OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	E-NPP3 controls plasmacytoid dendritic cell numbers in the small intestine
Author(s)	古田, 陽輝
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/67031
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　古田　陽輝

		（職）	氏　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	竹田 潔
	副　査	大阪大学教授	芸瀬 高
	副　査	大阪大学教授	山本雅裕

論文審査の結果の要旨

細胞外ATPは、免疫細胞を含む様々な細胞に作用し、細胞の活性化や細胞死を誘導する。腸管免疫においても、組織内のみならず、腸管管腔内にもATPが存在しており、粘膜固有層の免疫細胞へ作用する。一方、細胞外ATPはATP分解酵素により分解されることで、その濃度が一定に保たれる。今回、申請者らは膜型ATP分解酵素、ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase3 (E-NPP3)が小腸に高発現することに着目し、その機能および腸管免疫への関与を解析した。E-NPP3は腸管上皮細胞の管腔側に発現し、管腔内腔ATP濃度を調節していることが示された。また、形質細胞様樹状細胞(pDC)が細胞外ATPに対して高感受性で、P2X7受容体を介してアポトーシスが誘導されることを見出した。そのためE-NPP3欠損マウスでは小腸pDCの細胞数が減少していた。これらのことから、E-NPP3は小腸管腔内ATP濃度を調節することで、小腸のpDCにアポトーシスが誘導されるのを抑制し、その細胞数を調節していることが明らかとなった。この研究は学位に値すると考えられる。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	古田　陽輝
論文題名 Title	E-NPP3 controls plasmacytoid dendritic cell numbers in the small intestine (E-NPP3は小腸における形質様樹状細胞の細胞数を調節する)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

細胞外ATPはP2XもしくはP2Y受容体を介し、種々の免疫細胞に作用し、活性化や細胞死を誘導することがこれまでに報告されている。腸管においても、細胞外ATPは樹状細胞や肥満細胞を活性化し、恒常性の維持や炎症の誘導に関与していることが知られている。一方、生体内において細胞外ATPの濃度は、E-NTPDファミリーやE-NPPファミリーによって分解され、調整されている。しかし腸管免疫における細胞外ATPの役割やその制御機構に関しては未だ充分には解明されていない。Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase3 (E-NPP3) は、E-NPPファミリーに属しており、ATPをAMPへ分解する膜型分解酵素の一つで、活性化した好塩基球や肥満細胞に発現し、ATP依存性の慢性アレルギーが過剰に反応するのを制御することが示されている。今回E-NPP3がマウスの小腸にも高発現していることに着目し、腸管免疫への関与を*Enpp3*$^{-/-}$マウスを用いて解析した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

最初にE-NPP3の発現パターンをリアルタイムPCR法にて解析した。臓器間で比較すると、小腸に高発現しており、小腸においては口側腸管の上皮細胞に発現していた。さらに抗E-NPP3抗体を作成し、免疫染色を行い、発現部位を観察したところ、絨毛先端上皮の管腔側に発現していた。そこで野生型マウスと*Enpp3*$^{-/-}$マウスの管腔内ATP濃度を測定したところ優位に*Enpp3*$^{-/-}$マウスで上昇していた。E-NPP3は活性化肥満細胞にも発現しているため、管腔内ATPへのそれらの影響を調べるため、肥満細胞が欠損した*Kit*$^{w\text{-}sh/w\text{-}sh}$ *Enpp3*$^{-/-}$マウスを作製し解析した。さらに*Kit*$^{w\text{-}sh/w\text{-}sh}$ *Enpp3*$^{-/-}$に野生型もしくは*Enpp3*$^{-/-}$の骨髄由来肥満細胞を移入し、管腔内ATP濃度への影響を解析した。いずれの実験においても、肥満細胞の有無で管腔内のATP濃度に差はなく、小腸上皮のE-NPP3が管腔内ATP濃度を調節していると考えられた。次に、上昇した管腔内ATP濃度が与える影響を調べるため、小腸粘膜固有層 (SILP)およびパイエル板 (PP)における免疫細胞について解析した。するとSILP及びPPの形質細胞様樹状細胞（pDC）の細胞数が優位に*Enpp3*$^{-/-}$マウスにて減少していることが分かった。一方、通常樹状細胞（cDC）については両群で差がなかった。細胞外ATPは、ある種の細胞に対しては細胞死を誘導することから、SILPおよびPPのpDCにおける細胞死の割合をアポトーシスのマーカーであるannexin-Vの結合およびcaspase-3の活性化をフローサイトメトリーで解析した。*Enpp3*$^{-/-}$マウスの小腸pDCでは野生型のpDCに比し、優位にアポトーシスが誘導されていた。そこでpDCがATPに対して感受性が高いかどうかを調べるため、腸間膜リンパ節の細胞をATPと共に培養した。するとpDCにはATPの濃度依存性にアポトーシスが誘導されたのに対し、cDCでは誘導されなかった。さらに野生型マウスの腸管腔内にATP-gSを注入した所、pDCにはアポトーシスが誘導されたが、cDCには誘導されなかった。これらのことからpDCはATPに対して感受性が高くアポトーシスが誘導されることが示された。次にどのようにしてATPがpDCに細胞死を誘導するかを検討した。ATPはP2X受容体を介して細胞死を誘導するため、まず腸間膜リンパ節のpDCにおけるP2X受容体の発現を解析した。その結果、pDCはP2X4およびP2X7を高発現していた。さらに他の臓器のpDCにおけるP2X4およびP2X7の発現を調べてみると、P2X7は小腸、PP、骨髄、脾臓いずれの臓器のpDCも高発現していたが、P2X4は小腸では高発現しているものの、他の臓器では低い傾向にあった。そこで、ATPにより誘導されるpDCの細胞死における、P2X7シグナルの影響を検討した。野生型と*P2rx7*$^{-/-}$のマウスより腸間膜リンパ節のpDCを分離し、ATPと培養し、誘導されるアポトーシスを解析した。その結果、*P2rx7*$^{-/-}$のpDCではアポトーシスの誘導が野生型に比し優位に減少していた。さらに*in vivo*でのP2X7の影響を検討するため、*Enpp3*$^{-/-}$ *P2rx7*$^{-/-}$マウスを作製し、解析した。結果は、*Enpp3*$^{-/-}$ *P2rx7*$^{-/-}$マウスでは*Enpp3*$^{-/-}$マウスに比べpDCの細胞数が増加していた。これらのことからATPはP2X7を介してpDCにアポトーシスを誘導することが示された。以上の結果から、小腸上皮のE-NPP3は腸管腔内のATP濃度を軽減することで、小腸のpDCにアポトーシスが誘導されるのを防ぎ、細胞数を調整していることが示された。

〔総　括(Conclusion)〕

E-NPP3は小腸上皮の管腔側に発現しており、管腔内のATP濃度をコントロールすることで、小腸におけるpDCのアポトーシスを防ぎ、細胞数を調整していることが示された。