

氏名	やまだ たかひろ 山田 恭央
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博士甲第 号
学位授与の日付	2020年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	腸内共生系におけるムチンの内因性プレバイオティクスとしての役割の解明
論文審査委員	(主査) 長谷 耕二 教授(博士(薬学)) (副査) 齋藤 英胤 教授(博士(医学)) 有田 誠 教授(博士(薬学))

## 論文内容の要旨

### 【背景】

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC)やクローン病 (Crohn's disease: CD)などの炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD)は、遺伝的要因と環境要因の両方によって引き起こされる再発性の炎症性疾患である。先行研究によって、腸内細菌叢の構成異常 (ディスバイオーシス)が IBD の発症や増悪に関与することが示唆されている。実際に、動物実験においてディスバイオーシス下の腸内細菌叢が腸管炎症を促進することが報告されている。しかし、IBD においてディスバイオーシスが炎症を促進するメカニズムについては不明な点が多い。

酢酸、プロピオン酸、酪酸といった短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acid: SCFA)は、腸内微生物叢が可溶性食物繊維などの難消化性炭水化物を発酵することにより産生される。SCFA は結腸上皮の重要なエネルギー源となるのみならず、制御性 T 細胞や IgA 産生細胞の誘導、上皮バリア機能の増強により免疫恒常性の維持に寄与する。IBD 患者では、酪酸産生菌が減少する。また、酪酸の浣腸は、結腸粘膜の UC の炎症症状を効果的に軽減することが報告されている。これらの報告は、IBD 患者における酪酸産生の低下が腸炎の悪化に寄与する可能性を示唆するものである。

杯細胞によって腸管内腔に分泌されるムチンは、コア蛋白質である Muc2 に多くの糖鎖が付加され重合した高分子糖タンパク質である。ムチンは内層と外層からなる粘液層を形成するが、粘液内層はほぼ無菌的に保たれており、上皮表面への微生物の付着や生体内への侵入を未然に防ぐバリアとしての役割を担っている。一方、粘液外層はムチンをエネルギー源として利用する一部の常在菌の生息地となっている。Muc2 遺伝子または糖鎖修飾を担う酵素である *Clgt1* 遺伝子の欠損マウスでは、粘液バリアの機能が低下することで粘膜固有層への腸内細菌の移行が増加し、結腸において慢性炎症が生じる。UC 患者の結腸粘液層は健康な被験者の結腸粘液よりもバリア機能が低下しており、同

様の現象が起きていると見なされる。

以上の背景からディスバイオーシスによるムチンおよび SCFA 産生の異常は、IBD の発症要因と見なされるものの、個々の現象の関連性については不明である。そこで本博士論文研究において、申請者は IBD の病態解明を目指して、腸内細菌叢、代謝物、ムチンの統合解析を実施した。

## 【方法】

### 患者検体の入手

有機酸濃度、細菌構成およびムチン成分を分析するために、日本の健常者 44 名、CD 患者 40 名および UC 患者 49 名の便検体を、大阪大学病院の消化器内科にて採取した。その後ムシナーゼ活性の評価のために追加で健常者 11 名と UC 患者 10 名の糞便試料を採取した。全参加者は本研究に関する口頭および書面の情報の説明を受けた後に、インフォームドコンセントに同意した。これらの研究プロトコルは、研究の開始に先立って、慶應義塾大学薬学部「人を対象とする研究倫理委員会」により承認された (承 150421-1、承 180528-3)。

### 細菌叢の解析

PCR によって検体由来 DNA の 16S rRNA 遺伝子可変領域 3 および 4 を増幅すると同時に、アダプター配列およびインデックス配列を付加した。作成したライブラリを MiSeq 600 cycles v3 システムにより解析した。

### 代謝物の解析

ヒトまたはラット由来検体中有機酸 (ギ酸、酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、酪酸、イソ吉草酸、吉草酸、コハク酸、乳酸) は HPLC により、マウス由来検体中の有機酸は GC-MS により、内部標準法にて解析した。

### ムチンの解析

糞便中ムチンをエタノール沈殿法により精製した。糖鎖量の解析は、ムチン画分に塩化水素を加えて熱処理を行うことで糖鎖を遊離させた後、蛍光標識することにより定量した。

### ムシナーゼ活性の評価

糞便試料を酢酸緩衝液 (pH 5.5) に懸濁した後、ブタ胃粘膜ムチンを基質としてムシナーゼ活性を評価した。ムシナーゼ活性は糞便のホモジネートまたは糞便の重量に含まれるタンパク質当たり、そして 1 分間当たりの遊離糖量として表した。

## In vitro 発酵試験

AIN93G 飼料を 7 日間与えたラットから得た盲腸内容物を生理食塩水で 50 倍希釈した後、希釈液を Jar fermenter 中で穏やかに攪拌しつつ、嫌氣的、37°C、pH 制御 (pH > 5.2) 条件下で培養した。一晩前培養した後、3%ブタ胃ムチン (w/v)を培養物に添加した。

## フローサイトメトリー

マウス大腸粘膜固有層を採取した後、collagenase/DNase I 溶液を用いて分散させ、細胞を分取した。Fc 受容体をブロッキングした後、蛍光標識抗体を用いて表面抗原を染色した。細胞内抗原を染色する際には、固定・膜透過処理を行った後、蛍光標識抗体による染色を行った。染色した細胞は LSR II Flow Cytometer により解析された。

## 【結果・考察】

### 1. IBD 患者における酪酸の減少

申請者はまず、CD 患者と UC 患者ではともに糞便中の酪酸濃度が減少していることを見出した (図 2)。酪酸の減少は特に活動期の患者で顕著であり、活動期の UC、CD 患者ではそれぞれ 36%、50%の患者において検出限界以下であった。酪酸は腸炎の発症を抑制することが報告されていることから、腸内細菌による酪酸産生の減少が病因であると考えられた。

### 2. CD 患者では酪酸関連細菌が減少する

続いて、酪酸濃度減少の原因を調べるために、16S リボソーム RNA 配列解析法により腸内細菌構成を解析した。先行研究の結果と合致することに、IBD 患者の腸内細菌は健常者と有意に異なる構成を示した。また、IBD 患者の腸内細菌は健常者と比べて有意に低い  $\alpha$  多様性を示した。LEfSe および BugBase により疾患群ごとに腸内細菌構成を比較したところ、IBD 患者では Proteobacteria 門細菌を含む通性嫌気性細菌の増加と Clostridiales 科細菌を含む偏性嫌気性細菌の減少が特徴的であった。

続いて、糞便中酪酸濃度の低下と腸内細菌叢の関連を調べるため、Spearman 相関分析を行った。その結果、酪酸濃度と有意な正の相関を示す細菌分類群として、12 属、28 種を同定した (adjusted  $p$  value < 0.05)。このうち 5 属、7 種が健常者において 1%以上の割合で存在し、特に腸内酪酸産生に寄与していると示唆された。実際に、7 種の中には酪酸産生菌として知られる *Faecalibacterium prausnitzii* および *Eubacterium rectale* が含まれた。酪酸濃度と同様に、酪酸関連細菌の総割合は CD 患者において顕著に低下していた。特に、*F. prausnitzii* は健常者の細菌叢で最も豊富な酪酸産生菌であったが、活動期の CD 患者の細菌叢にはほとんど存在しなかった。対照的に、*F. prausnitzii* の割合は、活動期または寛解期の UC 患者においては有意な減少は認められなかった。このことか

ら、CD 患者における酪酸減少は *F. prausnitzii* の減少によると考えられるが、UC 患者については他にも原因があると考えられた。

### 3. UC 患者では腸内細菌によるムチン糖鎖分解活性が低下する

続いて申請者はムチンに着目して解析を行った。UC 患者ではムチン中の糖鎖の割合が有意に増加していた。さらに UC 患者においてムチン糖鎖濃度が酪酸を含む SCFA 濃度と有意な負の相関を示すことを見出した。一方、ムチン糖鎖の分解活性は UC 患者で有意に低下しており、さらに SCFA 濃度と有意な正の相関を示した。これらの結果から、申請者はムチン O 結合型糖鎖利用が UC 患者において損なわれており、それが最終的に酪酸産生に影響する可能性があると考えた。

### 4. 腸内細菌はムチンから SCFA を産生する

腸内細菌叢が SCFA を産生するための発酵源としてムチンを利用するという仮説を直接的に検証するために、*in vitro* 発酵システムを用いて、ムチン存在または非存在下でラット盲腸内細菌叢を培養した。その結果、ムチンの添加により SCFA が顕著に増加した。このことから、腸内細菌はムチンの発酵により SCFA を産生することが確認された。

さらに *in vivo* における発酵基質としてのムチン O 結合型糖鎖の重要性を確認した。精製ムチンを含む合成飼料をラットに給餌したところ、酢酸と酪酸の盲腸濃度が有意に、プロピオン酸の盲腸濃度がわずかに増加した。この際、盲腸のムチン O 結合型糖鎖の濃度は全群間で同程度であった。このことは、外来ムチンの O 結合型糖鎖が腸内微生物発酵を介して効率的に消費されたことを意味する。さらに、ムチン投与は投与量依存的にムシナーゼ活性の増加をもたらした。このように、O 結合型糖鎖の利用は SCFA 産生の維持において重要であると考えられる。

### 5. ムチンによる大腸免疫系修飾作用

最後に、ムチン飼料をマウスに与えることにより、ムチン依存的な酪酸生合成経路の生物学的意義を検討した。ラットの結果と一致して、マウスへのムチンの投与は酪酸を含む SCFA の盲腸濃度を増加させた。腸内細菌由来の酪酸は、末梢で産生された Treg (peripherally generated Treg: pTreg) 細胞の分化を誘導することが知られている。また、SCFA は、結腸粘膜固有層における  $\text{IgA}^+\text{B220}^-$  形質細胞の分化を促進することが知られている。これらの報告の知見と合致することに、ムチン給餌マウスでは  $\text{ROR}\gamma\text{t}^+\text{Foxp3}^+$  pTreg 細胞および  $\text{IgA}^+\text{B220}^-$  形質細胞の頻度が、対照マウスと比べて有意に増加していた。これらの結果から、ムチンは粘膜バリアとして機能するだけでなく SCFA 産生を促進することにより腸管免疫系の発達に寄与すると考えられた。

## 【結論】

以上の結果を踏まえ、申請者は新たな腸内共生維持機構、および、IBDにおけるディスバイオーシスを介した腸炎増悪機序のモデルを提唱した。従来 SCFA は食物繊維などの外来因子から産生されていることが知られてきたが、本研究により宿主が産生するムチンの糖鎖も SCFA の産生源になることが見いだされた。ムチンの細菌代謝により産生された SCFA は腸管上皮に取り込まれエネルギー源となる他、pTreg 細胞や IgA<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>形質細胞といった腸炎抑制に重要な細胞集団を増加させる。つまり、宿主と共生細菌の代謝系が協調することで腸管免疫系の恒常性が保たれていると言える。申請者は新たな腸内共生モデルとして、上述のムチン依存的な SCFA 産生経路を symbiosynthesis と名付けた。

さらにこれまで判然としなかった、UC と CD におけるディスバイオーシスの特徴を明確化した。すなわち、UC と CD では共に腸内酪酸が減少するが、CD 患者ではディスバイオーシスに伴い酪酸産生細菌、特に *F. prausnitzii* が減少することで酪酸産生が低下する。一方、UC 患者では腸内細菌によるムチン糖鎖分解活性が低下する。これにより、symbiosynthesis 経路が減弱し、酪酸産生量が減少する。腸内細菌が産生する酪酸は腸炎を抑制することが示されていることから、酪酸産生の低下が IBD における腸炎の悪化または慢性化に寄与していると考えられる。

## 論文審査結果の要旨

腸内細菌は難消化性多糖類の発酵代謝により酢酸、プロピオン酸、酪酸といった短鎖脂肪酸を産生する。短鎖脂肪酸は多様な生理活性を有し、特に酪酸は腸管免疫恒常性維持における鍵因子とみなされている。従来、短鎖脂肪酸の産生のための発酵基質として、水溶性食物繊維のような食事因子が知られてきた。しかし、マウスにそれらの発酵基質を含まない飼料を与えた場合にも数十  $\mu\text{mol/g}$  もの短鎖脂肪酸が検出される。一方無菌マウスの腸管内容物からは短鎖脂肪酸が検出されないことから、腸内細菌が水溶性食物繊維以外のものから短鎖脂肪酸を産生していると考えられた。申請者は本研究において、腸内細菌は宿主が産生するムチンの糖鎖からも短鎖脂肪酸を産生することを明らかにした。さらに潰瘍性大腸炎患者ではムチン糖鎖を利用した酪酸産生が低下している可能性を提示した。これらの成果は腸内共生維持における新たなモデルを提示するのみならず、潰瘍性大腸炎の病態に新たな見方をもたらすものである。

申請者はまず潰瘍性大腸炎患者およびクローン病患者において糞便中の酪酸濃度が低下していることを見出した。クローン病患者では主要な酪酸産生菌 *F. prausnitzii* が殆ど検出限界以下になっていたことから、酪酸産生菌の減少がクローン病における酪酸産生低下の原因と考えられた。一方で潰瘍性大腸炎患者では *F. prausnitzii* は健常者と同程

度に存在したことから、異なる機序により酪酸産生が低下していると考えられた。続けて申請者は、潰瘍性大腸炎において、短鎖脂肪酸濃度はムチン糖鎖濃度と負の相関を、ムチン糖鎖分解活性と正の相関を示すことを見出した。このことから申請者は「ムチン糖鎖は短鎖脂肪酸酸性のための内因性プレバイオティクスとして機能する」と作業仮説を立てた。申請者は *in vitro* および *in vivo* において腸内細菌にムチンを投与することで、腸内細菌がムチンから酪酸などの短鎖脂肪酸を産生することを明らかにした。さらにマウスにおいてムチンの投与は大腸の制御性 T 細胞や IgA 陽性形質細胞を増加させたことから、ムチンは酪酸産生を促す内因性プレバイオティクスとして大腸免疫系を制御する役割を持つと考えられた。潰瘍性大腸炎患者において酪酸濃度が低いほど糞便中の未分解ムチン糖鎖濃度が増加していたことから、腸内細菌によるムチン糖鎖利用の低下が潰瘍性大腸炎における酪酸産生低下の原因と考えられた。以上の研究により、申請者は腸管免疫の維持におけるムチンの内因性プレバイオティクスとしての重要性を明らかにした。

博士学位審査会における口頭発表に際し、副査の齋藤教授から「本研究に基づいて考えられる新たな治療方策」について質問があった。これに対し申請者は「本研究に基づいて考えた場合、クローン病では酪酸産生菌の摂取が、潰瘍性大腸炎ではムチン分解経路の正常化が有効である可能性が考えられる。しかし、炎症がディスバイオーシスを誘導することを考えると、単に外部から菌を摂取しただけでは腸内細菌叢の機能は改善しないと考えられる。したがって、腸内細菌叢の正常化を促すと共に、抗炎症薬など他の治療法を併用する必要があると考えられる」と返答した。

また、副査の有田教授からは「本研究で新しく分かった事は何か」という質問があった。これに対し、申請者は「腸内細菌がムチンから短鎖脂肪酸を産生することを明らかにした点である」と返答した。さらに有田教授から「潰瘍性大腸炎とクローン病患者が異なるディスバイオーシスを示す原因について、病態の差異を元に説明できるか」という質問があった。こちらの質問に対しては研究が不十分であったため、「現時点で説明することは難しい」と返答した。その他「*F. prausnitzii* のムチン糖鎖分解能」について質問があった。これに対し、申請者は先行研究を引用しつつ「*F. prausnitzii* 自体はムチン糖鎖分解能を持たないが、粘液層に多く生息することが知られる。従ってムチン分解菌との cross-feeding によって酪酸を産生している可能性が高い」と返答した。その他にも複数の質問があったが概ね的確に返答していた。

本研究はムチンの内因性プレバイオティクスとしての役割を解明し、その腸管免疫系における役割をモデル動物からヒトに渡って解明したものであり、その学術的意義は極めて大きいと考えられる。また、申請者は口頭試問に対する的確に返答し、研究内容に対する深い知識と洞察力を持っていると判断できる。以上より、申請者は博士(薬科学)を冠するにふさわしいと判定した。

## 論文目録

### 主論文に関する原著論文

1. Yamada T, Hino S, Iijima H, Genda T, Aoki R, Nagata R, Han H, Hirota M, Kinashi Y, Oguchi H, Suda W, Furusawa Y, Fujimura Y, Kunisawa J, Hattori M, Fukushima M, Morita T, Hase K. Mucin O-glycans facilitate symbiosynthesis to maintain gut immune homeostasis, *EBioMedicine* 48:513-525, 2019.

### 参考論文

1. Kimura I, Miyamoto J, Ohue-Kitano T, Watanabe K, Yamada T, Onuki M, Aoki R, Isobe Y, Kashihara D, Inoue D, Inaba A, Takamura Y, Taira S, Kumaki S, Watanabe M, Ito M, Nakagawa F, Irie J, Kakuta H, Shinohara M, Iwatsuki K, Tsujimoto G, Ohno H, Arita M, Itoh H, Hase K. Maternal gut microbiota in pregnancy influences offspring metabolic phenotype. *Science* 367: eaaw8429, 2020.
2. Kimura S, Nakamura Y, Kobayashi N, Shiroguchi K, Kawakami E, Mutoh M, Takahashi-Iwanaga H, Yamada T, Hisamoto M, Nakamura M, Udagawa N, Sato S, Kaisho T, Iwanaga T, Hase K. Osteoprotegerin-dependent M cell self-regulation balances gut infection and immunity. *Nat. Commun.* 11:234, 2020.
3. Nagai M, Noguchi R, Takahashi D, Morikawa T, Koshida K, Komiyama S, Ishihara N, Yamada T, Kawamura IY, Muroi K, Hattori K, Kobayashi N, Fujimura Y, Hirota M, Matsumoto R, Aoki R, Tamura-Nakano M, Sugiyama M, Katakai T, Sato S, Takubo K, Dohi T, Hase K. Fasting-Refeeding Impacts Immune Cell Dynamics and Mucosal Immune Responses. *Cell* 178: 1072-1087, 2019.
4. Onuki M, Watanabe M, Ishihara N, Suzuki K, Takizawa K, Hirota M, Yamada T, Egawa A, Shibahara O, Nishii M, Fujihara M, Makishima M, Takahashi D, Furusawa Y, Kakuta H, Hase K. A partial agonist for retinoid X receptor mitigates experimental colitis. *Int. Immunol.* 31: 251-262, 2019.
5. Zai K, Hirota M, Yamada T, Ishihara N, Mori T, Kishimura A, Suzuki K, Hase K, Katayama Y. Therapeutic effect of vitamin D<sub>3</sub>-containing nanostructured lipid carriers on inflammatory bowel disease. *J. Control. Release* 286: 94-102, 2018.
6. Suzuki K, Yamada T, Yamazaki K, Hirota M, Ishihara N, Sakamoto M, Takahashi D, Iijima H, Hase K. Intestinal epithelial cell-specific deletion of  $\alpha$ -mannosidase II ameliorates

experimental colitis. *Cell Struct. Funct.* 43: 25-39, 2018.

7. Yamada T, Takahashi D and Hase K. The diet-microbiota-metabolite axis regulates the host physiology. *J. Biochem.* 160:1-10, 2016.