

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	山田恭央
<p>主 論 文 題 名 :</p> <p>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</p>			
<p>(内容の要旨)</p> <p>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 (dysbiosis) 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 dysbiosis 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 dysbiosis 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。</p> <p>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示されている。これらの報告は、IBD 患者における酪酸産生の低下が腸炎を悪化させている可能性を示すものである。</p> <p>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 または糖鎖修飾を担う酵素である C1glt1 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ことが示唆されている。</p> <p>以上の背景から dysbiosis 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、私は 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。</p>			

私はまず、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。酪酸の減少は特に活動期の患者で顕著であった。健常者では全員から、平均 10 $\mu\text{mol/g}$ 程度の酪酸が検出されたが、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にまでなった。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。

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 α 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。

続いて私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、私はムチン 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。

腸内細菌叢は SCFA を産生するための発酵源としてムチンを利用するのか、直接的に調べるために、*in vitro* 発酵システムを用いて、ムチンの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 産生が顕著に増加した。

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証した。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。

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 B220⁻IgA⁺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より、ムチン給餌マウスでは ROR γ ⁺Foxp3⁺pTreg 細胞および IgA⁺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。

以上の結果を踏まえ、私は新たな腸内共生維持機構および *dysbiosis* による腸炎増悪メカニズム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⁺B220⁻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いうことである。私は新たな腸内共生モデルとして、上述の宿主由来のムチンが内因性プロバイオティクスとして微生物に利用されて SCFA が産生され、産生された SCFA が宿主によって資化されるという一連の機構を共生合成 (*symbiosynthesis*) 経路と名付けた。

さらに以上の結果から、UC と CD それぞれの *dysbiosis* による腸炎増悪メカニズムのモデルを提唱した。UC と CD では共に腸内酪酸が減少するが、そのメカニズムは異なることが示唆された。CD 患者では *dysbiosis* 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。