

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16251

研究課題名（和文）腸管粘膜細菌叢がもたらす宿主恒常性維持機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of host physiological homeostasis by intestinal mucosa-associated microbiota

研究代表者

楊 佳約（YANG, Jiayue）

慶應義塾大学・政策・メディア研究科（藤沢）・特任助教

研究者番号：10804825

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）：腸内細菌叢が人体の健康に影響を与えることが報告されている。その中でも腸管粘膜近傍に局在する腸内細菌の中には、宿主免疫系に影響を与える腸内細菌の存在が報告されていることから、粘膜近傍に局在する腸内細菌の機能理解は重要である。本研究は大腸腸管粘膜と小腸クリプトに局在する新規の細菌を同定し、同菌が無菌マウスへ定着するためにはパートナーとなる細菌が必要であることを明らかにした。さらに、同菌定着させたマウスは炎症性腸疾患（IBD）のマウスモデル大腸炎の症状が緩和された。よって同菌は宿主健康に有益な細菌と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IBDは腸管免疫の破綻によって引き起こされる病気であり、腸内細菌叢が深く関与しており、患者数は増加の一途を辿っている。しかしながら、疾患の要因が多種多様であり完全に解明されておらず、根本的な治療法が確立していないため、根治は難しく、患者は社会的活動を中断せざるを得ないケースが多く存在する。そのため、有効な治療法の開発が求められる。本研究で発見した新規の腸管粘膜近傍局在細菌はIBDの治療法の開発に応用可能だと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Various commensal bacteria inhabit our human intestine. Particularly, the intestinal mucosal bacteria have been reported to impact host health by modulation of the host immune system. Therefore, it is important to identify the mucosal bacteria and elucidate their function further. However, the knowledge of mucosa-associated bacteria is limited due to the conventional invasive sampling method. In this study, we discovered that a bacterial taxon is a novel mucosa-associated bacterium and inhabits not only the colon mucosal layer but also in the crypt of small intestine. This bacterium alone could not colonize in germ-free mice and required co-colonization. Dextran sodium sulfate (DSS) colitis model is a mice experimental model for human inflammatory bowel diseases. Gnotobiotic mice with this bacterium greatly improved the survival rate and the symptom of DSS-induced colitis. Thus, this bacterium could influence the host health by the modulation of intestinal immune system.

研究分野：腸内細菌

キーワード：腸内細菌 腸管粘膜 腸管粘膜細菌 炎症性腸疾患 大腸炎

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸内には多種多様な細菌が生息し、健康状態と密接に関わることが知られている。特に腸内細菌叢から産生される代謝物質が、宿主の恒常性維持や疾病発症に影響を及ぼすことが近年の研究で明らかとなっている¹。腸内細菌叢から産生された代謝物質は物理的な距離として宿主に近いほど影響し易いと考えられることから、個々の腸内細菌の腸管内における局在も腸内細菌の機能性に重要であると推察される。さらに、腸管粘膜近傍に局在する腸内細菌の中には、宿主免疫系に影響を与える腸内細菌の存在が報告されている^{2,3}。その一方、腸管粘膜細菌叢の知見は限られている。その原因の一つとして、腸管粘膜細菌叢を調べるためには解剖といった侵襲的なアプローチが必要であり、その解析手法が確立されていないことが考えられる。申請者のこれまでの研究により、マウス糞便の表面は粘膜層でおおわれており、これを綿棒で擦るという非侵襲的な手法によって、マウス糞便表面の細菌叢を採取できることを明らかにした。マウス糞便表面の細菌叢は大腸粘膜層に面する細菌叢と相似していることも明らかとなった。従って、同手法を用いれば簡便に非侵襲的かつ経時的に同一個体のマウスの大腸粘膜細菌叢を調べることができると考えられる。さらに、顕微鏡イメージング法と組み合わせることによって時空間的に腸管粘膜細菌叢を詳細に解析することが可能と考えられる。これによって多様な腸内細菌叢の中でも腸管粘膜層付近で宿主と相互作用する細菌の機能及び宿主との関係性を明らかにすることができることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は腸管粘膜層付近で宿主と相互作用する細菌の機能及び宿主との関係性を明らかにすることである。その解明は腸管粘膜細菌叢の制御による新たな健康維持、疾患予防・治療法の基盤技術につながることを期待される。

3. 研究の方法

(1) 腸管の局在観察

本研究では腸管粘膜に局在する新規の細菌を同定し、当該細菌特異的なプローブを用いて Fluorescence in situ hybridization (FISH) 染色と共焦点顕微鏡を用いて当該細菌の小腸から大腸までの局在を観察した。

(2) 通常飼育マウスデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)大腸炎モデル

宿主の健康に与える影響を調べるために、当該細菌を1日おきに通常飼育 C57BL/6 雌マウスに投与し、2%DSS水溶液を1週間飲ませ、大腸炎を誘導したのち、水に切り替えて回復期を設けた。マウスの体重変化や糞便の堅さ、便から検出される出血量等から大腸炎への影響を評価した。

(3) ノトバイオームマウス DSS 大腸炎モデル

腸内細菌が宿主に与える影響をより明確に評価できる無菌マウス実験系を用いて DSS 大腸炎誘導実験を行った。当該細菌をパートナー細菌とともに無菌の C57BL/6 雌マウスに4週間定着させたのち、1.5%DSS水溶液を1週間飲ませ、大腸炎を誘導した。マウスの体重変化と糞便の堅さおよび出血量から大腸炎への影響を評価した。

(4) フローサイトメトリー(FACS)による小腸粘膜固有層の免疫プロファイルの比較

当該細菌が腸管免疫に与える影響を調べるために、パートナー細菌とともに無菌の C57BL/6 雌マウスに4週間定着させたのち、小腸粘膜固有層よりリンパ球を回収し、抗体を用いて染色を行ったあと、免疫細胞の違いを FACS によって比較した。

4. 研究成果

本研究により大腸腸管粘膜に局在する新規の細菌を同定した。当該細菌の小腸での局在を FISH染色後共焦点顕微鏡観察した結果、当該細菌は通常無菌と言われている小腸腸陰窩に局在

することが明らかとなった。当該細菌が DSS大腸炎誘導マウスにおいて大腸炎誘導後にその存在割合が減少することを明らかにした。DSS大腸炎モデルは近年増加している炎症性腸疾患 (IBD)のマウスモデルであり、腸管免疫の破綻によって引き起こされる。したがって、当該細菌は腸管免疫と関連がある菌であると考えられる。本研究ではDSS大腸炎モデルマウスを用い、当該細菌を経口投与することで、DSSによる大腸炎の悪化と悪化からの回復について評価した。その結果、当該細菌は炎症を増悪させる一方、回復促進作用もあることが示唆された。しかしその後通常飼育のマウスDSS大腸炎マウスモデルの大腸炎悪化の再現性実験を実施したが、同様な傾向が認められなかった。そのため、腸内細菌の影響を明確に評価可能な無菌マウスに当該細菌を定着させ、ノトバイオートマウスを用いてDSS大腸炎実験を実施した。興味深いことに、当該細菌は無菌マウスに単独で定着することができず、他の細菌と一緒に投与した場合にのみ定着できた。そのため、パートナー細菌の単独定着と当該細菌との共定着のノトバイオートマウスをそれぞれ作成し、DSS大腸炎の症状を比較した。その結果当菌を定着させたマウスではコントロール群と比較して大腸炎の症状が緩和し、マウスの生存率も有意に改善した。これらの作用機序を調べるためにノトバイオートマウスの小腸の免疫細胞プロファイルをFACSにより解析したが、大きな違いは認められなかった。現在作用メカニズムの解明を進めている。具体的にはノトバイオートマウスの腸管のRNA-Seqを実施し、遺伝子発現の違いを比較するとともに、盲腸内容物を代謝物質の網羅的解析に用いられるキャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)や液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)によるメタボローム解析を行うことで抗炎症作用のある代謝物質を絞り込んでいる。

<引用文献>

1. Yang, J. *et al.* Does the Gut Microbiota Modulate Host Physiology through Polymicrobial Biofilms? *Microbes Environ* **35** (2020). <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME20037>
2. Atarashi, K. *et al.* Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* **163**, 367-380 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.058>
3. Dejea, C. M. *et al.* Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 18321-18326 (2014). <https://doi.org/10.1073/pnas.1406199111>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yang Jiayue, Yang Yongshou, Ishii Manami, Nagata Mayuko, Aw Wanping, Obana Nozomu, Tomita Masaru, Nomura Nobuhiko, Fukuda Shinji	4. 巻 35
2. 論文標題 Does the Gut Microbiota Modulate Host Physiology through Polymicrobial Biofilms?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/j sme2.ME20037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 楊 佳約、尾花 望、野村 暢彦、富田 勝、福田 真嗣
2. 発表標題 腸管粘膜近傍に局在する腸内細菌が宿主に与える影響
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 楊 佳約、尾花 望、野村 暢彦、富田 勝、福田 真嗣
2. 発表標題 腸管粘膜細菌叢がもたらす宿主免疫系への影響
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

〔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
---------	---------