

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02929

研究課題名(和文) ムチンを介した宿主-腸内細菌の相利共生関係の解明とその応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mutualistic relationship between host and gut microbiota mediated by mucin and its application

研究代表者

森田 達也 (MORITA, Tatsuya)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：90332692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：腸上皮の杯細胞が産生・分泌するムチンは、高密度に糖鎖化された糖タンパクである粘液層を形成するバリアであると同時に、大腸では腸内細菌の発酵基質となる。一方で、腸内細菌の主要な発酵代謝産物である短鎖脂肪酸(SCFA)は、大腸上皮細胞のエネルギー基質となるほか宿主の免疫系・代謝系・神経系に作用することで全身の恒常性維持に寄与することが示唆されている。本課題では、ムチンおよびその構成糖が内因性発酵基質として腸内細菌に資化されること、その発酵産物であるSCFAを介して制御性T細胞を誘導することを明らかにした。また、新規プレバイオティクス候補としてのエイ体表ムチンの可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、ムチンおよびその構成糖が内因性発酵基質として腸内細菌に資化されること、その発酵産物であるSCFAを介して制御性T細胞を誘導することを明らかにした。このことは、宿主と腸内細菌が共生関係を築き、維持する機序の一端を明らかにするものであり、腸管の恒常性維持機構の基本的理解に寄与すると考えている。また、ムチンのプレバイオティクスとしての利用可能性について検証し、食事として摂取したエイ体表ムチンがSCFAを増加させること、*Akkermansia muciniphila*を特異的に増加させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mucin produced and secreted by goblet cells in the gut is a barrier that forms the mucus layer and also serves as a fermentation substrate for microbiota in the colon. On the other hand, short-chain fatty acids (SCFA), the major fermentation metabolite of microbiota, have been suggested to contribute to the immune, metabolic, and nervous systems of the host homeostasis, in addition to serving as an energy substrate for colonic epithelial cells. In this project, we have demonstrated that mucin and its constituent sugars are endogenous fermentation substrates for microbiota and induce regulatory T cells via SCFA. We also suggested the possibility of ray body surface mucin as a novel prebiotic candidate.

研究分野：栄養化学

キーワード：ムチン 腸内細菌叢 短鎖脂肪酸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腸上皮の杯細胞が産生・分泌するムチンは、高密度に糖鎖化された糖タンパクである粘液層を形成するバリアであると同時に、大腸では腸内細菌の発酵基質となる。一方で、腸内細菌の主要な発酵代謝産物である短鎖脂肪酸 (SCFA) は、大腸上皮細胞のエネルギー基質となるほか宿主の免疫系・代謝系・神経系に作用することで全身の恒常性維持に寄与することが示唆されている。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、「宿主はムチンを腸内細菌に供給することで増殖・代謝を促し、一方、腸内細菌は SCFA を供給することで宿主の恒常性維持に寄与する」というムチンを介した宿主-腸内細菌の相利共生関係の詳細および上部消化管で分泌され大腸へと流入するムチンの生理的意義を明らかにするとともに、新規プレバイオティクスとしてのムチンの有効性を検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1): ラット盲腸におけるムチンの発酵特性の解析

6週齢の Wistar 系雄ラットに AIN-76 組成に準じた対照飼料または PM を 0.6 または 1.2% 添加した飼料を 14 日間摂取させた (各 n=6)。2 および 12 日目に新鮮便を採取し、ムシナーゼ活性を測定した。解剖時、盲腸内容物の有機酸とムチン量を測定した。

#### (2): ラット盲腸におけるムチン構成糖の発酵特性の解析

6週齢の Wistar 系雄ラットに AIN-76 組成に準じた対照飼料または GlcNAc, Fuc, NeuAc をそれぞれ 1% 添加した飼料を 14 日間与えた。飼育終了時、盲腸内容物を有機酸測定および 16S ribosomal RNA 遺伝子解析による腸内細菌叢解析に供した。また、盲腸内容物からムチン画分を調製し、0-結合性糖鎖当量を測定した。

#### (3): ムチンおよびムチン構成糖の発酵が腸管免疫系に及ぼす影響の解析

離乳直後の 4 週齢の Wistar 系雄ラットに対照飼料、1% GlcNAc 飼料または 1.5% PM 添加飼料を 30 日間与えた。飼育終了時、盲腸組織を採取し、粘膜固有層リンパ球および mRNA の調製に供した。粘膜固有層リンパ球中の IgA plasma cell (IgA+, CD45RA-), regulatory T cell (Treg, CD3+, CD4+, Foxp3+) 数をフローサイトメトリーで測定した。また、IgA 関連、サイトカイン、ムチンおよびタイトジャンクション関連遺伝子の mRNA 発現量を測定した。盲腸内容物は有機酸、総菌数ならびに IgA の測定に供した。

### 4. 研究成果

#### (1): ラット盲腸におけるムチンの発酵特性

ラット盲腸へのムチン供給量が通常の 2 倍 (0.6% PM) または 3 倍 (1.2% PM) となる飼料を与えたところ、対照群と比べ 1.2% PM 群では盲腸内容物中 SCFA 量が 1.4 倍、酢酸および n-酪酸量がそれぞれ 1.8 倍にまで有意に増加した (Figure 1)。この時、新鮮便ムシナーゼ活性は飼育開始 2 日目で変わらず、12 日目で有意に上昇した。また、有意差は認められなかったが、PM 添加飼料では総菌数も増加した。一連の応答は PM 添加量に比例していた。また、群間の盲腸ムチン量には差がなく、添加したムチンはすべて資化されたと考えられた。以上の結果から、大腸内に流入したムチンは腸内細菌に資化され大腸上皮への SCFA 供給を行う endogenous fiber として機能し、n-酪酸産生を効果的に誘導することが示唆された。

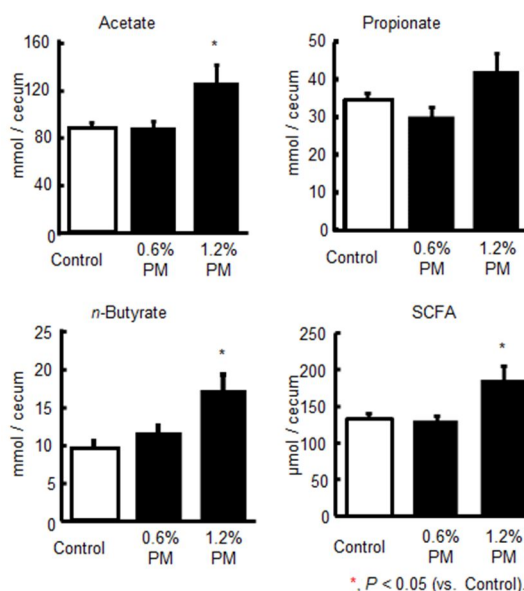
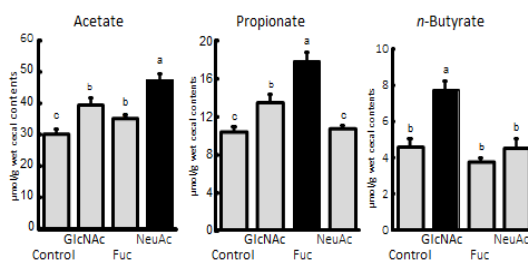


Figure 1 Amounts of short chain fatty acids in the cecum of rats fed a control diet or a diet containing 0.6 or 1.2% PM for 2 weeks. Data are mean  $\pm$  SE, n=6. \*,  $P < 0.05$  (vs. control)

#### (2): ラット盲腸におけるムチン構成糖の発酵特性

盲腸内容物重量は対照に比べ単糖群で高く、内容物 pH は単糖群で低かった。一方、0-結合性糖鎖当量に群間で差はなかった。SCFA パターンでは、酢酸は GlcNAc および NeuAc 群で、プロピオン酸は Fuc および GlcNAc 群で対照群に比べ有意に増加したのに対し、n-酪酸は GlcNAc 群での

み対照群に比べ有意に増加した (Figure 2)。相対占有率が上位の 20 菌種を対象に菌叢を解析した結果, Fuc 群ではプロピオン酸産生菌である *Blautia* 属が, NeuAc 群では酢酸産生菌である *Hungatella hathewayi* と酢酸資化菌 (酢酸 n-酪酸) である *Roseburia faecis* が対照群に比べ有意に増加した (Table 1)。一方, GlcNAc 群では, *Roseburia faecis* に加え, n-酪酸産生菌である *Eubacterium tortuosum*, *Allobaculum stercoricanis* も対照群に比べ有意に増加したほか, 酢酸産生菌である *Anaerobium acetethylicum* が対照群に比べ有意に増加した (Table 1)。また, 種多様性は Fuc および NeuAc 群では対照群に比べ低下したが, GlcNAc 群では対照群と同様であった。PM 摂取による盲腸 n-酪酸濃度の上昇は GlcNAc の発酵特性に起因すると考えられた。



	Control	GlcNAc	Fuc	NeuAc	P value
Tissue weight, g	0.6	0.6	0.7	0.6	0.35
Contents, g	2.6 <sup>b</sup>	3.0 <sup>ab</sup>	3.2 <sup>a</sup>	3.2 <sup>a</sup>	< 0.05
pH	7.9 <sup>a</sup>	7.8 <sup>b</sup>	7.7 <sup>b</sup>	7.8 <sup>ab</sup>	< 0.01
Mucin, mmol / cecum	1.3	1.3	1.3	1.6	0.56
Total bacteria, 10 <sup>13</sup> copies / cecum	2.9 <sup>b</sup>	7.7 <sup>a</sup>	4.1 <sup>b</sup>	7.1 <sup>a</sup>	< 0.001

Labeled means in a row without a common superscript letter differ,  $P < 0.05$ .

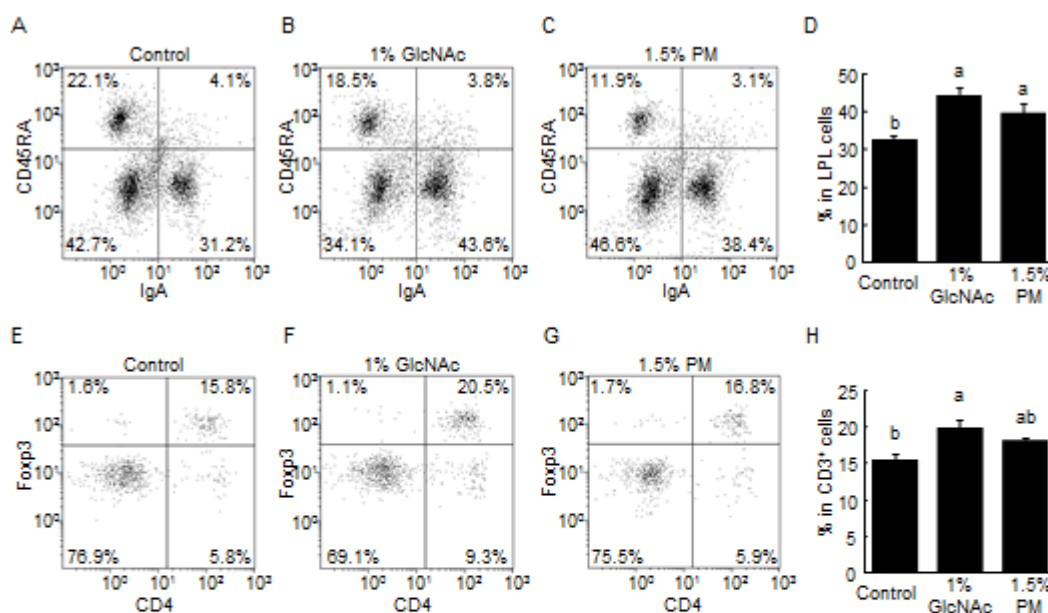
Figure 2 Amounts of short chain fatty acids and cecal variables in the cecum of rats fed a control diet or a diet containing 1% GlcNAc, Fuc or NeuAc for 2 weeks. Data are mean  $\pm$  SE, n=6. Labeled means in a row without a common superscript letter differ,  $P < 0.05$ .

Family	Species	Control	GlcNAc	Fuc	NeuAc	ANOVA P
Bacteroidaceae	<i>Bacteroides acidifaciens</i>	3.6	2.7	3.7	4.4	0.61
	<i>Bacteroides sartorii</i>	3.2	3.2	1.6	2.7	0.28
Odoribacteraceae	<i>Odoribacter splanchnicus</i>	0.7	0.9	0.8	0.7	0.94
Porphyromonadaceae	<i>Barnesiella viscericola</i>	0.6	1.0*	0.6	0.7	< 0.05
	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2.0	3.3	2.7	2.0	0.08
	<i>Parabacteroides goldsteinii</i>	4.3	2.5	2.7	6.5	< 0.05
	<i>Porphyromonas pasteri</i>	1.0	1.0	1.5	0.9	0.32
	<i>Porphyromonas pogonae</i>	6.6	11.1	10.2	8.0	0.22
Clostridiaceae	<i>Clostridium disporicum</i>	0.0	0.0	0.0	0.7	0.39
	<i>Hungatella hathewayi</i>	3.7	8.2	4.4	22.3*	< 0.001
Erysipelotrichaceae	<i>Allobaculum stercoricanis</i>	0.6	2.8*	0.8	0.4	< 0.001
	<i>Eubacterium tortuosum</i>	0.3	4.5*	0.6	0.6	< 0.001
Lachnospiraceae	<i>Acetatifactor muris</i>	6.9	1.5	1.2	1.6	< 0.001
	<i>Anaerobium acetethylicum</i>	0.2	1.5*	0.1	0.1	< 0.001
	<i>Anaerocolumnaxylanovorans</i>	1.6	0.7	0.0	0.2	< 0.001
	<i>Blautia faecis</i>	5.2	8.7	12.8	8.5	0.2
	<i>Blautia glucerasea</i>	0.6	1.0	1.8*	0.4	< 0.05
	<i>Blautia producta</i>	1.1	2.1	1.7	0.9	0.73
	<i>Clostridium clostridioforme</i>	1.9	1.2	1.2	0.4	< 0.001
	<i>Clostridium saccharolyticum</i>	1.7	0.9	0.7	0.5	< 0.001
	<i>Roseburia faecis</i>	1.3	2.8*	1.1	3.6*	< 0.001
	<i>Roseburia intestinalis</i>	1.2	1.9	0.9	0.7	< 0.01
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus animalis</i>	1.3	1.4	1.6	0.7	0.54
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	0.6	1.0	1.2	0.6	0.64
Ruminococcaceae	<i>Clostridium leptum</i>	1.4	0.6	0.7	0.4	< 0.001
	<i>Gemmiger formicilis</i>	0.3	0.2	1.0	0.3	< 0.05
	<i>Ruminococcus bromii</i>	6.8	5.4	5.8	4.2	0.56
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia fergusonii</i>	1.1	0.5	0.2	0.1	< 0.001
Akkermansiaceae	<i>Akkermansia muciniphila</i>	14.7	1.4	18.2	11.2	< 0.001
Not assigned	<i>Intestinimonas butyriciproducens</i>	2.7	1.1	1.2	0.9	< 0.001

Table 1 Relative abundance of cecal microbiota at the species level in male Wistar rats fed a control diet or diet either containing GlcNAc, fucose, or NeuAc at 10 g/kg for 2 weeks.

(3) ムチンおよびムチン構成糖の発酵が腸管免疫系に及ぼす影響

盲腸内容物重量、内容物 pH は群間で差はなかった。すべての SCFA 濃度が、GlcNAc および PM 群では対照群に比べ上昇した。一方、*n*-酪酸濃度の上昇は GlcNAc および PM 群でいずれも有意であった。盲腸内容物中の IgA 濃度に群間で差はなかったが、GlcNAc および PM の摂取は、盲腸で IgA plasma cell を有意に増加させた (Figure 3)。また、Treg は GlcNAc および PM で対照群に比べ高値を示したが、1%GlcNAc 群でのみ有意であった。このとき、GlcNAc および PM 群では、対照に比べ IgA の産生または分泌に關与する *April* および *pIgR*、炎症性サイトカインである *Tnfa*、*Ifng* 発現量が低下していた。一方、抗炎症性サイトカインである *Il10* や *Tgfb* やムチンおよびタイトジャンクション関連遺伝子発現量に群間で差はなかった。



**Figure 3** Populations of IgA<sup>+</sup> plasma cells (A - D) and regulatory T cells (E - H) in the cecal lamina propria in male Wistar rats fed a control diet or a diet containing 10 g of GlcNAc or 15 g of PM/kg for 29 d. Representative flow cytometry plots of IgA<sup>+</sup> plasma cells (A - C), and regulatory T cells (E - G) are shown. (D, H) Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 6$ . Labeled means without a common letter differ,  $P < 0.05$  (D, H). PM, porcine stomach mucin.

以上の結果より、PM 摂取による盲腸 *n*-酪酸濃度の上昇は GlcNAc の発酵特性に起因すると考えられた。この結果は、PM 糖鎖の構成比に占める GlcNAc は 36%と最も高く、同様に代謝されると考えられる GalNAc を含めたアミノ糖の比率は 63%に達することと合致していた。また、GlcNAc や PM の摂取が IgA plasma cell および Treg を誘導し、かつ炎症性サイトカイン発現量を低下させたことから、ムチンが発酵を介して腸管免疫系の発達および恒常性の維持に寄与している可能性が高いと考えている。一方、本試験から明らかになったムチン構成糖の特異的な SCFA 誘導能は、個々の SCFA の生理作用を検証するための強力なツールとなりえると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2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 SEKI Manami, MIWA Akiho, OHSAKA Fumina, KARATSU Yugo, TSURUTA Takeshi, HINO Shingo, MORITA Tatsuya, SONOYAMA Kei	4. 巻 41
2. 論文標題 Local free fatty acids trigger the expression of lipopolysaccharide-binding protein in murine white adipose tissue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 54 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12938/bmfh.2021-061	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Miyata Takaaki, Mizushima Takayasu, Miyamoto Nobuyuki, Yamada Takahiro, Hase Koji, Fukushima Michihiro, Nishimura Naomichi, Hino Shingo, Morita Tatsuya	4. 巻 86
2. 論文標題 Skate-skin mucin, rich in sulfated sugars and threonine, promotes proliferation of <i>Akkermansia muciniphila</i> in feeding tests in rats and in vitro fermentation using human feces	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 397 ~ 406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac003	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 GOTO Tomoya, UMEDA Tomoki, HINO Shingo, MORITA Tatsuya, NISHIMURA Naomichi	4. 巻 68
2. 論文標題 Oral Intake of Slowly Digestible $\beta$ -Glucan Such as Resistant Maltodextrin Leads to Increased Secretion of Glucagon-Like Peptide-2 in Rats and Helps Thicken Their Ileal Mucosae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 104 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.68.104	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Hino Shingo, Mizushima Takayasu, Kaneko Katsunori, Kawai Erika, Kondo Takashi, Genda Tomomi, Yamada Takahiro, Hase Koji, Nishimura Naomichi, Morita Tatsuya	4. 巻 150
2. 論文標題 Mucin-Derived O-Glycans Act as Endogenous Fiber and Sustain Mucosal Immune Homeostasis via Short-Chain Fatty Acid Production in Rat Cecum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 2656 ~ 2665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jn/nxaa097	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 -

1. 著者名 HINO Shingo, NISHIMURA Naomichi, MORITA Tatsuya	4. 巻 66
2. 論文標題 Hairy Region Concentrate of Pectin Strongly Stimulates Mucin Secretion in HT29-MTX Cells, but to a Lesser Degree in Rat Small Intestine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 331 ~ 338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.66.331	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
研究 分 担 者	日野 真吾  (HINO Shingo)  (70547025)	静岡大学・農学部・准教授    (13801)	

#### 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
---------	---------