

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15187

研究課題名(和文)腸管上皮における糖鎖発現機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism by which glycan expression is regulated in intestinal epithelia

研究代表者

奥村 龍 (Okumura, Ryu)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00793449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多くの腸内細菌が存在する腸管では、腸管上皮細胞から分泌される多量の粘液が粘膜を被覆し、腸内細菌の組織侵入を防止している。また粘液中の糖鎖は、その粘液の機能に重要であることが知られているが、糖鎖発現機構や糖鎖の詳細な機能については不明であった。本研究により、その糖鎖付加に関わる糖転移酵素の中で、B3gal t5、St6galnac6は小腸において腸内細菌依存的に上皮での発現が亢進し、またそれらの糖転移酵素は大腸において恒常的に発現していること、またB3gal t5、St6galnac6によって生合成されるジシアリルルイスAが腸管で欠失すると、腸管炎症の感受性が高まることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患(以下IBD)は、いまだ根治的治療がない難治性疾患である。IBDの病因の一つとして、腸管上皮によって構築される粘液を中心とした粘膜バリアの破綻が示唆されているが、その詳細は不明である。本研究によって腸管での機能が明らかとなったB3GALT5遺伝子は、一部のIBD患者でその遺伝子異常が報告されており、その異常はIBDの病因の一つである可能性がある。本研究ではB3gal t5、St6galnac6によって生合成されるジシアリルルイスAの粘膜バリアにおける重要性が明らかとなり、その糖鎖をターゲットとした新たな炎症性腸疾患治療が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the gut, where tremendous numbers of bacteria exist, a large amount of mucus secreted by intestinal epithelial cells cover the gut epithelia to prevent bacteria from invading the intestinal tissue. The mucus contains high amounts of glycans, which are known to be critical for the function of the mucus. However, the mechanism by which the glycan expression is regulated and the details of the glycan functions in the gut remained unclear. In this study, we found that the expression of B3gal t5 and St6galnac6, which are glycosyltransferases, is upregulated by commensal bacteria in the small intestine. In addition, it was found that these glycosyltransferases are highly and constitutively expressed in the large intestine. Finally, we found that the defect of disialyl lewis a in the gut, which is a glycan structure biosynthesized through the expression of B3gal t5 and St6galnac6, resulted in high susceptibility to intestinal inflammation.

研究分野：免疫学

キーワード：粘膜バリア 糖鎖 腸管上皮細胞 炎症性腸疾患 粘液

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腸管において宿主と腸内微生物との共生関係を可能にしているのが、腸管上皮細胞によって作り出される粘液層などの粘膜バリアである。またそのような粘膜バリアの機能に不可欠であるのが、粘液の構成成分であるムチンなどの糖タンパク質に付加されている大量の糖鎖である。近年、腸管上皮細胞表面に発現する糖タンパク質へのフコース付加が、ある種の腸内細菌依存性であることが明らかとなり、さらにそのフコシル化が病原性細菌侵入に対する防御に重要であることが明らかとなった。このことは腸管上皮細胞表面蛋白やムチンなどの糖鎖修飾が腸内細菌を含む腸内環境によって制御され、粘膜バリア構築に重要であることを示唆している。しかしながら、腸管上皮細胞における糖鎖発現の制御機構やそれぞれの糖鎖の粘膜バリアにおける機能の詳細はこれまで明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

腸内細菌によって発現制御される糖転移酵素遺伝子を同定し、腸管におけるそれらの機能を同定する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 腸内細菌によって腸管上皮にて発現が誘導される糖転移酵素の同定

Specific-pathogen free (SPF) 環境下と無菌 (GF) 環境下の C57BL6/J マウスから、小腸と大腸を剖出し、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 存在下の Hank 's 平衡塩溶液で浸透させて腸管上皮細胞を単離し、それらの細胞から RNA を精製し、RNA-seq 解析により網羅的に遺伝子発現を解析した。

#### (2) 糖転移酵素欠損マウスの作製

目的糖転移酵素遺伝子の遺伝子座に guide RNA を設計し、C57BL6/J マウスの受精卵にエレクトロポレーション法により、設計した guide RNA と Cas9 タンパク質を導入し、偽妊娠マウスに移植した後、生まれきた産仔から目的領域を欠損した産仔を選択し、その後野生型マウスを交配させ、生殖細胞系列で遺伝子欠損が移行していることを確認した。

#### (3) 腸管における糖鎖発現の解析

カルノア固定法で固定し、パラフィン包埋した大腸組織から組織切片を作製し、脱パラフィン、ブロッキング後、ジシアリルルイス A 抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点顕微鏡にて染色した切片を観察し、大腸組織ならびに管腔におけるジシアリルルイス A の発現を評価した。

#### (4) 粘液層の厚みの評価

(3) と同様の方法で作製した大腸組織切片を、脱パラフィン、ブロッキングを行った後、腸内細菌を Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法で染色し、粘液を抗 MUC2 抗体で染色して、共焦点顕微鏡にて画像を取得後、画像解析ソフトで粘液層の厚みを計測した。

#### (5) デキストラン硫酸ナトリウム飲水による実験的腸炎モデル

2% のデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 水溶液を野生型マウス、B3gal<sup>t5</sup> 欠損マウス、St6gal<sup>nac6</sup> 欠損マウスに 5 日間自由飲水させ、毎日体重、便性状を評価するとともに、最終的に大腸の組織学的解析によりデキストラン硫酸ナトリウムによって誘導される大腸炎の重症度を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 腸内細菌によって腸管上皮にて発現が誘導される糖転移酵素の同定

腸内細菌によって誘導される糖鎖発現を解析するため、SPF マウスと無菌 (GF) マウスの各雄雌のマウスの小腸上部、小腸下部、大腸の上皮細胞を単離し、RNA-seq 解析により網羅的に SPF マウスと GF マウスの腸管上皮細胞における遺伝子発現の相違を解析した。全遺伝子の中で発現量が FPKM0.1 以上の遺伝子を解析対象とし、その中で計 135 の糖転移酵素遺伝子 (Glycogene) について発現量を解析した。まず大腸上皮における糖転移酵素の発現をみたところ、SPF マウスと GF マウスで 2 倍以上の発現変化を認める糖転移酵素は認められず、大腸においては腸内細菌により発現が誘導される糖転移酵素は同定できなかった。一方で小腸下部においては、SPF/GF で雄、雌の平均が 2 倍以上の発現上昇を認める糖転移酵素が存在し、これまで腸内細菌によって発現誘導されることが報告されている *Fut2* (SPF/GF fold change: 20.876) 以外にも、*B3gal<sup>t5</sup>* (SPF/GF fold change: 39.499)、*B3gnt7* (SPF/GF fold change: 3.920)、*St6gal<sup>nac6</sup>* (SPF/GF fold change: 2.348) など、腸内細菌によって誘導される糖転移酵素が計 11 個同定された。さらにこれらの同定された遺伝子の多くが、小腸に比べ大腸上皮において発現が高いこと (*Fut2*: 8.663 倍、*B3gal<sup>t5</sup>*: 23.322 倍、*B3gnt7*: 11.378 倍、*St6gal<sup>nac6</sup>*: 437.559 (大腸/小腸下部)) が

明らかとなった。

(2) 大腸におけるジシアリルルイス A 糖鎖の発現は B3gal t5、St6galnac6 の発現により制御される。

次に、上記の小腸において腸内細菌によって発現誘導され、大腸において高発現している糖転移酵素の中から、炎症性腸疾患患者の一部で変異が同定されている B3gal t5 に着目した。B3gal t5 は、同じく大腸で高発現が認められる St6gal nac6 とともに、ジシアリルルイス A 糖鎖の生合成に不可欠であることが知られており、大腸においてこのジシアリルルイス A がバリア機能に重要な役割を果たしているのではないかと考えた。その仮説を証明するため、まず CRISPR/Cas9 システムを用いて、B3gal t5、St6gal nac6 遺伝子それぞれの遺伝子欠損マウスを作製した。この遺伝子欠損マウスの大腸におけるジシアリルルイス A の発現を大腸組織の免疫染色により評価したところ、予想通り両欠損マウスにてジシアリルルイス A 糖鎖の発現の著しい低下を認めた(図1)。このことから B3gal t5、St6gal nac6 は大腸におけるジシアリルルイス A 糖鎖の生合成に不可欠であることが明らかとなった。また MUC2 欠損マウスでは、ジシアリルルイス A の発現量が低下することから、大腸の主要な粘液成分である MUC2 にジシアリルルイス A が付加されていることが明らかとなった。

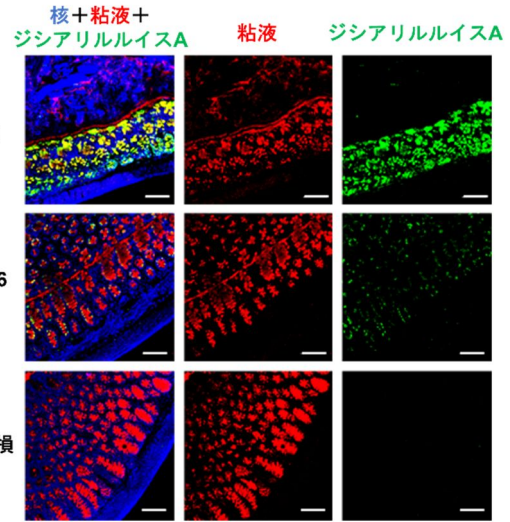


図1 大腸組織におけるジシアリルルイスAの発現

(3) ジシアリルルイス A の欠損により、腸管炎症に対する感受性が亢進する。

最後に B3gal t5 と St6gal nac6 によって生合成されるジシアリルルイス A が、大腸上皮バリアにおいてどのような役割を果たしているかを解析した。まず両遺伝子欠損マウスにおける大腸の

粘液層の厚みを評価したところ、野生型マウスと比較し、両遺伝子欠損マウスの粘液層が有意に狭小化していた。このことから、ジシアリルルイス A は粘液層の構築に重要であることが示唆された。またそれぞれの遺伝子欠損マウスにデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)水溶液を飲水させ大腸炎を誘導し、野生型マウスと体重減少、便性状、組織学的炎症像を比較したところ、それぞれの遺伝子欠損マウスにて著明な体重減少と血便を認め、組織学的にも激しい腸炎像を認めた(図2)。以上の結果から、大腸粘液層に認められるジシアリルルイス A は、大腸バリアにおいて粘液層の正常構造を保つのに重要であるとともに、腸管炎症の抑制に重要であることが明らかとなった。

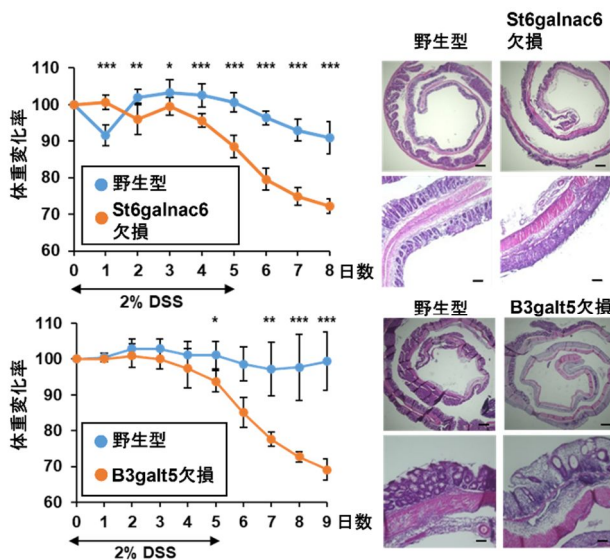


図2 ジシアリルルイスAの欠損によりDSS腸炎が重症化する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------