

令和元年6月5日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05086

研究課題名(和文) 腸内細菌バランスの正常化に基づく炎症性腸疾患の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Molecular basis for the development of novel therapy against inflammatory bowel diseases based on the normalization of gut microbiota balance

研究代表者

川島 博人 (Kawashima, Hiroto)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：50260336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸上皮細胞特異的オートファジー関連遺伝子Atg7欠損マウス(cK0マウス)を作製し、デキストラン硫酸ナトリウム投与により大腸炎を誘導し野生型マウスとの比較を行ったところ、大腸組織内への腸内細菌の顕著な侵入を伴って、大腸炎が増悪化した。cK0マウスでは、特定の抗菌ペプチドが有意に発現低下するとともに、腸内細菌叢に顕著な変化が認められた。さらにcK0マウスでは大腸粘膜を保護し、炎症の防御に関わる粘液ムチンの分泌が顕著に低下することがわかった。以上の結果から、大腸上皮のオートファジーは正常な腸内細菌バランスの制御と抗菌ペプチドとムチンを介する炎症防御に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸上皮細胞のオートファジーは、抗菌ペプチドの発現、正常な腸内細菌叢の維持、およびムチン分泌を維持することで、大腸炎の防御に寄与することが示唆された。今後は、オートファジーの欠損によって産生低下する抗菌ペプチドが作用する菌種の同定やその作用機序の解明等により、腸内細菌バランスの正常化に基づく炎症性腸疾患治療法開発の分子基盤が確立することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that colonic epithelium-specific autophagy-related gene Atg7-conditional knockout (cK0) mice showed exacerbated dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis compared with wild-type mice in relation to massive infiltration of bacteria into the colon. In the cK0 mice, expression of specific antimicrobial peptides was significantly reduced, and marked changes in gut microbiota were observed. Furthermore, in cK0 mice, the secretion of mucins that are involved in the protection of colonic mucus and inflammation was significantly reduced. These results suggest that autophagy of the colonic epithelium contributes to the regulation of normal intestinal bacterial balance and defense against inflammation via antimicrobial peptide and mucin production.

研究分野：免疫学、生化学

キーワード：オートファジー 腸内細菌 抗菌ペプチド ムチン 大腸炎

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease; IBD)は消化管に原因不明の炎症をおこす難治性慢性疾患の総称で、クローン病と潰瘍性大腸炎に分類される。クローン病では大腸を含む消化管全域に潰瘍を伴った炎症性病変が単発あるいは多発し、潰瘍性大腸炎では主に大腸粘膜に潰瘍を生じる。いずれも緩解・増悪を繰り返す原因不明の慢性疾患で、厚生労働省より特定疾患に指定されている。これまでに欧米クローン病患者のゲノムワイド解析が行われ、オートファジー関連遺伝子 *ATG16L1* の一塩基多型がクローン病の発症感受性に関与することが示唆されている。

これまでに、小腸において *ATG16L1* を低発現する変異マウスにおいて小腸パネート細胞の抗菌ペプチド分泌顆粒の形成異常がおこることが報告されている。また小腸パネート細胞の *ATG16L1* を欠損する変異マウスを用いた研究により、小腸パネート細胞におけるオートファジーの形成(図1)が小胞体ストレス応答の消去に関わること、およびその破綻がクローン病への発症感受性の亢進に関与することが報告されている (*Nature* 503:272-276, 2013)。この研究では、*Villin* 発現部位で選択的にオートファジーを欠損する *Villin-Cre/ATG16L1^{flx/flx}* マウスを用いて解析が行われたが、*Villin* の大腸上皮における発現量は小腸上皮における発現量に比べて低いため (*Mol. Imaging Biol.* 13:284-292, 2011)、IBD の主要な病変部の大腸における病態解析は十分になされておらず、オートファジーの機能不全と大腸炎発症との関連には不明な点が多い。

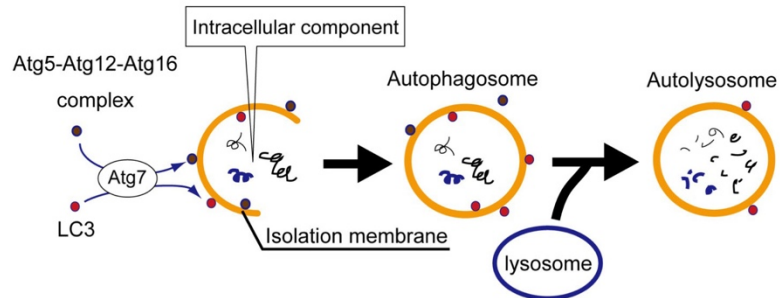


図1. オートファジーの形成

我々は、大腸上皮細胞に強く発現する硫酸基転移酵素 *GlcNAc6ST-2* の遺伝子発現調節領域の下流に *Cre* リコンビナーゼ遺伝子を挿入した組換え型 BAC (bacterial artificial chromosome)を用いて、*GlcNAc6ST-2-Cre* トランスジェニックマウス(*GlcNAc6ST-2-Cre* Tg マウス)を樹立した(Kawashima *et al.*, *J. Immunol.*, 2009)。この *GlcNAc6ST-2-Cre* Tg マウスにおいては、大腸上皮細胞特異的に *Cre* リコンビナーゼを発現することから、欠損させたい任意の遺伝子を *loxP* 配列で挟み込んだ *flx* マウスと掛け合わせるにより、大腸上皮細胞特異的に同遺伝子を欠損させ、その機能解析を行うことが可能である。我々は、この *GlcNAc6ST-2-Cre* Tg マウスをオートファジーの形成に必須な E1 様酵素 *Atg7* の *flx* マウス(*Atg7^{flx/flx}* マウス) と掛け合わせることで大腸上皮細胞特異的 *Atg7* 欠損マウス(cKO マウス)を樹立し、オートファジーの機能不全と IBD の主要な病変部の大腸における病態解析を行うための動物モデルを樹立した。

2. 研究の目的

本研究では、上記の大腸上皮細胞特異的にオートファジーを欠損する *Atg7* cKO マウスを用いて、大腸炎発症におけるオートファジーの関与を、腸内細菌叢の変化と抗菌ペプチドおよびムチンの産生に着目して解明し、IBD 新規治療法開発の分子基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスおよび *Atg7* cKO マウスにおける DSS 大腸炎症状の比較

大腸上皮細胞特異的に *Cre* リコンビナーゼを発現する *GlcNAc6ST-2-Cre* Tg マウスを *Atg7^{flx/flx}* マウスと掛け合わせ、大腸上皮細胞特異的 *Atg7* cKO マウスを作製した。はじめに、この cKO マウスで *Atg7* が欠損することを確認するために、*Atg7* mRNA、*Atg7* タンパク質、オートファジーにより選択的に分解を受けることの知られている p62 タンパク質およびユビキチン化タンパク質の発現変化を解析した。次に、野生型マウスおよび cKO マウスにおける DSS 誘発性大腸炎の症状を体重減少および下痢・血便の程度、組織損傷の程度をスコア化することにより評価した。また、抗生物質の経口投与による大腸炎の発症に及ぼす効果を検討した。

(2) DSS 大腸炎惹起による腸内細菌の大腸組織内への侵入の検出と野生型マウスと *Atg7* cKO マウスの腸内細菌叢の比較

DSS 大腸炎惹起後に大腸凍結切片を作製し、細菌の 16S rRNA をコードするゲノム領域にハイブリダイズする EUB338 プローブを用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、大腸炎の発症に伴う大腸組織内への腸内細菌の侵入を検出した。次に野生型マウスおよび cKO マウスの糞便から DNA を

抽出し、16S rRNA をコードする細菌ゲノム領域に対する菌種特異的プライマーを用いた PCR により、腸内細菌叢の変化を解析した。

(3) 野生型マウスと *Atg7* cKO マウスのムチンおよび抗菌ペプチド産生の比較

腸内細菌叢と大腸上皮は大腸上皮を構成する細胞の一種である杯細胞の分泌するムチンにより隔てられており、ムチンは大腸炎に対する防御に必須である。そこで野生型マウスと cKO マウスのムチン分泌の差異を ELISA により解析した。また、野生型マウスと cKO マウスの抗菌ペプチド産生の差異を定量的 PCR によって解析した。

(4) 抗菌ペプチド A の抗菌活性の解析

抗菌ペプチド A の組換え体を作製し、腸内細菌に対する抗菌活性の *in vitro* における検討を行った。また、抗菌ペプチド A は RNase 活性を持つ抗菌ペプチドであることから、その RNase 活性を欠損する変異体を作製し、抗菌活性との関連を解析した。

(5) 抗菌ペプチド A の DSS 誘発性大腸炎に及ぼす効果の検討

次に、組み換え型抗菌ペプチド A を DSS 誘発性大腸炎発症マウスに直腸内投与し、抗炎症効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスおよび *Atg7* cKO マウスにおける DSS 大腸炎症状の比較

はじめに、cKO マウス大腸において *Atg7* mRNA および *Atg7* タンパク質の減少、p62 タンパク質およびユビキチン化タンパク質の顕著な蓄積を確認した。DSS 誘発性大腸炎を惹起し、体重減少および下痢・血便の程度、組織損傷の程度をもとにスコア化したところ、cKO マウスでは、多数の白血球浸潤を伴い、大腸炎が顕著に増悪化することを見出した(図 2)。さらに、抗生物質の経口投与で、cKO マウスの大腸炎症状は有意に抑制されたことから、cKO の大腸炎感受性に腸内細菌が関与することが示唆された。

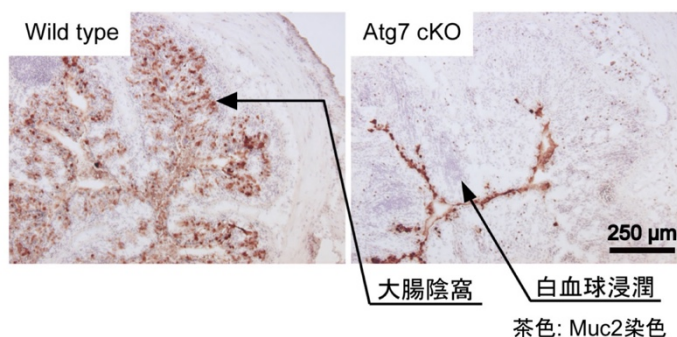


図2. *Atg7* cKOマウスにおけるDSS誘発性大腸炎の増悪化

(2) DSS 大腸炎惹起による腸内細菌の大腸組織内への侵入の検出と野生型マウスと *Atg7* cKO マウスの腸内細菌叢の比較

定常時および炎症初期における組織への腸内細菌の侵入を腸内細菌特異的蛍光プローブを用いた FISH 法により評価したところ、大腸炎の発症に先立って cKO マウス大腸への腸内細菌の侵入が強く起こることを見出した。また、16S rRNA の多型に基づく PCR により解析したところ、特定の腸内細菌が cKO マウスで増加することが分かった。

(3) 野生型マウスと *Atg7* cKO マウスのムチンおよび抗菌ペプチド産生の比較

EILSA により、野生型マウスに比べて cKO マウスでは、ムチン分泌が顕著に低下することが分かった。このことは、免疫組織染色によっても確認された。また、抗菌ペプチド産生の差異を定量的 PCR によって解析したところ、抗菌ペプチド A を含む特定の抗菌ペプチドが cKO マウスで顕著に産生低下することが分かった。

(4) 抗菌ペプチド A の抗菌活性の解析

抗菌ペプチド A の組換え体を用いて、その腸内細菌に対する濃度依存的な抗菌活性を見出した。また、抗菌ペプチド A の RNase 活性と抗菌活性の関連性を点変異体の作製により解析を試みたところ、RNase 活性が抗菌ペプチド A の抗菌活性の発現に関与することを見出した。

(5) 抗菌ペプチドの DSS 誘発性大腸炎に及ぼす効果の検討

抗菌ペプチド A を直腸内に投与することにより、DSS 誘発性大腸炎が増悪化することが分かった。この結果より、抗菌ペプチド A は、DSS 誘発性大腸炎抑制作用を持つ腸内細菌に対して抗菌活性を発揮する可能性が考えられた。今後、抗菌ペプチド A が作用する菌種の同定やその作用機序の解明等により、腸内細菌バランスの正常化に基づく炎症性腸疾患治療法開発の分子基盤が確立することが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Kikuchi N, Jiabin Y, Hirakawa J, Kawashima H. Forced Expression of CXCL10 Prevents Liver Metastasis of Colon Carcinoma Cells by the Recruitment of Natural Killer Cells.
Biol. Pharm. Bull., 42 巻、2019、pp. 57-65 査読有
DOI:10.1248/bpb.b18-00538
- ② Takaya A, Takeda H, Tashiro S, Kawashima H, Yamamoto T. Chaperone-mediated secretion switching from early to middle substrates in the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2.
J. Biol. Chem., 294 巻、2019、3783-3793 査読有
DOI: 10.1074/jbc.RA118.005072
- ③ Uchida T, Ueta H, Xu XD, Hirakawa J, Tahara K, Zhou S, Sawanobori Y, Simmons S, Kitazawa Y, Kawashima H, Matsuno K. Rapid immunosurveillance by recirculating lymphocytes in the rat intestine: critical role of unsulfated sialyl-Lewis X on high endothelial venules of the Peyer's patches.
Int. Immunol., 30 巻、2018、23-33 査読有
DOI: 10.1093/intimm/dxx072.
- ④ Low S, Hirakawa J, Hoshino H, Uchimura K, Kawashima H and Kobayashi M. Role of MAdCAM-1-expressing high endothelial venule-like vessels in colitis induced in mice lacking sulfotransferases catalyzing L-selectin ligand biosynthesis.
J. Histochem. Cytochem., 66 巻、2018、415-425 査読有
DOI: 10.1369/0022155417753363.
- ⑤ 平川城太朗、川島博人 新規抗糖鎖モノクローナル抗体を用いたリンパ球体内動態の解析
生化学 90 巻、2018、pp. 231-234 査読無
- ⑥ Low S, Sakai Y., Hoshino H, Hirokawa M, Kawashima H, Higuchi K, Imamura Y and Kobayashi M. High endothelial venule-like vessels and lymphocyte recruitment in diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma.
Pathology, 48 巻、2016、666-674 査読有
DOI: 10.1016/j.pathol.2016.08.002

[学会発表] (計 35 件)

- ① 菊池紀仁、叶家斌、平川城太朗、川島博人 ケモカイン CXCL10 の過剰発現による NK 細胞浸潤の誘導と大腸がん細胞の肝転移の抑制 日本薬学会第 139 年会 2019 年 3 月 21-23 日、千葉
- ② 熊偉、劉偉、松岡美紗、平川城太朗、川島博人 気管支喘息モデルにおける抗シリアルルイス X 糖鎖抗体の治療効果の検討 日本薬学会第 139 年会 2019 年 3 月 21-23 日、千葉
- ③ 山崎郁弥、泉水友洋、岩崎藍花、大八木真浩、神谷映里、平川城太朗、川島博人 抗糖鎖抗体 S1 を用いた中枢神経系における硫酸化糖鎖の発現解析 日本薬学会第 139 年会 2019 年 3 月 21-23 日、千葉
- ④ 山崎郁弥、泉水友洋、岩崎藍花、大八木真浩、神谷映里、平川城太朗、川島博人 抗糖鎖抗体 S1 を用いた中枢神経系における硫酸化糖鎖の発現解析 グローバルプロミネント研究基幹シンポジウム (若手研究者によるポスタープレゼンテーション)、2018 年 11 月 6 日、千葉
- ⑤ 熊偉、劉偉、松岡美紗、平川城太朗、川島博人 気管支喘息モデルにおける抗シリアルルイス X 糖鎖抗体の治療効果の検討 グローバルプロミネント研究基幹シンポジウム (若手研究者によるポスタープレゼンテーション)、2018 年 11 月 6 日、千葉
- ⑥ 関根成隆、竹添智宏、西田匠吾、平川城太朗、川島博人 HEV における硫酸化ガラクトースを含む糖鎖の発現解析 グローバルプロミネント研究基幹シンポジウム (若手研究者によるポスタープレゼンテーション)、2018 年 11 月 6 日、千葉
- ⑦ 菊池紀仁、葉家斌、平川城太朗、川島博人 ケモカイン CXCL10 による大腸がん細胞の肝転移の抑制 第 62 回日本薬学会関東支部大会、2018 年 9 月 15 日、東京
- ⑧ 熊偉、劉偉、松岡美紗、平川城太朗、川島博人 新規抗糖鎖モノクローナル抗体 F2 を用いた気管支喘息モデルの治療効果の検討 第 62 回日本薬学会関東支部大会、2018 年 9 月 15 日、東京
- ⑨ 山崎郁弥、泉水友洋、岩崎藍花、大八木真浩、神谷映里、平川城太朗、川島博人 抗糖鎖抗体 S1 を用いた中枢神経系における硫酸化糖鎖の発現解析 第 91 回日本生化学会大会、2018 年 9 月 24-26 日、京都

- ⑩ 山崎郁弥、泉水友洋、岩崎藍花、大八木真浩、神谷映里、平川城太朗、川島博人 抗糖鎖抗体 S1 を用いた中枢神経系における硫酸化糖鎖の発現解析 第 37 回 日本糖質学会年会、2018 年 8 月 28-30 日、仙台
- ⑪ 平川城太朗、川島博人 糖鎖分子を標的とした新規アレルギー疾患治療抗体の開発 第 19 回 Pharmaco-Hematology symposium 2018 年 8 月 10-11 日、東京
- ⑫ 中井克也 堀本義哉 荒川 敦 齊藤光江 川島博人 入村達郎 乳癌における高内皮細静脈の発現状況について 第 26 回日本乳癌学会、2018 年 5 月 16-18 日、京都
- ⑬ Hirakawa J and Kawashima H. Anti-sulfated-glycan monoclonal antibody S2 inhibits lymphocyte recruitment to nasal-associated lymphoid tissues and attenuates allergic rhinitis. AAI Annual Meeting (IMMUNOLOGY 2018), 2018.5.4-8, Austin, Texas.
- ⑭ 高屋明子、武田英香里、山本友子、川島博人 The SsaH-SsaE heterodimer acts as a class III chaperone in SPI2-Type 3 secretion system. 第 91 回日本細菌学会総会、2018 年 3 月 27-29 日、福岡
- ⑮ 佐藤裕之、松浦寛明、小林純子、榎谷内晶、成松久、Kay-Hooi Khoo、川島博人 フコシル化糖鎖 sialyl Lewis X の新規生合成経路の解析 日本薬学会第 138 年会、2018.3.25-28、金沢
- ⑯ 竹添智宏、松村龍志、関根成隆、平川城太朗、川島博人 マウス B 細胞におけるフコシル化糖鎖抗原シアリルルイス X の発現解析 日本薬学会第 138 年会、2018.3.25-28、金沢
- ⑰ 川島博人 リンパ球ホーミングにおける硫酸化糖鎖の機能解明 糖鎖免疫研究会 Glyco-immunology 2018、2018.2.19、東京
- ⑱ 佐藤裕之、松浦寛明、小林純子、榎谷内晶、成松久、Kay-Hooi Khoo、川島博人 マウス卵管における sialyl Lewis X 生合成経路の解析 グローバルプロミネント研究基幹シンポジウム (若手研究者によるポスタープレゼンテーション) 2017.11.7、千葉
- ⑲ 泉水友洋、岩崎藍花、大八木真浩、山崎郁弥、平川城太朗、川島博人 中枢神経系における硫酸化糖鎖の発現解析 グローバルプロミネント研究基幹シンポジウム (若手研究者によるポスタープレゼンテーション) 2017.11.7、千葉
- ⑳ 竹添智宏、松村龍志、関根成隆、平川城太朗、川島博人 マウス B 細胞におけるフコシル化糖鎖抗原シアリルルイス X の発現解析 グローバルプロミネント研究基幹シンポジウム (若手研究者によるポスタープレゼンテーション) 2017.11.7、千葉
- ㉑ 佐藤裕之、松浦寛明、小林純子、榎谷内晶、成松久、Kay-Hooi Khoo、川島博人 マウス卵管におけるフコシル化糖鎖 sialyl Lewis X の生合成経路の解析 第 61 回日本薬学会関東支部大会、2017.9.16、東京 優秀発表賞受賞
- ㉒ 竹添智宏、松村龍志、関根成隆、平川城太朗、川島博人 マウス B 細胞におけるフコシル化糖鎖抗原シアリルルイス X の発現解析 第 61 回日本薬学会関東支部大会、2017.9.16、東京
- ㉓ Matsumura R, Hirakawa J, Fukuda M, Imai Y and Kawashima H. Detection and functional characterization of sialyl Lewis X antigen in mice using novel anti-carbohydrate monoclonal antibodies. 24th International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO XXIV), 2017.8.27-9.1, Jeju Island, Korea.
- ㉔ Hirakawa J and Kawashima H. Inhibition of allergic rhinitis by anti-sulfated-glycan monoclonal antibodies. 24th International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO XXIV), 2017.8.27-9.1, Jeju Island, Korea.
- ㉕ Kimura N, Yamamoto T, Kawashima H, Takaya A. RNA chaperons, CspC and CspE regulate mRNAs induced in *Salmonella* surviving in macrophages after phagocytosis. 5th ASM Conference on Salmonella. 2017.8.29-9.1, Potsdam, Germany.
- ㉖ 平川城太朗、川島博人 抗糖鎖モノクローナル抗体によるアレルギー性免疫応答の抑制 第 36 回日本糖質学会年会、2017.7.19-21、旭川
- ㉗ 佐藤裕之、松浦寛明、小林純子、榎谷内晶、成松久、Kay-Hooi Khoo、川島博人 マウス卵管におけるフコシル化糖鎖 sialyl Lewis X の生合成経路の解析 第 36 回日本糖質学会年会、2017.7.19-21、旭川
- ㉘ 高屋明子、山崎禪、Christian Manne、川島博人、常世田好司、山本友子 サルモネラ菌体外成分による骨髄内 IgG プラズマ細胞障害 第 90 回日本細菌学会総会、2017.3.19-3.21、仙台
- ㉙ 川島博人 硫酸化糖鎖の機能阻害に基づくアレルギー応答の制御 糖鎖免疫研究会 Glyco-immunology 2017、2017.1.26、東京
- ㉚ 川島博人 抗糖鎖抗体の開発と利用 順天堂大学難病の診断と治療研究センター糖鎖創薬研究室開設記念シンポジウム「糖鎖創薬：臨床からの期待」、2016.11.17、東京
- ㉛ 川島博人 硫酸化糖鎖の機能阻害に基づくアレルギー応答の制御 第 60 回日本薬学会関東支部大会、2016.9.17、東京
- ㉜ 川島博人 リンパ球ホーミングにおける硫酸化糖鎖の役割 再生システムと疾患・癌エピゲノム公

開シンポジウム、2016.9.16

- ③③ Kawashima H. Detection and functional characterization of sialyl Lewis X antigen in mice using novel anti-carbohydrate monoclonal antibodies. 6th Charles Warren Workshop 2016, 2016.8.24-26, Sapporo
- ③④ Kawashima H. Role of sulfated glycans in lymphocyte homing to nasal-associated lymphoid tissues and allergic immune responses. Glycoscience Japan-The Netherlands Joint Seminar 2016 “Glycobiology in health and disease”, 2016.4.20, Leiden, the Netherlands
- ③⑤ 平川城太郎、今井康之、川島博人 リンパ球ホーミング阻害に基づくアレルギー性鼻炎抑制、日本薬学会第136年会、2016.3.27、横浜

〔図書〕（計 1 件）

- ① 川島博人 (分担執筆) 日本糖質科学コンソーシアム、未来を創るグライコサイエンス-我が国のロードマップ- 1-12 [グライコミメティクス] セレクチン阻害剤 2018、pp. 41-42

〔産業財産権〕

該当無し。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/bisei/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：平川城太郎

ローマ字氏名：Hirakawa Jotaro

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院薬学研究院

職名：助教

研究者番号（8 桁）：30609160

(2)研究協力者

氏名：小松雅明

ローマ字氏名：Komatsu Masaaki

氏名：片山高嶺

ローマ字氏名：Katayama Takane

氏名：小林基弘

ローマ字氏名：Kobayashi Motohiro

※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。