

令和元年5月21日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06229

研究課題名(和文) 腸管上皮細胞の糖鎖修飾を介した感染防御機構の解明

研究課題名(英文) Intestinal epithelial glycosylation prevent infection

研究代表者

後藤 義幸 (Goto, Yoshiyuki)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号：10755523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではSalmonella typhimuriumやCandida albicansに対する腸管上皮細胞が発現する糖鎖の感染防御効果を検証した。その結果、腸管上皮細胞のalpha1,2-フコースは、S. typhimuriumの上皮細胞への接着を阻害する一方、C. albicansの腸管定着には影響しないことが明らかとなった。しかしながら、C. albicansの腸管定着は腸内細菌が制御しており、抗生物質を処理したマウスではC. albicansが腸管に定着することを見出した。また、腸管に定着したC. albicansは、腸内細菌を投与することで排除された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により腸管細菌・真菌感染症に対し、腸管上皮細胞が発現する糖鎖および腸内細菌の感染防御効果の一端が明らかとなった。特に上皮細胞が発現する糖鎖の一つであるalpha1,2-フコースが腸管感染細菌であるS. typhimuriumの腸管上皮細胞の接着を阻害することから、腸管細菌感染症に対する上皮細胞の糖鎖を用いた新規治療法の開発が今後期待される。さらに、本研究では腸内細菌がC. albicansの腸管定着を阻害することから、カンジダによる表在性真菌症ならびに侵襲性真菌症に対する腸内細菌を用いた新規治療法の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the protective role of the carbohydrate moieties expressed on intestinal epithelial cells against infection by Salmonella typhimurium and Candida albicans. As a result, we identified that alpha1,2-fucose expressed on intestinal epithelial cells inhibits adhesion of S. typhimurium to the epithelial cells while colonization of C. albicans was not affected by epithelial alpha1,2-fucose. Commensal bacteria inhibit colonization of C. albicans in the gut. Mice treated with beta-lactam antibiotics harbor significant numbers of C. albicans in the gut. Administration of commensal bacteria effectively excluded C. albicans colonized in the gut.

研究分野：粘膜免疫

キーワード：糖鎖 腸管上皮細胞 Salmonella typhimurium Candida albicans

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

腸管は体内に存在しながら外界に面しており、腸内細菌や病原性微生物に絶えず曝されている特殊な器官である。ヒトの腸管内にはおよそ 100 兆個もの細菌が常在し、感染防御、免疫賦活作用、代謝など宿主に対して多様な生理機能を発揮している。特に、腸内細菌は病原性微生物の腸管感染を制御する機能を有していることが、古くから知られていた。近年、腸内細菌は腸管の IgA 抗体産生や免疫細胞の分化・増殖などを誘導することにくわえ、腸管上皮細胞の細胞表面に発現する糖鎖、特に $\alpha$ 1, 2-フコース付加を誘導することが報告されてきた(1, 2)。腸管上皮細胞が発現する $\alpha$ 1, 2-フコースは Fucosyltransferase 2 (Fut2) によって誘導されるが、この $\alpha$ 1, 2-フコースは宿主と腸内微生物間の共生関係を仲介するだけでなく、病原性細菌の一つである *Salmonella typhimurium* や *Citrobacter rodentium* などの病原微生物感染を阻害することが示されていた(2)。しかしながら、腸管上皮細胞の $\alpha$ 1, 2-フコースによる病原微生物感染の阻害効果の詳細については不明であった。腸管上皮細胞の $\alpha$ 1, 2-フコースを欠損すると、腸内細菌叢が変化することから、腸管上皮細胞が発現する $\alpha$ 1, 2-フコースによる病原微生物感染阻害効果については、腸内細菌を介した間接的な効果もしくは $\alpha$ 1, 2-フコースによる病原微生物感染に対する直接的な阻害効果の可能性が考えられた。

#### 2. 研究の目的

本研究では、腸管上皮細胞の $\alpha$ 1, 2-フコースの誘導機構を明らかにし、腸内細菌によって誘導される $\alpha$ 1, 2-フコースおよび Fut2 による腸管微生物に対する感染防御機能の詳細を明らかにする。特に、腸管上皮細胞が発現する $\alpha$ 1, 2-フコースによる直接的な感染防御効果ならびに腸内細菌叢の変化を介した間接的な防御効果に焦点を当て研究を行う。また、腸管上皮細胞のフコシル化誘導における免疫細胞および免疫細胞が産生する IL-22 の役割を明らかにする。

#### 3. 研究の方法

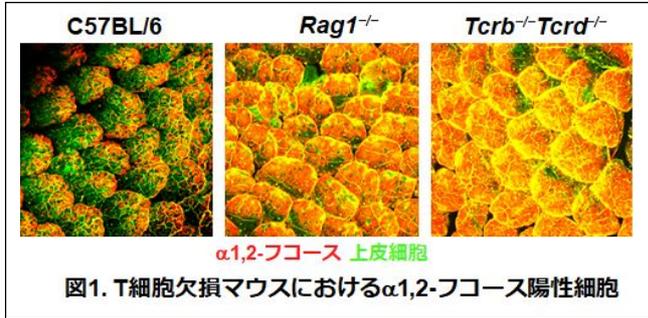
腸管上皮細胞の $\alpha$ 1, 2-フコース発現量を確認するために、野生型マウスと抗生物質処理マウス、Rag1 欠損マウス、T 細胞欠損マウス、*Candida albicans* 投与マウスから上皮細胞を分離し、フローサイトメーターおよび $\alpha$ 1, 2-フコース特異的に結合するレクチンである *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1) を用いて解析を行った。腸管免疫細胞における IL-22 の発現量は、小腸粘膜固有層からセルソーターを用いて各種免疫細胞を分離し、定量的 PCR 法を用いて解析を行った。*S. typhimurium* の接着実験を行うために、レンチウイルスを用いて MODE-K に Fut2 を恒常的に発現させた細胞株を作製した。コントロール MOKE-K 細胞および Fut2 を発現させた MODE-K 細胞と *S. typhimurium* を氷上で共培養した後に回収して選択培地で生育させた後、*S. typhimurium* 数を計測した。

腸管における *C. albicans* の定着を確認するために、野生型および各種抗生物質処理マウス、Fut2 欠損マウスに *C. albicans* を経口投与し、経時的にマウスの糞便や腸管内容物を回収して選択培地に塗布し、*C. albicans* の数を計測した。野生型およびアンピシリン処理マウスの糞便を回収して DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を指標に次世代シーケンサーを用いて腸内細菌叢の解析を行った。一方、各種腸内細菌数を調べるために、*Lactobacillus* や *Bacteroides*、*Clostridium* 特異的なプライマーを設計し、糞便から回収して DNA を用いて定量的 PCR 法を用いた。

#### 4. 研究成果

本研究では、まず腸内細菌が正常な野生型マウスと、抗生物質であるアンピシリンを経口投与したマウスにおいて腸管上皮細胞の $\alpha$ 1, 2-フコースの発現を確認した。その結果、アンピシ

リンを経口投与したマウスでは、 $\alpha 1, 2$ -フコースの発現が減少することを見出した。また、腸管上皮細胞の $\alpha 1, 2$ -フコースは、3型自然リンパ球 (Group 3 innate lymphoid cells : ILC3) によって誘導されることが知られているが、Th17 細胞の関与についての情報は限定



的であった。そこで $\alpha 1, 2$ -フコース誘導における T 細胞の役割を解析するために、Rag1 欠損マウスならびに T 細胞欠損を解析した。その結果、T 細胞を欠損したマウスでは $\alpha 1, 2$ -フコース陽性上皮細胞が観察された (図 1)。また、T 細胞と 3 型自然リンパ球 (Group 3 innate lymphoid cells : ILC3) における IL-22 の発現について解析を行ったところ、T 細胞と比較して ILC3 では IL-22 が恒常的に極めて高く発現しており、抗生物質による処理を行うとその発現が大きく減弱することを見出した。以上の結果から、腸管上皮細胞の $\alpha 1, 2$ -フコース発現誘導には Th17 細胞よりも IL-22 を高発現する ILC3 が重要であると考えられた。

次に、 $\alpha 1, 2$ -フコースによる腸内細菌を介した感染防御効果について検討するため、 $\alpha 1, 2$ -フコースを欠失した Fut2 欠損マウスの腸管各部位における腸内細菌叢の解析を行った。その結果、野生型マウスと比較して Fut2 欠損マウスでは腸内細菌叢が変化していることを

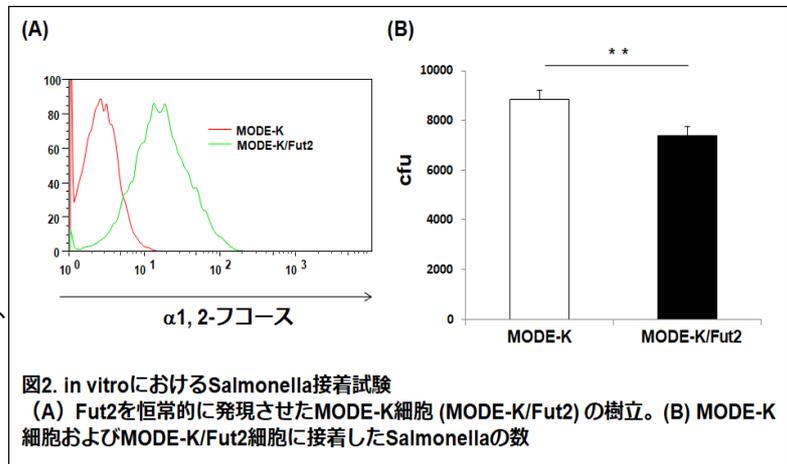


図2. in vitroにおけるSalmonella接着試験  
(A) Fut2を恒常的に発現させたMODE-K細胞 (MODE-K/Fut2) の樹立。(B) MODE-K細胞およびMODE-K/Fut2細胞に接着したSalmonellaの数

を見出した。さらに、腸管上皮細胞の $\alpha 1, 2$ -フコースが *S. typhimurium* に直接的な防御作用を示す可能性を検証するため、まず villin プロモーターに Fut2 遺伝子とエンハンサーを繋いだベクターを作製し、腸管上皮細胞特異的に Fut2 を発現させた遺伝子改変マウスを作製した。これらのマウスでは、腸管上皮細胞において恒常的に $\alpha 1, 2$ -フコースが高発現していた。また、in vitro においてフコシル化上皮細胞と *S. typhimurium* の共培養系を確立するため、腸管上皮細胞株である MODE-K に Fut2 遺伝子を発現させることで $\alpha 1, 2$ -フコースを恒常的に発現した腸管上皮細胞株を樹立した。樹立した細胞株において、恒常的に $\alpha 1, 2$ -フコースを発現していることを確認するとともに、発現量の異なる細胞株を得た。*S. typhimurium* の感染に対する上皮細胞が発現する $\alpha 1, 2$ -フコースの役割について解析を進めた。in vitro において Fut2 ならびに $\alpha 1, 2$ -フコースを恒常的に発現した上皮細胞を作製し、*S. typhimurium* と共培養することで、*S. typhimurium* の上皮細胞への接着について検討した。その結果、Fut2 ならびに $\alpha 1, 2$ -フコースを発現した上皮細胞および非発現細胞では、*S. typhimurium* の接着が確認されたものの、Fut2 ならびに $\alpha 1, 2$ -フコースを発現した上皮細胞において接着が低下することを見出した (図 2)。このことから、上皮細胞の $\alpha 1, 2$ -フコースは *S. typhimurium* の接

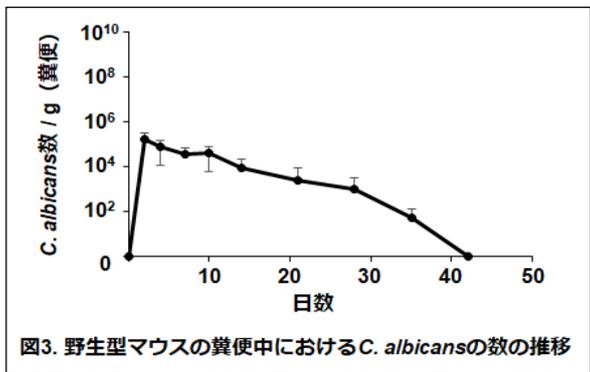


図3. 野生型マウスの糞便中におけるC. albicansの数の推移

着を阻害する機能を有することが示された。

ヒトの腸内には上記の病原性細菌だけでなく病原性真菌である *C. albicans* も常在することが知られている (3)。本研究では、上記、病原性細菌にくわえて *C. albicans* の腸管定着機構についても検討した。興味深いことに、野生型マウスに *C. albicans* を経口投与したところ腸管から完全に排除された (図 3)。一方、野生型マウスにβラクタム系抗生物質の一つであるアンピシリンを自由飲水で投与したマウスでは、*C. albicans* が胃、小腸、盲腸、大腸といった消化管全体に定着した (図 4)。このことから、アンピシリンに感受性を示す腸内細菌が、*C. albicans* の腸管への定着を阻害していると考えられる。また、次世代シーケンサーや定量的 PCR 法を用いた実験から、アンピシリン処理マウスでは野生型マウスと異なる腸内細菌叢を有しており、*Lactobacillus* や *Bacteroides*、*Clostridium* など多くの細菌が減少していることを見出している。さらに、アンピシリン処理して *C. albicans* が腸管に定着したマウスに、腸内細菌を投与することで、*C. albicans* が腸管から排除された。この結果から、腸管の真菌感染症に対する腸内細菌の防御効果が示された。興味深いことに、*C. albicans* を腸管に定着させると、腸管上皮細胞のα1, 2-フコースが誘導された。一方、*S. typhimurium* 感染の場合と異なり、*Fut2* 欠損マウスに *C. albicans* を経口投与しても、野生型マウスと同様に腸管から排除されたことから、腸管上皮細胞のα1, 2-フコースは *C. albicans* の腸管定着には寄与しないと考えられる。

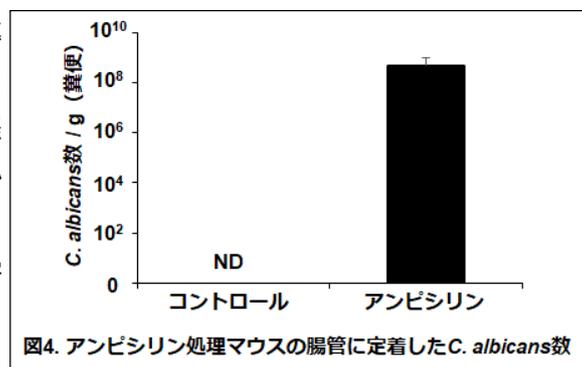


図4. アンピシリン処理マウスの腸管に定着した *C. albicans* 数

#### <引用文献>

1. Honda K, et al. *Annu Rev Immunol.* 30: 759-95, 2012
2. Goto Y, et al. *Science.* 345:1254009, 2014
3. Motooka D, et al. *Front Microbiol.* 8: 238, 2017

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

1. Matsuo K, Haku A, Bi B, Takahashi H, Kamada N, Yaguchi T, Saijo S, Yoneyama M, Goto Y. Fecal microbiota transplantation prevents *Candida albicans* from colonizing the gastrointestinal tract. *Microbiol Immunol.* 査読有. 2019 (in press). doi: 10.1111/1348-0421.12680.
2. 後藤 義幸. 自然リンパ球による腸管上皮細胞の糖鎖修飾誘導システム. 医歯薬出版. 査読無. 医学のあゆみ. 265(13), 1155-1158, 2018
3. 白 旭, 畢 蓓蓓, 後藤 義幸. 腸内細菌叢が代謝・免疫に与える基本的理解. 最新医学社. 査読無. 最新医学. 73 (4), 504-508, 2018
4. Ito T, Hirose K, Saku A, Kono K, Takatori H, Tamachi T, Goto Y, Renauld JC, Kiyono H, Nakajima H. IL-22 induces Reg3 and inhibits allergic inflammation in house dust mite-induced asthma models. *J Exp Med.* 査読有. 2017; 214: 3037-3050. doi: 10.1084/jem.20162108.
5. 松尾 謙蔵, 後藤 義幸. 腸管上皮細胞が発現するα1,2-フコースを介した腸内微生物叢制御. 生体の科学. 査読無. 2017, 68, 132-135.
6. 後藤 義幸. 腸管の恒常性維持と炎症誘導時における腸管上皮細胞の糖鎖修飾の役割. 臨床免疫・アレルギー科. 査読無. 2017, 67, 484-490.
7. 後藤 義幸, 清野 宏. 腸管上皮細胞が発現する糖鎖を介した粘膜バリア形成. 実験医学. 査読無. 2017, 35, 31-35.
8. Goto Y, Uematsu S, Kiyono H. Epithelial glycosylation in gut homeostasis and inflammation. *Nat Immunol.* 査読有. 2016;17:1244-1251. doi: 10.1038/ni.3587.

9. 後藤 義幸、SFB による免疫細胞を介した腸管バリア形成機構の解明. 腸内細菌学雑誌. 査読無. 2016, 30, 159-163.

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 免疫細胞による腸管上皮細胞を介した腸内微生物叢の制御機構, 口頭, 後藤 義幸, 第 67 回日本アレルギー学会総会、2018/6/22, 国内
2. Regulation of gut homeostasis by epithelial glycosylation, Oral, Yoshiyuki Goto, 2<sup>nd</sup> Japan-Korea joint meeting on Mucosal Immunology, 2018/6/21, 国内
3. 樹状細胞および 3 型自然リンパ球による腸管 Th17 細胞の恒常性制御, 口頭, 後藤 義幸, 第 22 日本心血管内分泌代謝学会学術集会、2018/4/28、国内
4. Regulation of gut homeostasis mediated by epithelial glycosylation, 口頭, Yoshiyuki Goto, 1<sup>st</sup> Japan-Korea joint meeting on mucosal immunology, 2017/5/6, 国外
5. 腸内細菌は腸管における病原性真菌の定着を阻害する, 口頭, 後藤義幸, 第 91 回日本細菌学会総会・学術集会, 2017/3/27, 国内
6. 腸管上皮細胞の $\alpha$ 1, 2-フコシル化は免疫細胞によって調節される, 口頭, 後藤 義幸, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017/3/19, 国内
7. 腸内細菌による免疫細胞を介した腸管バリア形成機構の解明, 口頭, 後藤 義幸, 第 20 回腸内細菌学会, 2016/6/9, 国内
8. Commensal bacteria and ILC3 regulate intestinal homeostasis, oral presentation, Yoshiyuki Goto, American Association of Immunologist annual meeting 2016, 2016/5/17, 国外

〔図書〕(計 1 件)

Glycoscience: Basic Science to Applications, Chapter 14. Glycans in Infection and Immunity, Hiroshi Kiyono and Yoshiyuki Goto, Springer Nature, 2019 in press.

〔その他〕

・研究室ホームページ

[http://www.pf.chiba-u.ac.jp/project\\_symbiosis/index.html](http://www.pf.chiba-u.ac.jp/project_symbiosis/index.html)

・「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 腸内細菌～ミクロな世界の共生生物学～, 後藤義幸, 第 164 回あかりんアワー「教員が研究の楽しさを語る」, 2017/07/04, 国内
2. アメリカ留学を終えて, 後藤 義幸, UJA&JSPS 共催 研究留学推進セミナー, 2016/07/02, 国内

・受賞

1. 平成 29 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞. 2017 年 4 月 19 日
2. 平成 27 年度日本ビフィズス菌センター研究奨励賞. 2016 年 5 月 7 日

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。