容物中の SP-D は総胆管結紮術により検出できなくなることから、胆嚢で産生された SP-D が胆汁を介して腸管に分泌されていると考えられた（図 1D）。

2. SP-D 欠損による腸内細菌叢の変化

肺胞内でSP-Dが緑膿菌や黄色ブドウ球菌などの病原細菌の排除に貢献していることから、腸管内に存在するSP-Dが腸内細菌叢に影響を与えるか否かについて疑問が生じた。そこで、野生型マウスとSP-D$^{-/-}$マウスの糞便について16S rRNAの比較解析を行ったところ、腸内細菌叢の菌構成及び多様性に有意な差を認めた（図1E）。図1Fに示すように、数種類の細菌種に有意に増減が見られ、SP-D$^{-/-}$マウスでは*Clostridia* Ⅳ群やXIVa群に分類される6種類が減少し、

Lactobacillus murinus が著しく増えていることが特徴的であった。

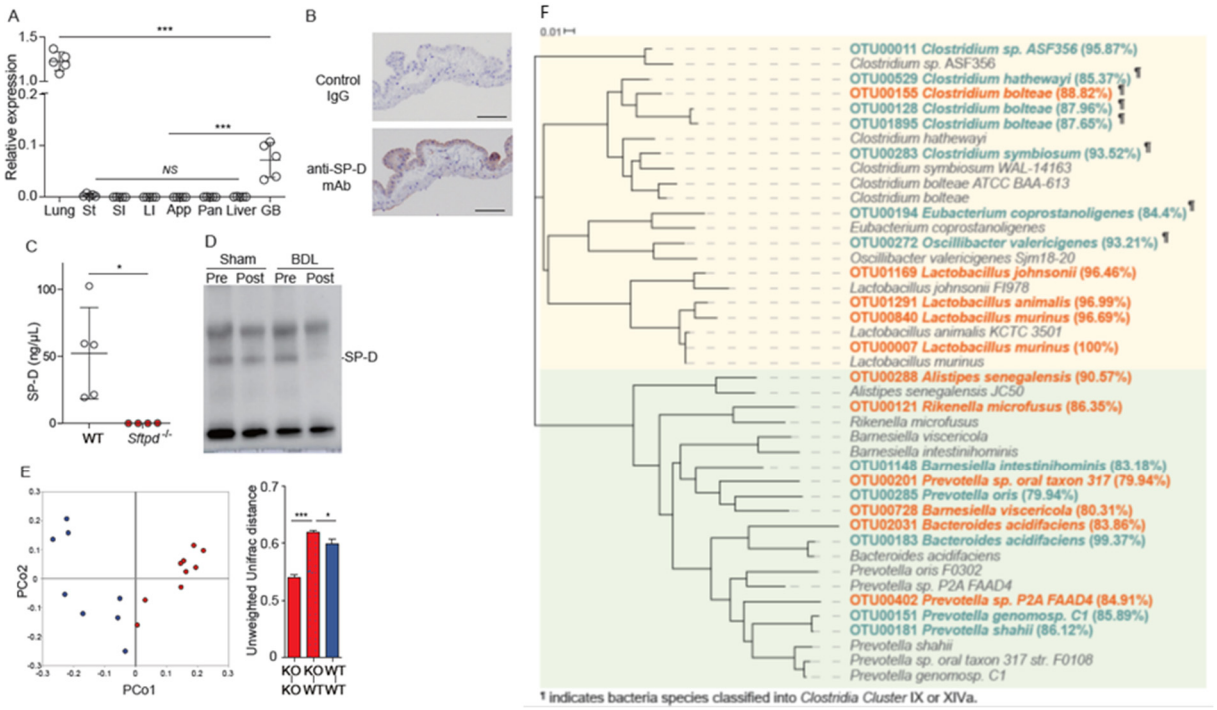


図 1. 消化器系臓器の中で胆嚢特異的に発現する SP-D

（A）qRT-PCR により *Sftpd* 遺伝子の発現を各臓器で検討した。St；胃、SI;；小腸、LI；大腸、App；虫垂、Pan；膵臓、GB；胆嚢.を示す。（B）胆嚢の SP-D 免疫組織染色。（C）ELISA 法による胆汁中の SP-D 濃度。（D）模擬手術（Sham）及び総胆管結紮術（BDL）を施行したマウスの糞便より蛋白を抽出し、抗 SP-D 抗体により免疫沈降した後、エピトープが異なる抗 SP-D 抗体により SP-D をウェスタンブロットで検出したもの。（E）野生型マウス及び SP-D$^{-/-}$マウスの糞便を 16s rRNAs シーケンス解析により腸内細菌叢を解析した。主座標分析（Principal coordinate analysis, 左）により細菌叢の差異を検討した。また各グループ内（KO-KO, WT-WT）、及びグループ外（KO-WT）の unweighted UniFrac distance の平均値の比較により細菌叢の多様性を比較した（右）。(F)（E）の結果、野生型マウスに比較して SP-D$^{-/-}$マウスで有意に増加（赤字）、あるいは減少（緑）していた細菌種を系統樹解析したもの。 **P*< 0.05, ** *P*< 0.01, *** *P*< 0.001、NS; 有意差なし。有意差検定は Student's *t* test で行った。

3. SP-D の結合による腸内細菌の増殖抑制

SP-Dがどのようなしくみで腸内細菌叢に影響しているかを検討するため、まず初めにSP-Dが直接結合する腸内細菌の有無について検討した。方法は、マウス糞便中から細菌を分離し、抗SP-D抗体で染色した後、フローサイトメトリーでSP-D抗体に染まる細菌の有無について検討した。興味深いことに、図2Aに示すように、2%前後の細菌がSP-D抗体に染まっており、腸管細菌の中にはSP-D結合細菌が存在することがわかった。さらに、SP-D結合細菌及び非結合細菌をセルソーターにて分離採取し、16s rRNAシーケンスの比較解析を行いSP-Dに結合している細菌の種類を検討した。その結果、10菌種が検出され、この中の一つはSP-D$^{-/-}$マウスで増加していた*L. murinus*であった（図2B）。さらに、*L. murinus*をリコンビナントSP-Dと*in vitro*で共培養すると細菌増殖が抑制された（図2C）。以上から、SP-Dが*L. murinus*に直接結合してその増殖を抑制することにより、腸内細菌叢の菌構成の制御に貢献していることが示唆された。

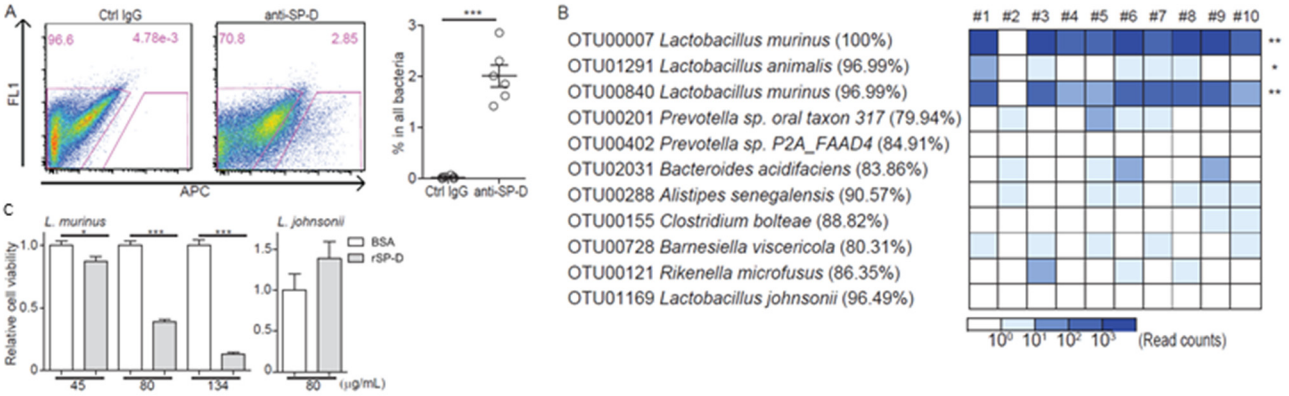


図2. SP-Dは一部の腸内細菌に結合することにより細菌の増殖を抑制している

（A）野生型マウスの糞便から細菌を分離し、抗 SP-D 抗体、次いで APC 標識二次抗体で染色し、フローサイトメーターで検討した。（B）10 匹の野生型マウスから SP-D 結合細菌と非結合細菌をセルソーターで各々2,000,000 個採取し 16S rRNA シーケンス解析を行った。SP-D 結合細菌に有意に多かった細菌種をリストアップした。リード・カウント（Read counts）が多いものがより SP-D と結合している可能性が多いことを示す。*P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001、NS; 有意差なし。有意差検定は Student's t test で行った。

4. SP-D$^{-/-}$マウスにおける実験性大腸炎感受性の増強

SP-D$^{-/-}$マウスにおける腸内細菌叢の変化が、大腸炎にどのように影響するかを見るため、デキストラン硫酸塩（DSS）を7～9日間飲水に入れて投与しDSS誘導性大腸炎を誘導した。SP-D$^{-/-}$マウスは野生型マウスに比較し、DSS誘導性大腸炎に対する感受性が有意に増強していた（図3A-C）。さらに、SP-D$^{-/-}$マウスの大腸炎感受性増強が、腸内細菌叢によるか否かを検討するため、SP-D$^{-/-}$マウス、野生型マウスそれぞれの糞便を無菌野生型マウスに経口投与し5日後より、DSS誘導性大腸炎を起こしたところ、SP-D$^{-/-}$マウスの糞便を投与した群のマウスの腸炎はより重症であった（図3D）。以上から、SP-D$^{-/-}$マウスの腸内細菌叢はSP-Dが存在しないためにディスバイオーシスの状態になり、それが大腸炎感受性を増強させる結果となったと考えられた。

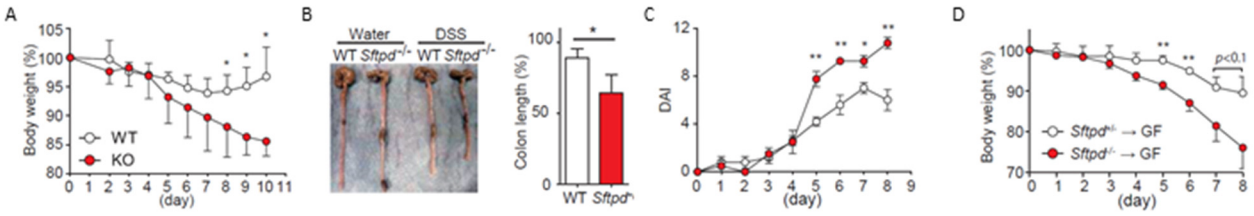


図 3. SP-D による腸管の恒常性を制御

（A-C）3～3.5 % DSS 投与により野生型マウス及び SP-D$^{-/-}$マウスに大腸炎を誘導した。（A）投与前の体重を 100% とした時の体重推移。（B）0、8 日目の大腸の写真と 0 日目の長さを 100%としたときの大腸の長さの比較。（C）Disease activity index（DAI）。（D）野生型無菌マウスに、 野生型マウスまたは SP-D$^{-/-}$マウスの糞便を経口投与し、5 日後より DSS 誘導性大腸炎を起こした時の体重推移。*P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001、NS; 有意差なし。有意差検定は Student's t test で行った。

5. 大腸炎罹患時における肝グルココルチコイド産生を介した胆嚢 SP－D 遺伝子の発現制御

ここまでは、胆嚢由来SP-Dが腸内細菌叢の制御を介して大腸の恒常性維持に貢献し、大腸炎の悪化を防いでいることを証明してきたが、逆に大腸炎が胆嚢のSP-D発現に影響があるかについて疑問が生じた。そこで、DSS誘導性大腸炎を起こしたマウスの胆嚢の*Sftpd*遺伝子をqRT-PCR法で検討したところ、大腸炎の進行に伴い発現が亢進することが

わかった（図4A左）。胆汁中SP-Dの濃度も同様に増加していた（図4A右）。肺上皮細胞で*Sftpd*遺伝子を誘導する因子として、fibroblast growth factors（FGFs）やグルココルチコイドが知られている［5～7］。そこで、ヒト胆嚢上皮細胞株OCUG-1を、FGF7、FGF10、またはデキサメサゾン（合成コルチコイド）で刺激し*Sftpd*の発現を検討したところ、デキサメサゾン刺激により*Sftpd*の発現が強まることがわかった（図4B）。DSS誘導性大腸炎では、前述の胆嚢でのSP-D産生亢進に加え、胆汁中および肝組織にコルチコステロンが増加していた（図4C）。この肝組織コルチコステロンの増加はグルココルチコイド産生酵素阻害剤PF-915275を添加することにより低下することから（図4D）、大腸炎罹患中には肝コルチコステロン産生が亢進し、それにより胆汁中のコルチコステロンが上昇し、胆嚢上皮における*Sftpd*遺伝子発現がさらに亢進することが示唆された。

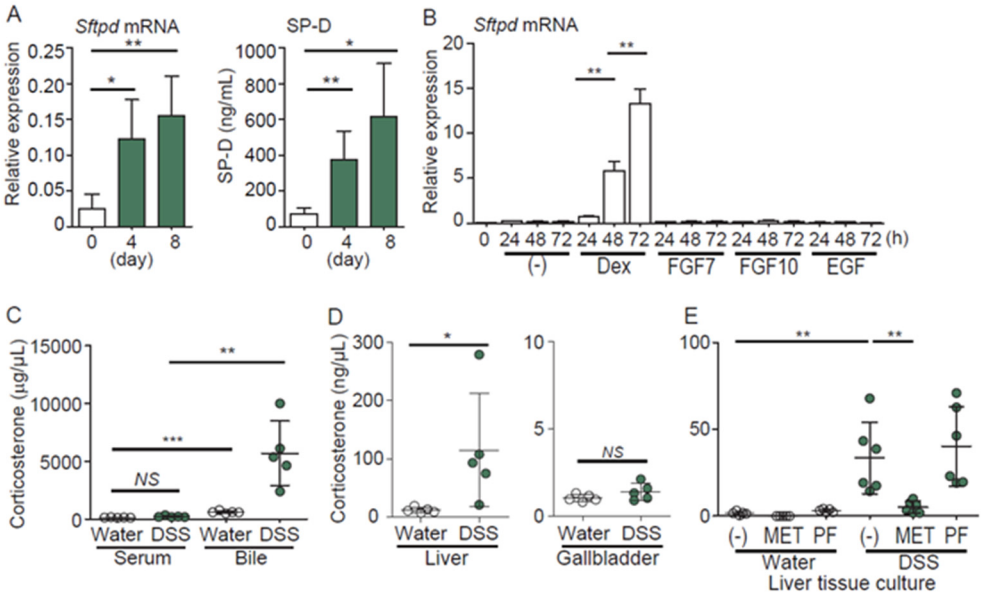


図 4. 大腸炎における SP-D 遺伝子のフィードバック制御

(A) DSS 誘導性腸炎罹患時の胆嚢での *Sftpd* 遺伝子発現（左）、胆汁中の SP-D 濃度（右）。(B) 胆嚢上皮細胞株 OCUG-1 にデキサメサゾン（Dex; 1 μM）、FGF7（100 μg/mL）、FGF10（100 μg/mL）,、EGF（100 μg/mL）を添加して培養後各時間後の *Sftpd* 遺伝子発現。(C-E) DSS にて大腸炎を誘導して 7 日目の、血清及び胆汁中のコルチコステロン濃度（C）。胆汁、肝組織ホモジナイズ上清、胆嚢ホモジナイズ上清のコルチコステロン濃度（D）。肝組織に、グルココルチコイド合成阻害剤である metyrapone（MET; 200 μg./mL）、あるいは PF-915275 （PF; 100 μM）を添加し 15 時間培養した時の上清コルチコステロン濃度（E）。* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001、NS; 有意差なし。有意差検定は Student's *t* test で行った。

考　察

SP-D は今まで、肺特異的に存在する抗菌ペプチドであり感染性微生物の排除の寄与していると認識されてきた。しかし、本研究で、著者らは SP-D が消化器系臓器の中で胆嚢に特異的に発現し、腸内細菌叢を制御していることを明らかにした。いくつかの抗菌ペプチドが腸管上皮や腸管粘膜免疫細胞から分泌され、腸内細菌叢に影響することが知られている。しかし、胆嚢上皮で産生される抗菌ペプチドが腸内細菌叢を制御しているということを明らかにしたのは、本研究が初めてである。そのメカニズムには SP-D の関与があるかもしれない。さらに、SP-D のみならず、おそらく他にもいくつかの胆嚢抗菌ペプチドが存在することが推測され、それには更なる解明が必要である。加えて、胆嚢摘出術後に見られる胆嚢摘出後症候群で見られる下痢などの腹部症状が、腸内細菌叢の変化に関与しているという報告があり［8］、SP-D を初めとした胆嚢抗菌ペプチドが関与している可能性がある。

SP-D$^{-/-}$マウスでは、一般的にプロバイオティクスとされている *Lactobacillus* 属菌 *L. murinus* が増加しているにも関わらず、SP-D$^{-/-}$マウスがより重篤な DSS 誘導性大腸炎を起こすという点で、矛盾しているように見える。しかし、一方で、SP-D$^{-/-}$マウス腸内細菌叢では、*Clostridia* IV 群や XIVa 群の細菌が優位に少ないことが特徴でもあった。*Clostridia* IV 群や XIVa 群の細菌は、短鎖脂肪酸を産生し様々な機構でプロバイティクスとして作用することから、それらが減少している SP-D$^{-/-}$マウスで DSS 誘導性大腸炎が重篤になることと矛盾しない。このような結果から、SP-D が *L. murinus* 菌を含むいくつかの細菌に結合しそれらの増殖を抑制することにより、いくつかの細菌種が直接的または間接的に増減し、結果的に生じた腸内細菌叢がディスバイオーシス(dysbiosis)になったことが推測される。*Clostridia* IV 群や XIVa 群の低下は間接的な変化の一端を捕らえたものかもしれない。いずれにしても、SP-D$^{-/-}$マウスの腸内細菌叢の変化による大腸炎感受性の増強のメカニズムの解明には、更なる研究が必要である。

DSS 誘導性大腸炎に罹患すると、肝グルココルチコイド産生亢進を介して胆嚢 SP-D 遺伝子の発現がさらに強くなることは興味深い現象であり、これは、”肝—胆—腸内細菌叢を軸とした SP-D による腸管恒常性の維持機構”が存在することを示唆している。過去の報告では、エンドトキシンや炎症性サイトカインが、皮膚や肺といった副腎以外の臓器においてグルココルチコイド産生を高めることが報告されている［9]。実際、著者らは LPS 全身投与により、肝グルココルチコイド産生が亢進し、胆嚢 *Sftpd* 発現が上昇することを確認している［4]。従って、大腸炎により腸管バリア一機能が低下した結果、LPS の体内への侵入や腸管での炎症性サイトカイン上昇の全身的波及が生じ、肝グルココルチコイド産生が亢進し、胆嚢 *Sftpd* 発現がさらに強められたという可能性が考えられた。

現時点では、この肝グルココルチコイドを介した腸管炎症による胆嚢 SP-D の産生亢進が、生体においてどのような意義を持つのかは明らかでない。肺において、SP-D が感染病原体の排除に寄与していることから、胆嚢でも同様に細菌性胆嚢炎や胆管炎といった腸管からの感染症への防御機構に関与している可能性は十分にある。このように、本研究は、腸管や胆嚢疾患における SP-D の役割の一端を明らかにしたものであり、今後それらの疾患の治療標的としての可能性も期待されるところである。

共同研究者・謝辞

本研究では、著者と同研究室所属の更級葉奈、根岸英雄、谷口維紹、他の教室員、大阪大学大学院医学研究科呼吸器・免疫内科学の熊ノ郷敦先生、木田博先生、東京大学大学院新領域創成科学研究科の服部正平先生、須田瓦先生、京都大学医学研究科創薬医学融合拠点 AK 免疫制御学講座の朝霧成挙先生、京都大学ウイルス・再生医科学研究所の祝迫惠子先生が共同研究者としてご尽力いただいた。この場を借りて御礼を申し上げます。

文　献

1) Crouch EC. Surfactant protein-D and pulmonary host defense. Respir Res. 2000;1(2):93-108. Epub 2000 Aug 25. PMID: 11667972.
2) Wright JR. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. Nat Rev Immunol. 2005 Jan;5(1):58-68. DOI:10.1038/nri1528.
3) Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, Bernal AL, Reid KB, Madan T, Chakraborty T. Surfactant proteins SP-A and SP-D: Structure, function and receptors. Mol Immunol. 2006 Mar;43(9):1293-315. Epub 2005 Oct 5. DOI:10.1016/j.molimm.2005.08.004.
4) Sarashina-Kida H, Negishi H, Nishio J, Suda W, Nakajima Y, Yasui-Kato M, Iwaisako K, Kang S, Endo N, Yanai H, Asagiri M, Kida H, Hattori M, Kumanogoh A, Taniguchi T. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Sep 19;114(38):10178-10183. doi: 10.1073/pnas.1712837114. Epub 2017 Sep 6.
5) Mason RJ, Lewis MC, Edeen KE, McCormick-Shannon K, Nielsen LD, Shannon JM. Maintenance of surfactant protein A and D secretion by rat alveolar type II cells in vitro. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002 Feb;282(2):L249-58. DOI:10.1152/ajplung.00027.2001.

6) Rucka Z, et al. (2013) Differential effects of insulin and dexamethasone on pulmonary surfactant-associated genes and proteins in A549 and H441 cells and lung tissue. Int J Mol Med 32:211–218. DOI: 10.3892/ijmm.2013.1363.
7) Bachurski CJ, Ross GF, Ikegami M, Kramer BW, Jobe AH. Intra-amniotic endotoxin increases pulmonary surfactant proteins and induces SP-B processing in fetal sheep. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001 Feb;280(2):L279-85. DOI:10.1152/ajplung.2001.280.2.L279.
8) Keren N, Konikoff FM, Paitan Y, Gabay G, Reshef L, Naftali T, Gophna U. Interactions between the intestinal microbiota and bile acids in gallstones patients. Environ Microbiol Rep. 2015 Dec;7(6):874-80. doi: 10.1111/1758-2229. 12319. Epub 2015 Aug 7.
9) Talabér G, Jondal M, Okret S. Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: immune regulation and aspects on local organ homeostasis. Mol Cell Endocrinol. 2013 Nov 5;380(1-2):89-98. doi: 10.1016/j.mce.2013.05.007. Epub 2013 May 21