

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19420

研究課題名（和文）腸管粘膜バリア機能の低下に働く腸内細菌の同定とその機序の解明

研究課題名（英文）Identification of gut microbiota involved in gut barrier dysfunction

研究代表者

田原 聡子（Tahara, Satoko）

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・講師

研究者番号：20360589

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）：腸内細菌叢と腸管バリア機能は相互に影響し合っていて恒常性を維持しているが、腸管バリア機能を維持する機序の全容は未解明である。抑制性免疫受容体Allergin-1は微生物センサーであるTLR2やTLR4シグナルを負に制御する働きを有しているが、Allergin-1遺伝子欠損マウスでは腸管粘膜バリア機能が野生型と比較して低下していることを見出した。本研究では、Allergin-1遺伝子欠損マウスではアンピシリン耐性でネオマイシン感受性の腸内細菌である *Bifidobacterium pseudolongum*が異常増殖しており、この腸内細菌により腸管バリア機能が低下数rことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管バリア機能の低下は、消化管疾患のみならず全身の疾患の発症に関わることから、腸管バリア機能低下に働く腸内細菌を明らかにし、この腸内細菌が腸管バリアの破綻に働く機序の一端を明らかにすることが出来れば、炎症性腸疾患、アレルギー、ガン、神経変性、老化などの病態の理解と治療法の開発に貢献することになり、科学のおよび社会的インパクトを有する創造性ある研究課題である。

研究成果の概要（英文）：Disruption of the intestinal barrier integrity is a leading cause of various gastrointestinal diseases, such as inflammatory bowel disease. An inhibitory immunoglobulin-like receptor, Allergin-1, is expressed on mast cells and dendritic cells and inhibits TLR-2 and TLR-4 signaling in these cells. Allergin-1-deficient mice exhibited more severe dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis than did wild-type mice. Allergin-1-deficient mice showed an enhanced intestinal permeability compared with WT mice even before DSS administration. The 16S rRNA gene sequencing analysis demonstrated that *Bifidobacterium pseudolongum* was the dominant bacterium in Allergin-1-deficient mice. These results demonstrated that Allergin-1 deficiency enhanced intestinal dysbiosis with expanded *B. pseudolongum*, which contributes to intestinal barrier dysfunction.

研究分野：免疫学

キーワード：腸管バリア 腸内細菌

## 1. 研究開始当初の背景

### 【腸管粘膜バリアの生理的意義】

腸管粘膜バリア機能の破綻は炎症性腸疾患など消化管疾患のみならず、自己免疫疾患、アレルギー疾患や感染など全身性免疫疾患にも関わる。バリア破綻の分子機構の一つに、腸内細菌叢の構成・多様性の異常 (dysbiosis) がある。しかし、腸管粘膜バリア破綻に働く腸内細菌の全容は明らかではない。

### 【抑制性免疫受容体Allergin-1について】

Allergin-1は、ヒトおよびマウス肥満細胞、好塩基球、樹状細胞など骨髄球系細胞に発現する抑制性免疫受容体である。Allergin-1は高親和性IgE受容体やTLRシグナルを抑制することで、IgE依存性アナフィラキシー、皮膚炎、喘息、食物アレルギーを抑制する (Nat Immunol, 2010; PLoS ONE, 2013; Int Immunol, 2016; Int Immunol, 2018; J Immunol, 2020; Int Immunol, 2020)。ヒトAllergin-1遺伝子 (MILR1) が位置する17番染色体 (17q23.3) の近傍には種々の疾患関連遺伝子 (アトピー, 17q23.3; SLE, 17q21-23; 多発性硬化症, 17q22-24; 喘息, 17q12-21; 乾癬, 17q25; 1型糖尿病, 17q24) が局在する。また、MILR1の一塩基多型 (SNP, rs6504230) はAllergin-1の発現亢進とアトピー抵抗性に相関する (J Hum Genet, 2014)。

### 【Allergin-1遺伝子欠損マウスには腸管粘膜バリアを破綻させる腸内細菌が局在する】

応募者は、定常状態のAllergin-1遺伝子欠損マウスの腸管粘膜バリア機能が野生型マウスと比較して有意に低下していることを見出した。また、Allergin-1遺伝子欠損マウスでは粘液を分泌して粘膜バリアに働く杯細胞およびIL-25産生細胞であるタフト細胞が有意に減少していた。これらの現象はネオマイシン投与で野生型マウスと同等レベルに回復したが、アンピシリン投与では回復しなかった。各抗生剤投与前後の野生型およびAllergin-1遺伝子欠損マウスの糞便中の腸内細菌叢を16SrRNAシーケンズ解析したところ、野生型では検出されないがAllergin-1遺伝子欠損マウスで検出される細菌群のうち、ネオマイシン投与後には消失しアンピシリン投与後では検出される細菌が複数得られた。そのうち、グラム陽性偏性嫌気性桿菌Aは、アンピシリン投与後のAllergin-1遺伝子欠損マウスにおいてリード数と血清FITC価が正に相関した ( $R = 0.8$ )。この結果は、Allergin-1遺伝子欠損マウスに腸管バリア機能の破綻に関わる腸内細菌が存在することを示している。

## 2. 研究の目的

腸管バリア機能の破綻に働く腸内細菌を同定することは、炎症性腸疾患のみならず全身性炎症疾患の病態の理解に貢献する。本研究では、Allergin-1遺伝子欠損マウスに存在して腸管バリアの破綻に働く腸内細菌を同定し、腸管バリア機能の低下に働く作用機序の一端を明らかにすることを目的に行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 腸管バリアの破綻に働く腸内細菌を同定する

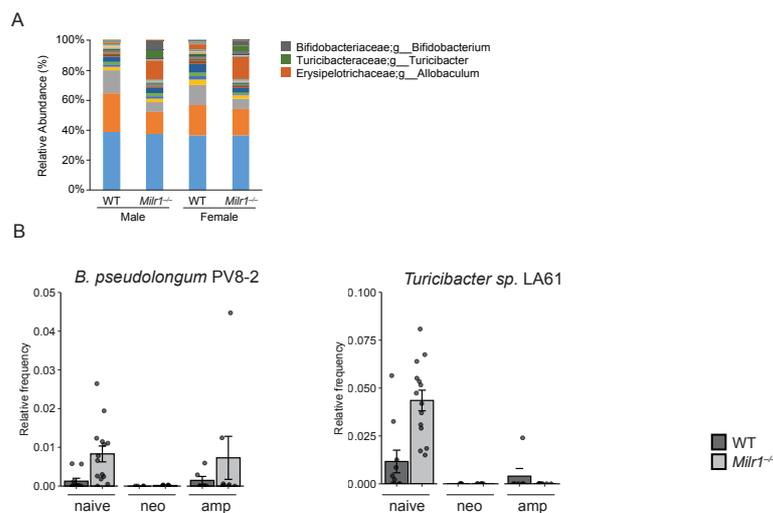
アンピシリン投与後のAllergin-1遺伝子欠損マウスにおいてリード数と血清FITC価が正に相関するグラム陽性偏性嫌気性桿菌Aはすでに単離に成功した。そこでこの細菌Aを無菌マウスまたは抗生剤を投与したマウスへ移植し、腸管バリア機能はFITC蛍光標識化高分子デキストラン (4 kDa) を経口投与して検証する。

### (2) 候補腸内細菌が腸管バリア機能の低下に働く作用機序の解明

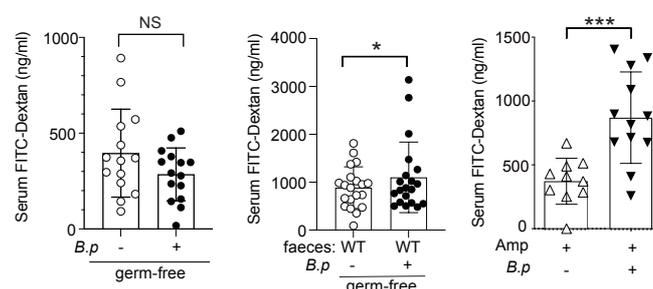
Allergin-1遺伝子欠損マウスでは杯細胞とタフト細胞が有意に減少し、ネオマイシン投与により回復することから、候補腸内細菌が杯細胞とタフト細胞に与える影響をin vitroで検証する。

## 4. 研究成果

- (1) Allergin-1の腸管免疫における役割を明らかにするため、デキストラン硫酸（DSS）誘導性腸炎モデルを検討したところ、Allergin-1遺伝子欠損マウスで体重減少が増悪し、生存率が顕著に減少する結果を得た。
- (2) Allergin-1遺伝子欠損マウスでは定常状態ですでに腸管が短縮しており、さらに腸管バリア機能の低下も観察された。
- (3) 一方、野生型とAllergin-1遺伝子欠損マウスの無菌マウスでは、腸管短縮や腸管バリアに有意な差は認められなかった。
- (4) 野生型とAllergin-1遺伝子欠損マウスを同一ケージで飼育すると、DSS腸炎の症状における有意差が消失し、さらに、Allergin-1遺伝子欠損マウスの糞便を無菌マウスに移植することで腸管バリア機能の低下が観察されたことから、腸管バリア機能の低下はAllergin-1遺伝子欠損マウスに存在する腸内細菌叢の異常によることを明らかにした。
- (5) 野生型とAllergin-1遺伝子欠損マウスをネオマイシンまたはアンピシリンを投与して腸管バリア機能を検証したところ、Allergin-1遺伝子欠損マウスをネオマイシンで治療すると腸管バリア機能が野生型マウス都道レベルまで回復するのに対し、アンピシリン投与では腸管バリア機能が回復しない結果を得た。このことから、Allergin-1遺伝子欠損マウスにはネオマイシン感受性でアンピシリン耐性の腸内細菌が存在し、この細菌により腸管バリア機能が低下することを明らかにした。
- (6) 野生型とAllergin-1遺伝子欠損マウスの糞便を16SrRNAシーケンス解析をしたところ、Allergin-1遺伝子欠損マウスのオスとメス共に野生型マウスとは異なる腸内細菌叢を示し、腸内細菌叢の多様性もAllergin-1遺伝子欠損マウスで低下していた。さらに、Allergin-1遺伝子欠損マウスに有意に多く存在し、アンピシリン耐性でネオマイシンで消失する最近として、*Bifidobacterium pseudolongum*が候補に挙がった。



- (7) *Bifidobacterium pseudolongum*を無菌マウスに移植しても腸管バリア機能に異常は見られないが、野生型マウスの糞便と混合して無菌マウスに移植したところ腸管バリア機能の低下が観察された。しかし、その影響は軽微であったため、野生型マウスにアンピシリンを投与した後に*Bifidobacterium pseudolongum*を移植すると、有意に腸管バリア機能の低下が観察された。このことから、*Bifidobacterium pseudolongum*は単独では腸管バリア機能の破綻に働かないが、アンピシリン耐性細菌と協調して腸管バリア機能の低下に関与することが示唆された。





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 0件）

1. 著者名 Lin Yu-Hsien, Tahara-Hanaoka Satoko, Obana Nozomu, Fukuda Shinji, Shibuya Akira	4. 巻 36
2. 論文標題 An inhibitory immunoreceptor Allergin-1 regulates the intestinal dysbiosis and barrier function in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 365 ~ 371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxae010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------	---------