

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間：2021～2025
課題番号：21H05043
研究課題名：糖鎖による腸管恒常性維持機構の解析
研究代表者氏名（ローマ字）：竹田 潔（TAKEDA Kiyoshi）
所属研究機関・部局・職：大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20309446

研究の概要：

腸管腔内に分泌され腸管恒常性維持に関わるタンパク質(Lydp8, Muc2)は、糖鎖付加の極めて多いタンパク質である。しかし、糖鎖修飾の腸管恒常性維持における意義は、まったく理解されていない。本研究では、腸管上皮に特異的に発現する糖転移酵素、B3galt5, Chst4, St6galnac6/1 を主な標的にして、本酵素群の腸管での機能を解析し、本酵素により修飾される糖鎖構造の腸管恒常性維持における機能を解明する。

研究分野：腸管免疫学

キーワード：腸管上皮、腸内細菌、粘液、糖鎖

1．研究開始当初の背景

腸管腔内に分泌され腸管恒常性維持に関わるタンパク質(Lydp8, Muc2)は、糖鎖付加の極めて多いタンパク質である。しかし、糖鎖修飾の腸管恒常性維持における意義は、まったく理解されていない。糖鎖がタンパク質の高次機能に極めて重要であることと相まって、糖転移酵素の遺伝的異常が多彩な疾患に関わることがよく知られている。しかし、糖転移酵素の腸管恒常性維持における機能はほとんど理解されていない。さらには、どのような糖鎖構造が、腸管恒常性維持に関わるかも全く理解されていない。

2．研究の目的

糖鎖修飾は、タンパク質の高次機能に必須の機構であるが、Muc2 や Lydp8 などのように分子の7割以上が糖鎖から成り立つ糖鎖修飾を強く受けた糖タンパク質の場合には、糖鎖自身が生理機能（特に、腸管腔という体外での特有の未知の機能）を有することが考えられるが、これまで全く理解されていない。また、我々の予備実験により、腸管上皮に特異的に発現する糖転移酵素を複数同定している。このことから、腸管に特有の糖鎖構造が存在し、特有の機能を有することが考えられる。本研究では、腸管上皮のバリア機構の視点から、糖鎖修飾の腸管恒常性維持機構における役割を明らかにすることを目的とする。

3．研究の方法

糖鎖修飾の腸管恒常性維持における役割を明らかにするため、腸管上皮に特異的に発現する B3galt5, Chst4, St6galnac6/1 を主な標的にして、本酵素群の腸管での機能とともに、本酵素により修飾される糖鎖構造の機能を下記の観点から解析する。

- (1) 各遺伝子欠損マウスの腸管炎症に対する感受性の解析
- (2) 各遺伝子欠損マウスの腸内細菌叢、粘膜免疫システムの解析
- (3) 各遺伝子欠損マウスの腸管組織の糖鎖構造の解析
- (4) 標的糖鎖の腸管恒常性維持機能の解析
- (5) ヒト IBD 患者で認められる糖転移酵素遺伝子 missense mutation の意義の解析
- (6) ヒト IBD 患者の腸管組織における糖鎖構造の解析：

4．これまでの成果

(1) B3galt5、St6galnac6欠損マウスにおける大腸ムチンの糖鎖構造変化

野生型マウスにて大腸にジシアルルイスA(dSLe^A)糖鎖が発現しているか、さらにB3galt5、St6galnac6欠損マウス(KO)マウスにてdSLe^A糖鎖の発現が減少しているかを、dSLe^A抗体を用いた大腸組織切片の免疫染色により検討した。その結果、野生型マウスの大腸では、腸管分泌型ムチンであるMuc2の発現に一致して、dSLe^A糖鎖が発現しているのに対し、各KOマウスにおいて、そのdSLe^A糖鎖の発現がほとんど消失していた。大腸粘膜表面から得られたムチンO型糖鎖のLC/タンデムMS解析において、St6galnac6 KOマウスでは、ジシアルルイスA糖鎖から脱シアルル化した糖鎖構造が検出され、B3galt5 KOマウスでは、さらにガラクトース、シアル酸が欠落した糖鎖構造が認められた。以上の結果より、大腸ではB3galt5、St6galnac6の二つの糖転移酵素によって、Muc2にdSLe^A糖鎖が付加されることが明らかとなった。

(2) B3galt5、St6galnac6欠損マウスにおける腸管炎症の自然発症

これまでB3galt5、St6galnac6 KOマウスはDSS誘導性大腸炎に対して高感受性であることを見出しているが、さらに両KOマウスが大腸炎を自然発症するかを検討した。両KOマウスは、12週齢時点でのフローサイトメトリーによる大腸粘膜固有層の免疫細胞解析では、野生型マウスと比較して、IFN- γ 産生、IL-17産生のCD4陽性T細胞や好中球といった炎症性免疫細胞の著明な増多を認めた。さらに、34週齢時点での組

織学的解析では、St6galnac6 KOマウスで明らかな粘膜肥厚と粘膜固有層での免疫細胞増多を認めた。このような結果から、B3galt5、St6galnac6の欠損によるMuc2のdSLe^A糖鎖の消失により、無症候性の軽度の腸管炎症が自然発症することが明らかとなった。

(3) ヒトIBD患者で認められる糖転移酵素遺伝子missense mutationの意義の解析

The Inflammatory Bowel Disease (IBD) Exomes Portalが提供しているIBD患者のエクスーム解析のデータを見ると、IBD患者の一部にB3GALT5遺伝子のmissense mutation(D118A)が認められる。このmissense mutationによるB3GALT5の機能変化と腸管炎症の感受性への影響を解析するため、同変異を導入したB3galt5^{D116A}マウスを作製し、大腸dSLe^Aの発現とDSS腸炎への感受性を解析したところ、B3galt5^{D116A}マウスではB3galt5 KOマウスと同様に、dSLe^A糖鎖の発現が消失し、またDSS腸炎による激しい体重減少を認めた。この結果から、B3GALT5遺伝子のmissense mutationとIBD病態との関連が示唆された。

(4) Muc2の脱シアリル化による腸管炎症発症のメカニズム

次にB3galt5、St6galnac6 KOマウスにおけるMuc2糖鎖の脱シアリル化によって、どのような機序で腸管炎症が発症するかを検討した。初めに各マウスの大腸組織切片をMuc2抗体で染色し、粘液層を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、野生型マウスと比較し、各KOマウスでは大腸粘液層の非薄化が認められた。また細菌特異的なプローブを用いたFISH法により、各KOマウスの大腸組織を観察したところ、野生型マウスでは粘膜固有層に細菌が観察されない一方で、各KOマウスでは粘膜固有層に細菌が観察された。また細菌特異的プライマーを用いたリアルタイムPCR法による細菌DNA定量解析においても、各KOマウスの大腸組織で細菌DNA量の増加を認めた。以上の結果から、B3galt5およびSt6galnac6の欠損によるムチンの脱シアリル化により、粘液層のバリア機能が脆弱化し、細菌侵入を許すことで腸管炎症が発症することが示唆された。

次にMuc2糖鎖の脱シアリル化が大腸粘液層の物性やネットワーク構造にどのような影響を与えるかを検討した。シアル酸は陰性電荷を有し親水性を供与する事が報告されているため、初めに野生型マウスならびに両KOマウスから大腸ムチンを精製し、膜電気泳動法によって脱シアリル化によるMuc2分子の電荷への影響を解析したところ、両KOマウス由来のMuc2は陽極側への泳動度が減少しており、脱シアリル化により陰性電荷が減少している事が示唆された。次に粘液層の弾力性を原子間力顕微鏡で評価した結果、両KOマウスでは粘液層が硬くなり、潤滑性の低下が認められた。最後に大腸の粘膜表面に存在する粘液層を走査型電子顕微鏡で観察し、KOマウスのムチンのネットワーク構造を評価した。野生型マウスの粘液層ではMuc2による多方向性のネットワーク構造が形成され、細菌の侵入を防いでいる像が観察される一方で、両KOマウスではそのネットワーク構造が特定の方向に配向し、細菌が配向性のあるMuc2ポリマーの間から侵入している像が観察された。これらの結果から、B3galt5とSt6galnac6という二つの糖転移酵素を介したMuc2糖鎖のシアリル化によって、Muc2分子の親水性が向上し、それによって粘液層の潤滑性やネットワーク構造が維持され、大腸粘液層のバリア機能が維持されるメカニズムが明らかとなった。

5. 今後の計画

Chst4 は、N-アセチルグルコサミンに硫酸基を糖鎖に付加する酵素である。その他に硫酸基を付加する酵素として、ガラクトースに硫酸基を付加する Gal3st1、Gal3st2 が腸管上皮に高発現する。これら、硫酸基を付加する酵素に着目し、B3galt5 と St6galnac6 と同じ計画に沿って、解析を進める。これらの解析により、糖鎖構造（特にシアル酸付加、硫酸基付加）の腸管恒常性維持における役割を明らかにする。

6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）

- 1 Yokoi T, Murakami M, Kihara T, Seno S, Arase M, Wing JB, Søndergaard JN, Kuwahara R, Minagawa T, Oguro-Igashira E, Motooka D, Okuzaki D, Mori R, Ikeda A, Sekido Y, Amano T, Iijima H, Ozono K, Mizushima T, Hirota S, Ikeuchi H, Takeda K*: Identification of a unique subset of tissue resident memory CD4⁺ T cells in Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 120, e2204269120 (2023). 査読有
- 2 Otake-Kasamoto Y, Kayama H, Kishikawa T, Shinzaki S, Tashiro T, Amano T, Tani M, Yoshihara T, Li B, Tani H, Liu L, Hayashi A, Okuzaki D, Motooka D, Nakamura S, Okada Y, Iijima H, Takeda K*, Takehara T.: Lysophosphatidylserines derived from microbiota in Crohn's disease elicit pathological Th1 response. *J. Exp. Med.* 219, e20211291 (2022). 査読有
- 3 Pareek S, Sanchenkova X, Sakaguchi T, Murakami M, Okumura R, Kayama H, Kawauchi S, Motooka D, Nakamura S, Okuzaki D, Kishimoto T, Takeda K*: Epithelial miR-215 negatively modulates Th17-dominant inflammation by inhibiting CXCL12 production in the small intestine. *Genes Cells* 27, 243-253 (2022). 査読有
- 4 Tani H, Li B, Kusu T, Okumura R, Nishimura J, Okuzaki D, Motooka D, Arakawa S, Yoshihara T, Ogino T, Tsai SH, Furuta Y, Muneta M, Nakamura S, Fukusaki E, Yamamoto K, Yagita H, Kayama H, Takeda K*: The ATP-hydrolyzing ectoenzyme E-NTPD8 attenuates colitis through modulation of P2X4 receptor-dependent metabolism in myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118, e2100594118, (2021). 査読有

7. ホームページ等

<https://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/ongene/>