

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19120

研究課題名（和文）母乳オリゴ糖の腸管上皮幹細胞ニッチを介した腸内環境発達メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of development of the intestinal environment via intestinal epithelial stem cell niche activity mediated by milk oligosaccharides.

研究代表者

中村 公則（Nakamura, Kiminori）

北海道大学・先端生命科学研究院・教授

研究者番号：80381276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、母乳オリゴ糖の腸管上皮幹細胞ニッチを形成する腸管上皮幹細胞とPaneth細胞への作用を解明することで、腸内環境の正常化を標的とした新規疾患予防法を開発することを目的とする。本研究の腸管上皮エンテロイドのライブイメージング解析とマウスへの投与実験の結果により、オリゴ糖の直接的な腸管上皮幹細胞ニッチへの活性作用が、腸内細菌叢形成を介して上皮組織形成や修復に関与することが示唆された。本研究成果は、腸管上皮幹細胞ニッチを標的とした新規疾患予防法開発に貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

母乳中に含まれるオリゴ糖が乳児期の健全な腸内細菌叢形成を促し、子の将来のさまざまな疾病リスク軽減に寄与することが知られている。これまで母乳オリゴ糖の機能はビフィズス菌の選択的資化など共生側（細菌）の解析が中心に示されており、宿主側の腸管上皮細胞への作用は全く検討されていない。本研究の成果により、オリゴ糖の腸管上皮幹細胞ニッチを形成する腸管上皮幹細胞とPaneth細胞に対する活性を介した腸内細菌叢形成および腸管組織形成への関与が示されたことで、腸管上皮幹細胞ニッチ機能の活性化の誘導による腸内環境の正常化を標的とした、新規疾患予防法の開発が促進することが期待される。

研究成果の概要（英文）： This study aims to elucidate the effects of breast milk oligosaccharides on intestinal epithelial stem cells and Paneth cells, which form the intestinal epithelial stem cell niche, and to develop novel disease prevention methods targeting the normalization of the intestinal environment. The results of live imaging analysis using intestinal epithelial enteroids and administration experiments in mice suggest that the direct active effect of oligosaccharides on the intestinal epithelial stem cell niche is involved in tissue formation and repair via the modulation of the intestinal microbiota. This study will contribute to the development of novel disease prevention methods targeting the intestinal epithelial stem cell niche.

研究分野：粘膜炎

キーワード：母乳オリゴ糖 腸内環境 腸管上皮細胞 Paneth細胞 幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腸内細菌研究の発展に伴い、乳幼児期の腸内細菌叢形成が脳神経や免疫の機能発達に関与し、その破綻が肥満症をはじめとする生活習慣病や自閉症などの精神疾患の発症リスク上昇に関与することが示唆されている。また、乳幼児期の健全な腸内細菌叢形成において母乳栄養の優位性が示され、特に主たる母乳成分である母乳オリゴ糖の腸内細菌叢制御作用の重要性が注目されている。母乳摂取後、腸管内腔において母乳オリゴ糖は、共生側である腸内細菌と宿主である腸管上皮細胞に曝露される。これまで母乳オリゴ糖の腸内細菌叢制御メカニズムについては、プレバイオティクスとしての効果において多くの研究結果が示されているが、腸管上皮細胞に対する作用やそれを介した腸内細菌叢と腸管組織の発達・形成への影響については未だ全く明らかにされていない。研究代表者はこれまで、腸管上皮幹細胞ニッチを構成する Paneth 細胞が分泌する抗菌ペプチド ディフェンシンが、選択的殺菌活性による腸内細菌叢制御によって宿主の生体恒常性維持に有利な役割を果たすことを明らかにしてきた。また、腸管上皮幹細胞は Paneth 細胞と分化・増殖制御において強い相互関係が知られており、上皮組織の構造や細胞比率決定により代謝機能や細胞間接着、さらには腸内細菌叢制御に関与することが示唆されている。さらに、Paneth 細胞は食成分によっても ディフェンシン分泌が誘導されることや、腸管上皮幹細胞の食成分へのセンシング機能も報告されている。以上より、母乳栄養による子の健康体質の優位性は、母乳オリゴ糖の共生側への資化作用のみではなく、腸管上皮幹細胞ニッチ機能の発達すなわち、Paneth 細胞 ディフェンシンの分泌誘導や幹細胞の分化・増殖制御を介した適切な腸内細菌叢形成および腸管組織形成誘導による宿主側への作用が重要なのではないかと考えられ、その分子メカニズムの解明は、より母乳と機能的に同等な乳児用調整粉乳開発の基盤技術へと発展し、人工乳栄養による児の健康維持と疾患リスク低減への貢献が期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究は、母乳オリゴ糖の幹細胞と Paneth 細胞に対する作用に着目し、宿主因子を介した腸内細菌叢形成および腸管組織形成のメカニズムをはじめて解明することで、腸管上皮幹細胞ニッチ機能の修復および活性化の誘導による乳児の腸内環境発達機構の正常化を標的とした、革新的な新規疾患予防戦略を構築することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 3 次元培養体腸管上皮エンテロイドを用いた腸管上皮幹細胞ニッチ活性の解析。

C57BL/6 の空腸を摘出し、陰窩を単離した。得られた単離陰窩を Matrigel で包埋し、EGF、Noggin、R-spondin1 を含む培地にて培養しエンテロイドを得た。培養 3-4 日目のエンテロイドを共焦点レーザー顕微鏡(A1、Nikon)下、time-lapse 撮影しながらエンテロイド内腔へ needle を刺入し、空圧マイクロインジェクターにより加圧することで乳糖由来オリゴ糖 500mg/mL を注入した。注入開始から 30 分間にわたりタイムラプス撮影し、内腔に分泌される Paneth 細胞の顆粒数を測定した。

(2) オリゴ糖投与による腸管上皮幹細胞ニッチ活性の解析。

C57BL/6JJcl (7w, male, 各 n = 6) に乳糖由来オリゴ糖を 4 週間毎日 20 g/kg/day 経口投与し、経時的に体重測定と便をサンプルによる 16S リボソーム RNA 配列解析、また投与 4 週に小腸の組織的解析を行った。

(3) DSS 大腸炎モデルにおける、オリゴ糖の腸管上皮幹細胞ニッチ保護効果の解析。

C57BL6/6JJcl (7w, male, 各 n = 6) に乳糖由来オリゴ糖を 3 週間毎日 20 g/kg/day 経口投与後、3.5% デキストラン硫酸ナトリウム (dextran sodium sulfate: DSS) を 7 日間自由飲水させ経時的に体重を測定した。

(4) 統計学的解析

測定値は平均 ± 標準誤差で示した。統計学的解析は Student's t-test または One way ANOVA を行い、危険率 5%未満 ( $p < 0.05$ ) を有意とした。One-way ANOVA で差が認められた場合、事後検定として Tukey's multiple comparison test を行った。

本研究におけるすべての動物実験は、国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定に基づいて行った。

### 4. 研究成果

(1) 乳糖由来オリゴ糖をマイクロインジェクション法にてエンテロイド内腔に導入したところ、Paneth 細胞内顆粒の活発な内腔への分泌が示された。一方、コントロールとして導入した PBS において顆粒分泌は観察されな

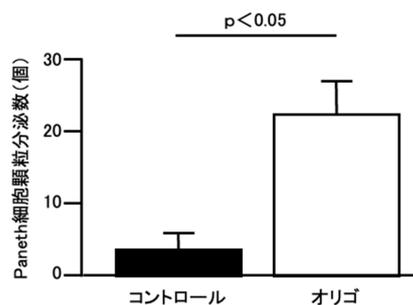


図1. Paneth細胞顆粒分泌

かった。この結果より、オリゴ糖の腸内細菌叢を介さない腸管上皮幹細胞ニッチへの直接的な活性誘導効果が示された(図1)。

(2) 乳糖由来オリゴ糖をマウスに4週間毎日経口投与したところ、オリゴ糖投与群と非投与群において経時的な体重変動に差は見られなかった(図2)。腸内細菌叢は多様性解析において、投与開始1週間から4週にかけて投与群と非投与群で異なる腸内細菌構成を示した(図3)。Phylum レベルでの相対占有率解析において、投与群は、非投与群と比較して、投与開始3週から Bacteroidetes の減少と Actinobacteria の上昇を示した(図4)。投与開始4週に小腸の組織学的に解析したところ、投与群は非

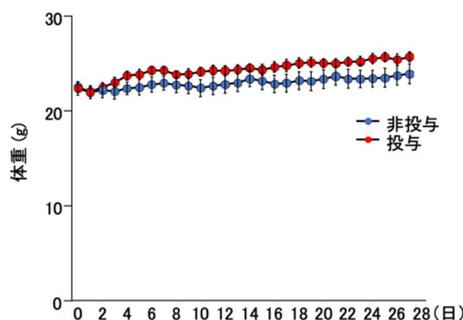
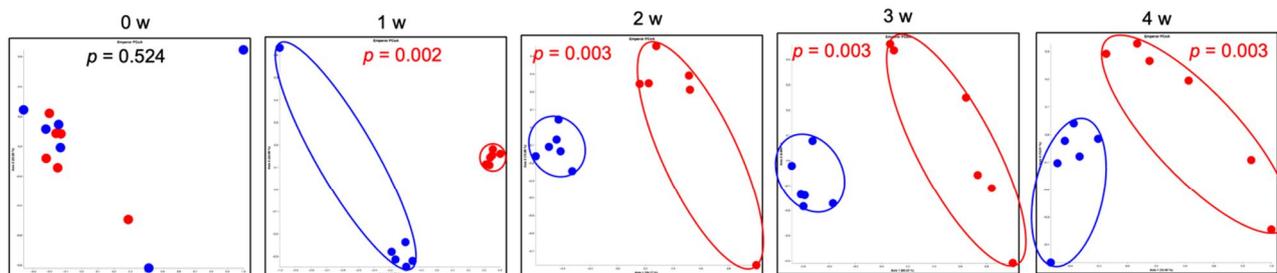


図2. 体重推移



PCoA plot based on unweighted UniFrac distance  
Statistical significance was calculated by PERMANOVA ● 非投与 ● 投与

図3. 腸内細菌叢解析(β多様性解析)

投与群と比較して絨毛長と陰窩長の延長、Paneth細胞数の増加が示された(図5)。この結果より、オリゴ糖の腸管上皮幹細胞ニッチへの活性化による上皮構造の増強と Paneth細胞数増加に伴う腸内細菌叢変動の可能性が示された。

(3) 大腸炎モデルに乳糖由来オリゴ糖を経口投与することで、オリゴ糖の腸管上皮細胞ニッチ活性化を介した、急性炎症への予防効果を評価した。DSS投与10日目に投与群は非投与群と比較して、体重の減少を抑制した(図6)。この結果より、オリゴ糖の腸管上皮幹細胞ニッチへの活性化による上皮構造の増強がDSSによる上皮構造崩壊を保護することが示唆された。

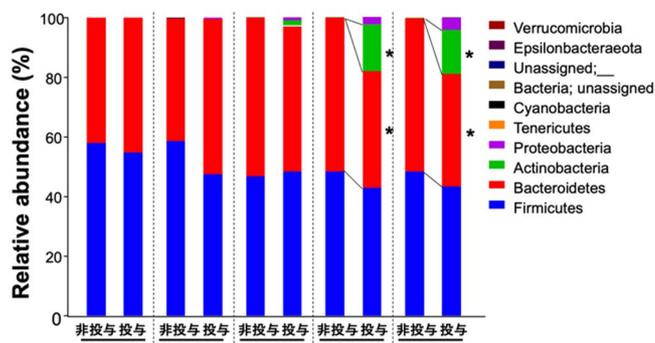


図4. 腸内細菌叢解析(占有率解析)

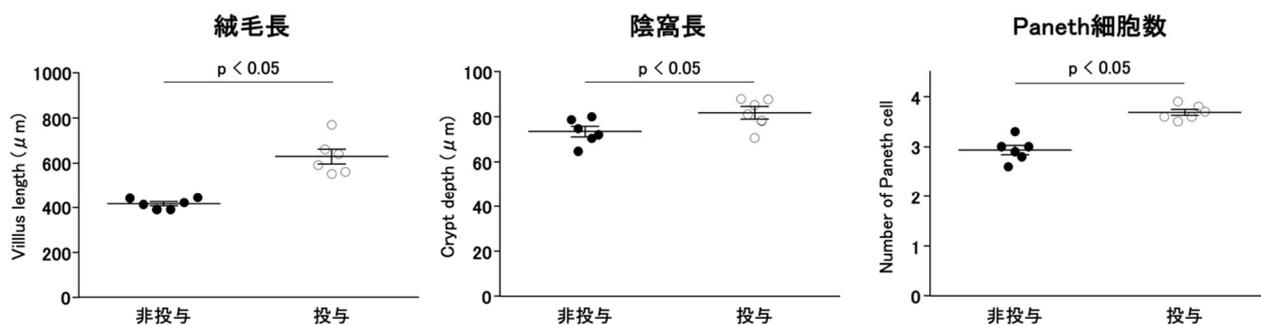


図5. 小腸上皮組織評価

以上の結果より、オリゴ糖の腸管上皮幹細胞ニッチを形成する腸管上皮幹細胞と Paneth細胞に対する活性作用を介した腸内細菌叢形成および腸管組織形成への関与が示された。本研究成果により、腸管上皮幹細胞ニッチ機能の活性誘導による腸内環境の正常化を標的とした、新規疾患予防法の開発が促進することが期待される。

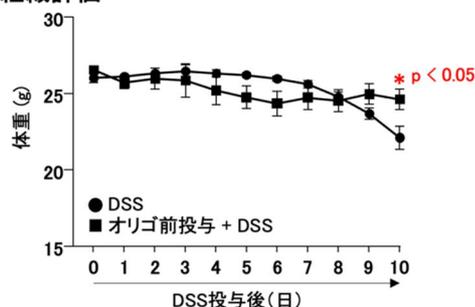


図6. オリゴ投与後のDSS腸炎誘導体重推移

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 YONOICHI Sakura, HARA Yukako, ISHIDA Yuya, SHODA Asuka, KIMURA Mako, MURATA Midori, NUNOBIKI Sarika, ITO Makiko, YOSHIMOTO Ayano, MANTANI Youhei, YOKOYAMA Toshifumi, HIRANO Tetsushi, IKENAKA Yoshinori, YOKOI Yuki, AYABE Tokiyoshi, NAKAMURA Kiminori, HOSHI Nobuhiko	4. 巻 86
2. 論文標題 Effects of exposure to the neonicotinoid pesticide clothianidin on $\alpha$ -defensin secretion and gut microbiota in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 277 ~ 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.23-0514	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 -

1. 著者名 Gan Li, Inamura Yuga, Shimizu Yu, Yokoi Yuki, Ohnishi Yuki, Song Zihao, Kumaki Yasuhiro, Kikukawa Takashi, Demura Makoto, Ito Masaaki, Ayabe Tokiyoshi, Nakamura Kiminori, Aizawa Tomoyasu	4. 巻 13
2. 論文標題 A Basic Study of the Effects of Mulberry Leaf Administration to Healthy C57BL/6 Mice on Gut Microbiota and Metabolites	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 1003 ~ 1003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo13091003	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 -

1. 著者名 Wang Yi, Song Yuchi, Yan Shaonan, Hiramine Rina, Ohnishi Yuki, Yokoi Yuki, Nakamura Kiminori, Kikukawa Takashi, Ayabe Tokiyoshi, Aizawa Tomoyasu	4. 巻 12
2. 論文標題 Antimicrobial Properties and Mode of Action of Cryptdin-4, a Mouse $\alpha$ -Defensin Regulated by Peptide Redox Structures and Bacterial Cultivation Conditions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 1047 ~ 1047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics12061047	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 -

1. 著者名 Song Zihao, Ohnishi Yuki, Osada Seiji, Gan Li, Jiang Jiayi, Hu Zhiyan, Kumeta Hiroyuki, Kumaki Yasuhiro, Yokoi Yuki, Nakamura Kiminori, Ayabe Tokiyoshi, Yamauchi Kazuo, Aizawa Tomoyasu	4. 巻 13
2. 論文標題 Application of Benchtop NMR for Metabolomics Study Using Feces of Mice with DSS-Induced Colitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 611 ~ 611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo13050611	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 -

1. 著者名 Shimizu Yu, Yamamura Ryodai, Yokoi Yuki, Ayabe Tokiyoshi, Ukawa Shigekazu, Nakamura Koshi, Okada Emiko, Imae Akihiro, Nakagawa Takafumi, Tamakoshi Akiko, Nakamura Kiminori	4. 巻 15
2. 論文標題 Shorter sleep time relates to lower human defensin 5 secretion and compositional disturbance of the intestinal microbiota accompanied by decreased short-chain fatty acid production	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gut Microbes	6. 最初と最後の頁 2190306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19490976.2023.2190306	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 -

1. 著者名 Nakamura Shunta, Nakamura Kiminori, Yokoi Yuki, Shimizu Yu, Ohira Shuya, Hagiwara Mizu, Song Zihao, Gan Li, Aizawa Tomoyasu, Hashimoto Daigo, Teshima Takanori, Ouellette Andre J., Ayabe Tokiyoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Decreased Paneth cell $\alpha$ -defensins promote fibrosis in a choline-deficient L-amino acid-defined high-fat diet-induced mouse model of nonalcoholic steatohepatitis via disrupting intestinal microbiota	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-30997-y	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 -

1. 著者名 Komatsu Yosuke, Wada Yasuaki, Tabata Fuka, Kawakami Satomi, Takeda Yasuhiro, Nakamura Kiminori, Ayabe Tokiyoshi, Nakamura Koshi, Kimura Takashi, Tamakoshi Akiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Associations between Maternal Diet, Human Milk Macronutrients, and Breast-Fed Infant Growth during the First Month of Life in the SMILE Iwamizawa in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 654 ~ 654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu15030654	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 -

1. 著者名 Song Yuchi, Wang Yi, Yan Shaonan, Nakamura Kiminori, Kikukawa Takashi, Ayabe Tokiyoshi, Aizawa Tomoyasu	4. 巻 22
2. 論文標題 Efficient recombinant production of mouse-derived cryptdin family peptides by a novel facilitation strategy for inclusion body formation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbial Cell Factories	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12934-023-02016-2	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 -

1. 著者名 Ohira Shuya, Yokoi Yuki, Ayabe Tokiyoshi, Nakamura Kiminori	4. 巻 637
2. 論文標題 Efficient and simple genetic engineering of enteroids using mouse isolated crypts for investigating intestinal functions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 153 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.11.008	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 -

1. 著者名 Chen Xuanzhong, Hashimoto Daigo, Ebata Ko, Takahashi Shuichiro, Shimizu Yu, Shinozaki Ryuga, Hasegawa Yuta, Kikuchi Ryo, Senjo Hajime, Yoneda Kazuki, Zhang Zixuan, Harada Shinpei, Hayase Eiko, Ara Takahide, Ohigashi Hiroyuki, Iwakura Yoichiro, Nakamura Kiminori, Ayabe Tokiyoshi, Teshima Takanori	4. 巻 119
2. 論文標題 Reactive granulopoiesis depends on T-cell production of IL-17A and neutropenia-associated alteration of gut microbiota	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2211230119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2211230119	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 -

1. 著者名 Funane Tsukasa, Yokoi Yuki, Kikuchi Masashi, Shinozaki Ryuga, Ayabe Tokiyoshi, Atsumori Hirokazu, Nishimura Ayako, Nakamura Kiminori, Kandori Akihiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Hemodynamic response to intestinal pH stimulation measured with spectroscopic video imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Physics & Engineering Express	6. 最初と最後の頁 017001 ~ 017001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/2057-1976/aca20a	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8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yuki Yokoi, Shuya Ohir, Haruto Matsuoka, Shota Takemi, Tokiyoshi Ayabe, Kiminori Nakamura
2. 発表標題 Selective Paneth cell granule secretion in response to pathogenic and commensal bacteria in enteric mucosal immunity
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松下 稜, 横井 友樹, 大平 修也, 松岡 温音, 竹見 祥大, 中村 公則
2. 発表標題 小腸上皮細胞機能の分子メカニズム解明に向けた高効率かつ簡便な遺伝子改変enteroidの作製法の確立
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村 公則
2. 発表標題 Paneth細胞・ディフェンシンによる自然免疫機能を介した腸内細菌叢制御
3. 学会等名 日本食品免疫学会第19回学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村 公則
2. 発表標題 Paneth細胞 ディフェンシンが担う腸内細菌叢の形成からみた母子の疾患リスク上昇メカニズムの理解
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大平修也, 横井友樹, 海堀唯人, 清水由宇, 綾部時芳, 中村公則
2. 発表標題 High-efficient genetic engineering of enteroids using mouse isolated crypts revealing the intestinal function
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横井友樹, 大平修也, 松岡温音, 海堀唯人, 篠崎竜我, 綾部時芳, 中村公則
2. 発表標題 腸管恒常性維持における病原菌と常在菌の選択的センシングによるPaneth細胞顆粒分泌調節
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 綾部 時芳, 横井友樹, 高桑暁子, 中村公則
2. 発表標題 食品が誘導するPaneth細胞 ディフェンシンによる免疫と共生
3. 学会等名 第18回日本食品免疫学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水由宇, 中村公則, 菊池摩仁, 鶴川重和, 中村幸志, 岡田恵美子, 今江章宏, 中川貴史, 山村凌大, 玉腰暁子, 綾部時芳
2. 発表標題 高齢者におけるPaneth細胞 -defensin分泌量の低さは加齢に伴う腸内細菌叢の遷移に関連する
3. 学会等名 第26回 腸内細菌学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------