

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15986

研究課題名（和文）炎症性腸疾患の病態形成におけるムチン糖鎖硫酸化の意義

研究課題名（英文）Analysis of sulfated glycans on mucins in intestinal inflammation

研究代表者

安保 博仁（Abo, Hirohito）

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：80868050

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、Muc2糖鎖硫酸化修飾の腸炎における役割を明らかにするために、GlcNAc6ST-2ノックアウトマウスに腸炎モデルを適用した。Muc2ムチン糖鎖の硫酸化修飾はムチン層の機能維持に必須であり、バリア機能を強化することで腸炎を抑制していることが明らかとなった。さらに、GlcNAc6ST-2欠損マウスでは大きく腸内細菌叢が変化することから、ムチン糖鎖の硫酸化は腸内細菌叢維持に必須の翻訳後修飾であることも初めて示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまでのMuc2ノックアウトマウスやMuc2糖鎖のノックアウトマウスを用いた研究とは異なり、Muc2糖鎖の硫酸化に着目し、糖鎖全体ではなく特徴的な糖鎖構造、すなわち硫酸化修飾が腸炎病態を制御するという新しい知見を提供した点に学術的意義がある。本研究の成果により、「腸管上皮細胞のバリア機能」および「腸内細菌叢の制御」において硫酸化糖鎖が担う基礎的な知見が得られたことから、将来的には本研究の知見に基づく糖鎖を用いた炎症性腸疾患の治療法への発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, to elucidate the role of sulfation of Muc2 glycan in colitis, we applied an experimental colitis model to GlcNAc6ST-2 deficient mice. As a result, the sulfation modification of Muc2 glycans is essential for maintaining the functionality of the mucin layer, and it suppresses colitis by enhancing barrier function. Furthermore, in GlcNAc6ST-2 deficient mice, there was a significant change in the intestinal microbiota, indicating that the sulfation of mucin glycans is a post-translational modification which is essential for maintaining the intestinal microbiota.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：硫酸化糖鎖 腸内細菌叢 炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は日本を含む先進国で患者数が増加している疾患で、腸管において過剰な炎症が持続する難治性の慢性疾患である。遺伝的要因、環境的要因が複雑に組み合わさって発症すると考えられており、その原因は明らかになっていない。近年の研究では、サイトカインや腸内細菌をターゲットとして治療法の開発が進められているが、決定的な治療ターゲットは未だ見つかっておらず、さらなる研究が求められている。

Muc2 ムチンは大腸および小腸において、腸管上皮細胞、特に杯細胞から分泌され粘液層を形成する。そのノックアウトマウス(*Muc2*^{-/-})は腸炎を自然発症すること(1)、ヒトサンプルを用いた解析から炎症性腸疾患患者の腸では、ムチン粘液層の減少により腸内細菌が粘膜固有層へと侵入しやすくなることが報告されている(2)。つまり、Muc2 は腸管上皮のバリア機能に大きく寄与していると言える。また Muc2 は多数の O-型糖鎖修飾を受けるが、これら O-型糖鎖のノックアウトマウス(*C3GnT*^{-/-}, *C1GalT1*^{-/-})は DSS(dextran sulfate sodium)腸炎の悪化、アズキシメタン/DSS 大腸癌の亢進が報告されている(3, 4)。つまり、O-型糖鎖修飾の欠損は腸炎病態と深く関わることを示されており、Muc2 の糖鎖修飾を理解することは炎症性腸疾患の病態を解析する上で非常に重要である。

申請者の研究室において、硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 ノックアウトマウスを作製し、腸管における Muc2 糖鎖の硫酸化修飾について解析したところ、O-型糖鎖の GlcNAc 残基の硫酸化が欠損することを見出した(5)。本論文は、腸管における Muc2 糖鎖の硫酸化を担う硫酸基転移酵素を初めて同定した重要な論文であった。しかし、Muc2 糖鎖の硫酸化の腸管における生理的意義は不明であり、腸炎病態への関与も明らかになっていない。そこで本研究では、「Muc2 糖鎖の硫酸化は炎症性腸疾患の病態にどのように寄与するか」を学術的な問いとして掲げた。

2. 研究の目的

本研究では、1 の学術的な問いを明らかにするために、GlcNAc6ST-2 ノックアウトマウスに腸炎モデルを適用し、Muc2 糖鎖硫酸化修飾の腸炎病態への寄与を明らかにする。また、宿主の免疫細胞・腸管上皮細胞に加え、腸内細菌叢の変化を解析することで、Muc2 糖鎖の硫酸化がどのように腸炎病態に関与するかの詳細なメカニズムを解明することが目的である。

本研究は、これまでの Muc2 ノックアウトマウス(*Muc2*^{-/-})や Muc2 糖鎖のノックアウトマウス(*C3GnT*^{-/-}, *C1GalT1*^{-/-})を用いた研究とは異なり、Muc2 糖鎖の硫酸化に着目し、硫酸化糖鎖が腸炎病態を制御するという新しい知見を提供する点に独自性がある。したがって、本研究は GlcNAc6ST-2 ノックアウトマウスを樹立し、その糖鎖解析を行ってきた経験を持つ申請者らのみが行うことができる研究課題である。本研究が達成されれば、糖鎖を用いた「腸管上皮細胞のバリア機能の強化」および「腸内細菌叢の制御」へ向けた基礎的な知見が得られ、将来的には本研究の知見に基づく糖鎖を用いた炎症性腸疾患の治療法への発展が期待される創造的な研究である。

3. 研究の方法

(1) マウス腸炎モデルを用いた解析

GlcNAc6ST-2 ノックアウトマウスに腸管上皮細胞の損傷依存的な腸炎モデルである DSS 腸炎を適用することで、Muc2 糖鎖の硫酸化が腸炎病態を悪化させるか、あるいは抑制するのかを明らかにする。腸炎誘導後、回収した大腸組織の qPCR 解析により炎症性サイトカインの発現を解析する。また、大腸組織切片を Muc2 抗体および腸内細菌を 16S rRNA をコードするゲノム領域にハイブリダイズする EUB338 プローブで染色することにより、Muc2 糖鎖の硫酸化が腸内細菌の侵入にどのような影響を与えるかを検討する。

(2) Muc2 糖鎖の硫酸化によって引き起こされる腸内細菌叢の変化と腸炎病態への影響の解析

腸管上皮細胞は、抗菌ペプチドを発現することで腸内細菌叢を正常に保つ役割を担う(6)。逆に、腸内細菌叢は多くの遺伝子発現を制御し、炎症性腸疾患の病態に寄与することが示されている(7)。つまり、両者が相互作用して腸内の恒常性を維持していると言える。過去の研究によって、Muc2 のノックアウトマウスでは腸内細菌叢が変化することが報告されており、その硫酸化糖鎖も腸内細菌叢に影響を与える可能性が考えられる。そこで、GlcNAc6ST-2 ノックアウトマ

ウスの腸内細菌叢を次世代シーケンサーで解析し野生型(WT)マウスと比較することで、Muc2 糖鎖の硫酸化が腸内細菌叢を変化させるのかを明らかにする。

4. 研究成果

GlcNAc6ST-2 ノックアウトマウスに DSS 腸炎を誘導したところ、WT マウスに比べて有意な体重減少が観察された (Fig. 1A)。また、腸炎症状を表す DAI スコアは GlcNAc6ST-2 ノックアウトマウスにおいて有意に高い値を示し (Fig. 1B)、大腸の長さも短かった (Fig. 1C and 1D)。さらに、腸炎誘導後 9 日目の大腸から組織切片を作製し HE 染色を行ったところ、GlcNAc6ST-2 ノックアウトマウスにおいて、上皮細胞の損傷と免疫細胞の浸潤が顕著にみられた (Fig. 1E)。以上の結果から、GlcNAc6ST-2 が担う Muc2 糖鎖の硫酸化が腸炎病態に抑制的に働くことが明らかとなった。

続いて、GlcNAc6ST2 ノックアウトマウスの大腸組織を、Muc2 抗体およびバクテリアを染色する EUB プローブで染色したところ、ノックアウトマウスではムチン層が薄く、腸内細菌と上皮細胞の距離が近接し、そのバリア機能が低下していることが示唆された (Fig. 2A and 2B)。

最後に、WT マウスと GlcNAc6ST-2 KO マウスの腸内細菌叢を 16s rRNA 解析により比較した。結果、その構成は大きく異なることが示された (Fig. 3A and 3B)。

以上の結果から、Muc2 ムチン糖鎖の硫酸化修飾はムチン層の機能維持に必須であり、バリア機能を強化することで腸炎を抑制していることが明らかとなった。さらに、GlcNAc6ST-2 欠損マウスでは大きく腸内細菌叢が変化することから、ムチン糖鎖の硫酸化は腸内細菌叢維持に必須の翻訳後修飾であることも初めて示された。今後は、変化した腸内細菌叢の病態への関与や、ムチン硫酸化糖鎖と細菌の相互作用を解析していく予定である。

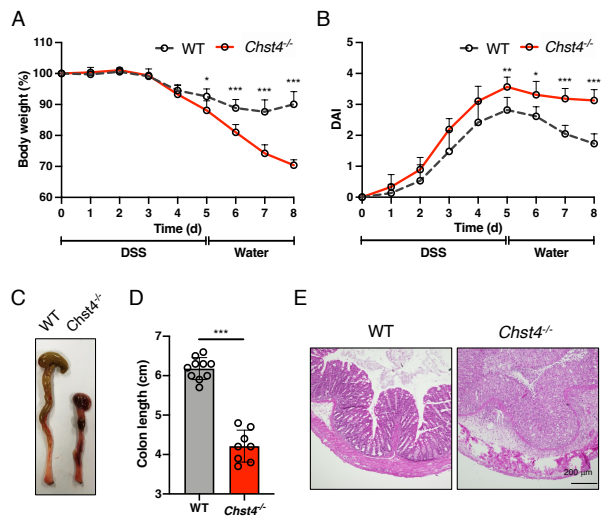


Figure 1. GlcNAc6ST-2 KO マウスは DSS 腸炎の感受性が增加する

(A)体重変化 (B)DAI スコア (C)大腸写真 (D)台帳の長さ (E)大腸組織の HE 染色

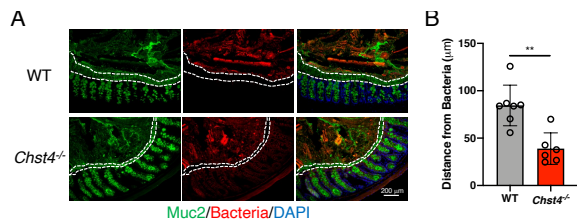


Figure 2. GlcNAc6ST-2 KO マウスはムチン層が薄く腸内細菌と上皮細胞が近接している

(A)大腸組織の免疫蛍光染色 (B)細菌と上皮細胞間の距離

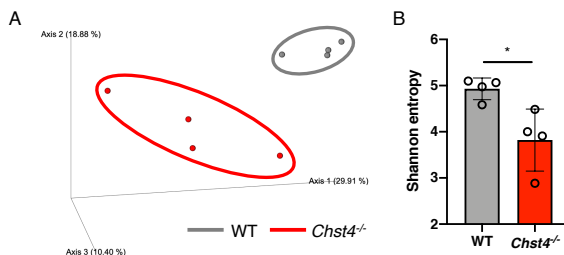


Figure 3. GlcNAc6ST-2 KO マウスは腸内細菌叢が変化する

(A)腸内細菌叢の PCoA 解析 (B)Shannon entropy

1. Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*. 2006;131(1):117-29.
2. Johansson ME, Gustafsson JK, Holmen-Larsson J, Jabbar KS, Xia L, Xu H, et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014;63(2):281-91.

3. An G, Wei B, Xia B, McDaniel JM, Ju T, Cummings RD, et al. Increased susceptibility to colitis and colorectal tumors in mice lacking core 3-derived O-glycans. *J Exp Med.* 2007;204(6):1417-29.
4. Fu J, Wei B, Wen T, Johansson ME, Liu X, Bradford E, et al. Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(4):1657-66.
5. Tobisawa Y, Imai Y, Fukuda M, and Kawashima H. Sulfation of colonic mucins by N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-2 and its protective function in experimental colitis in mice. *J Biol Chem.* 2010;285(9):6750-60.
6. Peterson LW, and Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(3):141-53.
7. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, and Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *Lancet.* 2017;389(10080):1741-55.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Yamasaki Fumiya, Umezawa Fumiko, Sensui Tomohiro, Anzo Masashi, Abo Hirohito, Kuo Chu-Wei, Khoo Kay-Hooi, Kato Koichi, Yagi Hirokazu, Kawashima Hiroto	4. 巻 579
2. 論文標題 Establishment of a novel monoclonal antibody against truncated glycoforms of α -dystroglycan lacking matriglycans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 8~14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.09.043	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 Abo Hirohito, Kume Masahiko, Pecori Federico, Miura Taichi, Matsumoto Naoki, Nishihara Shoko, Yamamoto Kazuo	4. 巻 17
2. 論文標題 Disaccharide-tag for highly sensitive identification of O-GlcNAc-modified proteins in mammalian cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0267804
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0267804	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 Arai Takahiro, Kokubo Tomomi, Tang Ruiheng, Abo Hirohito, Terui Ayu, Hirakawa Jotaro, Akita Hidetaka, Kawashima Hiroto, Hisaka Akihiro, Hatakeyama Hiroto	4. 巻 10
2. 論文標題 Tumor-associated neutrophils and macrophages exacerbate anti-drug IgG-mediated anaphylactic reaction against an immune checkpoint inhibitor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e005657 ~ e005657
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jitc-2022-005657	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 Sultana Mst. Farzana, Abo Hirohito, Kawashima Hiroto	4. 巻 13
2. 論文標題 Human and mouse angiogenins: Emerging insights and potential opportunities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1022945
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.1022945	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 Sultana Mst. Farzana, Suzuki Maki, Yamasaki Fumiya, Kubota Wataru, Takahashi Kohta, Abo Hirohito, Kawashima Hiroto	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification of Crucial Amino Acid Residues for Antimicrobial Activity of Angiogenin 4 and Its Modulation of Gut Microbiota in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 900948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.900948	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 Harusato Akihito, Seo Wooseok, Abo Hirohito, Nakanishi Yoshitaka, Nishikawa Hiroyoshi, Itoh Yoshito	4. 巻 26
2. 論文標題 Impact of particulate microplastics generated from polyethylene terephthalate on gut pathology and immune microenvironments	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106474 ~ 106474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106474	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 Liu Wenxin, Xiong Wei, Liu Wei, Wei Zihong, Abo Hirohito, Kawashima Hiroto	4. 巻 10
2. 論文標題 Therapeutic Effects of an Anti-Sialyl Lewis x Antibody in a Murine Model of Acute Lung Injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 1089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2023.0001	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安保博仁
2. 発表標題 Sulfated Glycan-Mediated Regulation of Intestinal Inflammation and tumorigenesis
3. 学会等名 日本薬学会 関東支部会（招待講演）
4. 発表年 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
---------	---------