

略 歴

1992年	3月	東京大学農学部農芸化学科 卒業
1994年	3月	東京大学大学院 農学系研究科農芸化学専攻 修士課程修了
1994年	4月	アサヒビール株式会社勤務
2001年	7月	日本大学医学部 ポストドクトラルフェロー
2003年	5月	日本大学医学部 助手
2006年	4月	日本大学生物資源科学部 専任講師
2014年	4月	日本大学生物資源科学部 准教授
2018年	4月	日本大学生物資源科学部 教授
		現在に至る

腸内フローラによる腸管上皮バリア機能の調節

近年、腸内フローラが宿主の様々な生理機能を調節し、健康維持に重要な役割を果たすことが注目されている。本研究では、腸内フローラによる腸管上皮バリア機能の調節について、その分子機構を明らかにすることを目的とした。腸管の管腔と体内は単層の腸管上皮細胞（IEC）で隔てられ、隣り合うIEC間でのタイトジャンクション形成を介して上皮透過性を制御し物理的バリアとして機能するほか、抗菌ペプチドを産生して化学的バリアとしても機能する。まず、物理的バリア機能の調節機構として、腸内細菌によるmiRNAを介した上皮透過性制御について解析を行った。これまでに腸内細菌により誘導されるmiRNAとしてmiRNA-21-5pを同定し、このmiRNAが低分子量GTPアーゼARF4を介して腸管上皮透過性を亢進させることを明らかにしている。本研究では、ARF4のマウス腸管組織での発現と大腸炎における役割を評価し、ARF4を介したタイトジャンクションタンパク質の発現抑制による腸管上皮透過性の亢進が大腸炎の誘導に関わる可能性を示した。さらに、化学的バリア機構として、腸内細菌代謝産物による抗菌ペプチド α -ディフェンシン5の産生誘導についての解析を行った。腸内細菌叢の構成の違いに伴い、腸内細菌の代表的な代謝産物である短鎖脂肪酸の1つである酪酸の含有濃度が異なり、至適濃度の酪酸には α -ディフェンシン5遺伝子の転写活性化作用があることが明らかになった。これらの結果は、腸内細菌およびその代謝産物を介した腸管上皮バリア機能の調節メカニズムの一端を明らかにしたものであり、腸管上皮バリアの評価指標および腸管上皮バリア機能の改善のための新たな標的の確立につながることを期待される。

1. はじめに

腸管の管腔には莫大な数の多種多様な共生細菌が生息し、腸内フローラを形成している。近年、腸内フローラが宿主の様々な生理機能を調節することが明らかになり、健康維持に重要な役割を果たすことが注目されている。また、腸内フローラの乱れと炎症性腸疾患、アレルギー、がん、生活習慣病、自閉症など様々な疾患との関係が急速に明らかにされてきている。

腸管の広大な粘膜面は、単層の腸管上皮細胞 (IEC) で覆われている。したがって、口や肛門に通じ外界とつながっている腸管管腔と体内とが、たった一層の IEC で隔てられていることとなる。すなわち、IEC は腸管粘膜においてバリアとしての役割を担う。腸管の管腔には大量の腸内細菌が生息するとともに、食事の度に大量の食品抗原が流入し、また、病原菌やウイルスが侵入してくることもある。IEC はこのような多量の抗原に常に最前線で曝されおり、上皮バリア機能は、腸管の恒常性を維持するうえで必要不可欠である。IEC は、管腔の抗原が上皮に付着あるいは上皮バリアを通過して体内へ侵入し、強い炎症反応や感染を引きこすのを防ぐために、幾重にも張り巡らされた仕組みを有している。これらの腸管上皮バリア機構のうち、本研究では特に、タイトジャンクションの形成による物理的バリア機構と抗菌ペプチドを介した化学的バリア機構に着目し、腸内フローラによる調節とその分子機構を明らかにすることを目的とした。

2. 腸内フローラによる物理的バリア機能の調節： 腸内細菌による miRNA を介した上皮透過性制御機構

2-1 背景・目的

隣り合う IEC 間では、細胞膜タンパク質どうしの強固な結合による密着構造 (タイトジャンクション) が形成され、IEC 間を通過する物質の移動が制限されている。このような上皮透過性の制御により、腸内細菌や食品抗原に対して過剰な免疫応答を誘導せずに腸管の恒常性が維持される。逆に、上皮透過性の亢進が、腸管の炎症を伴う疾患のみならず、生活習慣病や自己免疫疾患、さらには自閉症のような精神疾患の発症に関わることが知られている。一方、これらの疾患と腸内細菌叢の乱れとの関係が多数報告され、腸内細菌叢の改善が疾患の抑制につながるとの報告もされている^(1, 2)。したがって、腸内細菌叢による腸管上皮透過性の調節機構を明らかにすることは、これらの疾患の予防・治療に向けて重要な手がかりとなると考えられる。

マイクロ RNA (miRNA) は、最近その生理的役割が注目されている短鎖非コード RNA であり、配列特異的に標的 mRNA の 3' 非翻訳領域に結合し、遺伝子発現を負に制御する。これまでに、腸内細菌により IEC において発現が誘導される miRNA として miR-21-5p を同定し、この miRNA が標的遺伝子 PTEN、PDCD4 の発現を抑制することにより低分子量 GTP アーゼ ARF4 の発現を誘導することを明らかにした。さらに、ARF4 依存的にタイトジャンクションタンパク質の発現が抑制され、腸管上皮透過性亢進することを報告している⁽³⁾。本研究では、腸管上皮透過性の調節において鍵となる分子であると考えられる ARF4 の役割を明らかにするために、その発現と機能について解析を行った。

2-2 方法

マウス腸管組織におけるARF4の発現解析

BALB/c マウスより、近位・中位・遠位小腸（小腸を5分割したうちのそれぞれ最も胃に近い部位、真ん中の部位、最も胃に遠い部位）および結腸を摘出し、包埋剤を充填して凍結ブロックとした。これより5～10 μ mの厚さで腸管切片を作成し、抗ARF4抗体および二次抗体としてAlexa647標識抗ウサギIgG抗体を用いて免疫染色を行った。DAPI含有の退色防止封入剤を用い、共焦点走査型顕微鏡（FV1000-D, オリンパス）により観察した。

腸管各部位のIECにおけるARF4の発現解析

通常および無菌BALB/c マウスより、近位・中位・遠位小腸および結腸を摘出し、小腸についてはパイエル板を除去した。洗浄、振とう、デイスパーゼ処理、抗CD45抗体を用いたMACSによるリンパ球除去により、腸管各部位よりIECを調製した⁽⁴⁾。IECから細胞抽出液を回収し、ウェスタンブロッティングによりARF4および β -アクチンの発現を解析した。ARF4のバンド強度を β -アクチンのバンド強度で補正し、腸管各部位のARF4の発現レベルを比較した。

DSS誘導性大腸炎モデルを用いた解析

3%デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）を飲水に添加し、BALB/c マウスに5日間自由摂取させた。対照としてDSSを含まない飲水を摂取させる群を準備した。毎日体重測定および糞便観察を行い、摂取期間終了後に、結腸の長さの測定および結腸組織のHE染色を行った。また、結腸より調製したIECにおけるARF4およびタイトジャンクションタンパク質の発現をウェスタンブロッティングにより解析した。

2-3 結果・考察

miR-21-5pによる腸管上皮透過性調節の鍵となる分子ARF4について、まずマウス腸管組織における発現を免疫組織染色により解析した。その結果、絨毛上皮においてARF4の発現が確認された。さらに、ARF4は絨毛の頂端側またはクリプト側のどちらかに偏って分布しているのではなく、小腸各部位および結腸のいずれにおいても絨毛上皮全体に分布していることが明らかになった。

次に、マウス腸管各部位のIECにおけるARF4の発現をウェスタンブロッティングにより解析したところ、近位小腸および結腸のIECにおいて発現が高く、遠位小腸において発現が低いことが示された。さらに無菌マウスの結腸IECにおいては、通常マウスと比較してARF4の発現が有意に低く、結腸IECにおけるARF4の発現が腸内細菌により誘導されることが明らかになった。また、遠位小腸においても有意差は認められなかったが同様の傾向が認められた（図1）。したがって、腸内細菌の数が

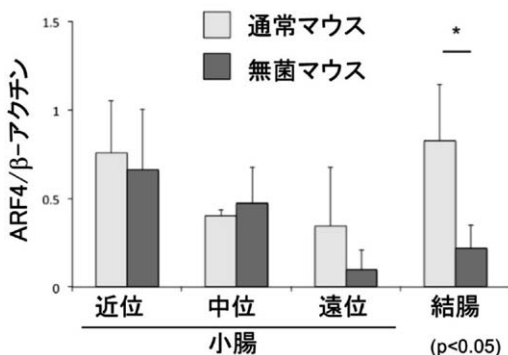


図1 腸管各部位のIECにおけるARF4の発現
通常および無菌マウスの腸管各部位よりIECを調製し、ARF4の発現をウェスタンブロッティングにより解析した。

小腸上部に比べて圧倒的に多い大腸や小腸下部の IEC における ARF4 の発現が腸内細菌に依存的事であることが示された。腸管の恒常性が破綻した状態においては腸内細菌が腸炎の誘導因子となることが知られていることから、このような腸炎の誘導に ARF4 を介した腸管上皮透過性の亢進が関与する可能性が考えられた。

そこで、次に、炎症性腸疾患のモデルとして広く使用されている、マウスの DSS 誘導性大腸炎モデルを用いて炎症時の ARF4 の挙動を解析した。本実験においては結腸 IEC の調製が困難になるような重度の腸炎が誘導されないように、マウスの系統と DSS 濃度を設定した。マウスへの DSS 投与により、体重減少は認められなかった (図 2A)。また、結腸組織の HE 染色の結果、クリプトの消失は認められなかったが、DSS 投与群においてわずかな上皮損傷が観察された。さらに、結腸の有意な萎縮 (図 2B)、血便、盲腸の萎縮が認められた。これらの結果から、軽度の腸炎が誘導されていることが確認された。そして、DSS 投与群では対照群と比較して結腸 IEC において ARF4 の発現が有意に上昇すること、逆にタイトジャンクションタンパク質 occludin の発現が有意に減少することが示された (図 3)。以上の結果より、ARF4 を介したタイトジャンクションタンパク質の抑制による腸管上皮透過性の亢進が腸管炎症を惹起することが示唆された。

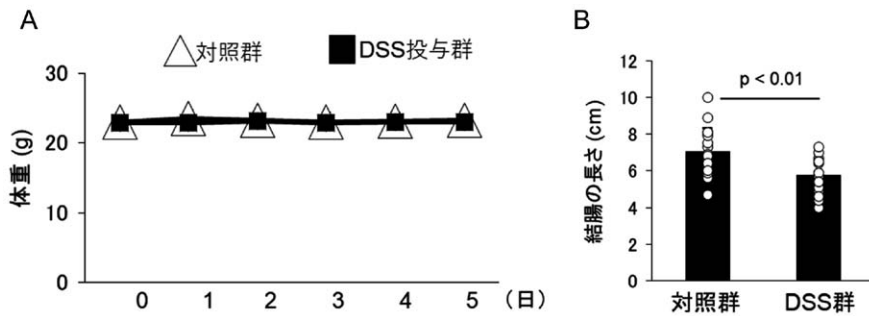


図2 マウスのDSS誘導性大腸炎モデル
結腸 IEC の解析が可能な軽度の大腸炎が誘導された。(A) 体重の推移。(B) DSS 投与5日後の結腸の長さ。

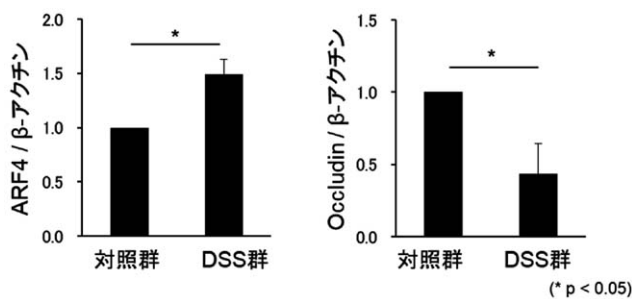


図3 大腸炎モデルを用いた ARF4 およびタイトジャンクションタンパク質の発現解析
マウスの DSS 誘導性大腸炎モデルを用いて、結腸 IEC の ARF4 および occludin の発現をウェスタンブロットングにより解析した。

2-4 今後の課題・展望

本研究により、腸内細菌が誘導する miR-21-5p に依存的な ARF4 について、この分子を介した腸管上皮透過性の亢進が腸管炎症の誘導に関わる可能性が示された。したがって、miR-21-5p あるいは ARF4 の発現制御機構を明らかにすることにより、上皮透過性をコントロールして腸管炎症を

抑制するための標的分子の同定につながることを期待される。腸内細菌による miR-21-5p の発現誘導機構の少なくとも一部は TLR 経路を介したものであることをこれまでに明らかにしているが、さらに詳細な解析が必要である。今後、miR-21-5p、ARF4、あるいはそれらの制御分子の発現を調節する化合物の探索により、腸管上皮透過性をコントロールする新たな手段の確立へと応用できる可能性が考えられる。ARF4 によるタイトジャンクションタンパク質の発現抑制機構を明らかにすることも今後の課題であり、現在取り組んでいるところである。

3. 腸内フローラによる化学的バリア機能の調節： 腸内細菌代謝産物による抗菌ペプチドの産生誘導

3-1 背景・目的

腸管上皮から産生される抗菌ペプチドは、病原菌に対する感染を防ぐのみでなく、腸内細菌叢の維持にも不可欠な役割を果たす⁽⁵⁾。炎症性腸疾患等で抗菌ペプチドの産生の低下が認められるなど⁽⁶⁾、その産生異常は感染症のリスクを高めるのみならず、腸内細菌叢のバランスの乱れに起因する様々な疾患につながるごととなる。本研究では、腸管上皮において産生される主要な抗菌ペプチドの1つである α -ディフェンシン5の発現調節に対する腸内細菌由来代謝産物の作用を明らかにすることを目的とした。これまでの研究により、マウスにおいて腸内細菌叢の違いにより腸内容物低分子量画分の α -ディフェンシン5 遺伝子の発現調節活性に差があることを示している。本研究では、代表的な腸内細菌由来代謝産物である短鎖脂肪酸に着目し、特定の短鎖脂肪酸の含有量の違いにより α -ディフェンシン5 遺伝子の発現調節活性に差が生じるとの仮説を立て、 α -ディフェンシン5 遺伝子の発現調節作用を有する短鎖脂肪酸の同定を試みた。

3-2 方法

マウス盲腸内容物低分子量画分の調製

BALB/c マウスの盲腸内容物 1g あたり 1ml のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を添加し、超音波処理後に遠心分離し上清を回収した。この上清を Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filters Ultracel-3K (ミリポア) を用いた限外ろ過に供し、分子量 < 3kDa の画分を得た。

マウス盲腸内容物低分子量画分の GC-MS 分析

マウス盲腸内容物 < 3kDa 画分中の短鎖脂肪酸の測定は、メチルエステル化後、GC-MS を用いて行った。マウス盲腸内容物 3kDa 画分を凍結乾燥後、10% 硫酸 - メタノール溶液 2ml に溶解し、60°C 20 分間加熱した。放冷後、超純水 3ml、ヘキサン 5ml を添加して混和した。上層のヘキサン層を回収した後、下層にヘキサン 5ml を添加した。再度混和後、同様に上層のヘキサン層を回収して先に回収したヘキサン層と合わせ、GC-MS 分析に供した。なお、短鎖脂肪酸の標準品を用いて同様にメチルエステル化反応を行い、盲腸内容物 < 3kDa 画分に由来するピークの保持時間と比較することで各ピーク成分の同定を行った。また、標準品の希釈系列を用いて検量線を作成し、ピーク面積値から盲腸内容物 < 3kDa 画分に含有される短鎖脂肪酸の定量を行った。

菌叢解析

マウス盲腸内容物の一部を用い、QIAamp[®] DNA stool kit (キアゲン)を用いてDNAを抽出した。イルミナ社16S Metagenomic sequencing library preparation プロトコルに従い、16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域をPCRにて増幅し、インデックス付加後、Miseq (イルミナ)を用いた次世代シーケンスに供した。

レポーターアッセイ

ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 を 12 ウェルプレートに播種し、翌日にレポータープラスミドを導入した。レポータープラスミドとして、マウス α -ディフェンシン 5 遺伝子の nt-1037/-1 領域 (塩基番号は、翻訳開始点を+1とする) をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したものをを用いた⁽⁷⁾。3時間培養後、0.1, 1, 10 mMの短鎖脂肪酸を添加した。さらに20-21時間培養後、細胞を回収して Dual-luciferase reporter assay system (プロメガ)を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。なお、CMVプロモーター支配下にウミシタケルシフェラーゼ遺伝子を持つ発現プラスミドを同時に導入して補正を行った。

3-3 結果・考察

異なるブリーダー由来のマウス盲腸内容物中の短鎖脂肪酸含有量をGC-MS解析により測定した結果、酪酸、吉草酸、イソ吉草酸の含有量に違いがあることが明らかになった。図4に、典型的なクロマトグラムと酪酸含有量の比較を示した。また、これらの盲腸内容物を用いて16S rRNA 遺伝子配列による菌叢解析を行った結果、両ブリーダー間で菌叢構成の違いが認められた。したがって、腸内細菌叢の違いにより、酪酸、吉草酸、イソ吉草酸といった腸内細菌由来代謝産物の含有量に差が生じていると考えられた。

次に、酪酸、吉草酸、イソ吉草酸について、レポーターアッセイにより α -ディフェンシン 5 遺伝子の転写プロモーター活性に及ぼす影響を測定した。その結果、酪酸に α -ディフェンシン 5 遺伝子の転写プロモーター活性を増強させる作用があることが明らかになった (図5)。 α -ディフェンシン 5 遺伝子の

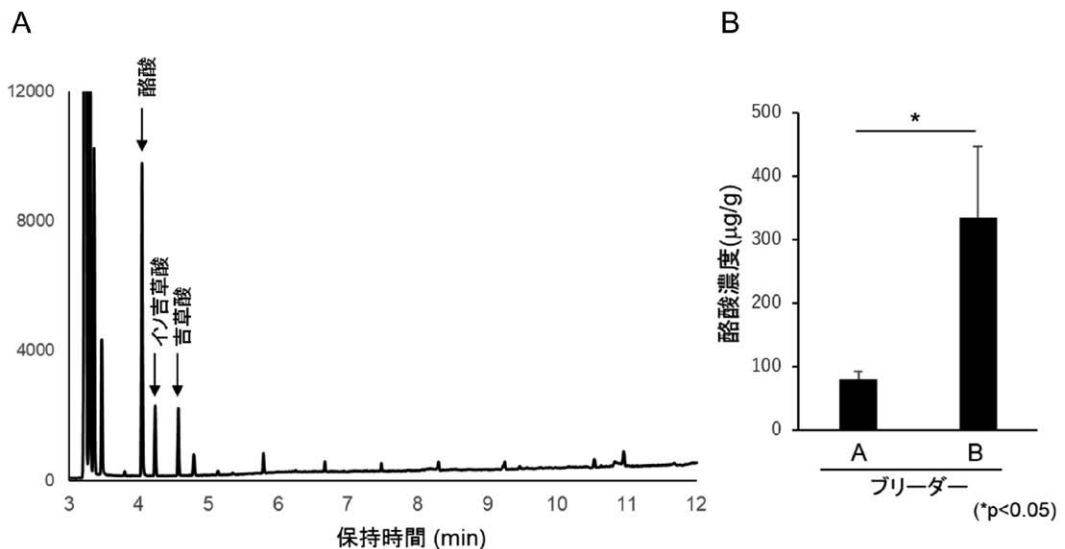


図4 マウス盲腸内容物中の短鎖脂肪酸の定量

(A) GC-MS解析のクロマトグラム。

(B) 酪酸含有量の定量結果。各ブリーダー4匹のマウスの盲腸内容物1gあたりの含有量の平均値と標準偏差を示した。

発現増強活性は、測定した濃度範囲では1mMで最も高く、10mMでは活性が低下したことから、発現増強作用には至適濃度があることが示された。吉草酸およびイソ吉草酸には顕著な増強作用は認められなかった。

以上の結果から、腸内細菌の代表的な代謝産物の1つである酪酸に α -ディフェンシン5遺伝子の発現増強作用があることが明らかになった。また、実際に腸内細菌叢の構成の違いにより腸内容物中の酪酸濃度に違いがあること、酪酸による発現増強作用には至適濃度があることが示され、腸内細菌叢の変化により酪酸濃度が至適範囲外となると α -ディフェンシン5遺伝子発現の低下につながる可能性が考えられた。逆に、腸内細菌叢への介入により酪酸濃度を至適範囲に保つことにより、 α -ディフェンシン5遺伝子の発現の回復や増強効果が期待されると考えられた。

3-4 今後の課題・展望

腸内細菌の代謝産物に抗菌ペプチド遺伝子の発現調節活性が認められたことから、抗菌ペプチドの産生の回復・維持手段として腸内細菌叢への介入が有効である可能性が示唆された。本研究で α -ディフェンシン5遺伝子の発現増強作用があることが明らかになった酪酸には、制御性T細胞の誘導による炎症抑制活性が報告されており⁽⁸⁾、酪酸濃度が腸管における恒常性を維持する1つの鍵となると考えられた。さらに、酪酸以外の化合物の存在も示唆されていることから、今後、同定を進めていきたいと考えている。

4. おわりに

本研究より、腸内細菌およびその代謝産物を介した物理的および化学的な腸管上皮バリア機能の調節メカニズムの一端が明らかになった。腸管上皮バリア機能が正常に保持されなければ、腸内細菌や異物の体内への侵入を許し、炎症や感染をベースにした様々な疾患のリスクが高まることとなる。さらなる研究により、腸管バリアの健全性を評価するための指標、そして腸管バリア機能の改善を介した健康維持・増進のための新たな標的の確立につながることを期待される。最後に、ご支援賜りました公益財団法人アサヒグループ学術振興財団、研究についての貴重なご助言を賜りました役員・評議員・選考委員の先生方に心より感謝申し上げます。

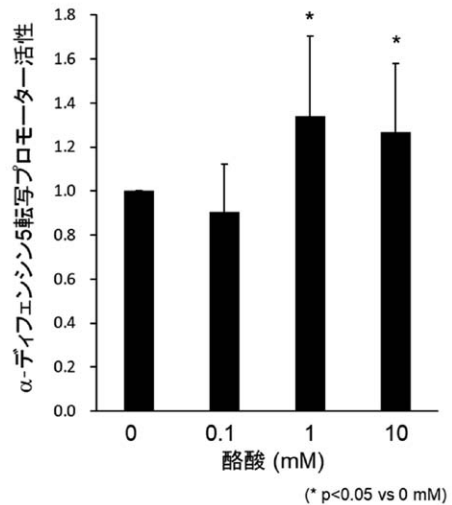


図5 酪酸による α -ディフェンシン5の発現調節作用
酪酸が α -ディフェンシン5遺伝子の転写プロモーター活性に及ぼす影響をヒトIEC株を用いたレポーターアッセイにより測定した。酪酸無添加の場合を1とした相対値で示した。

参考文献

- 1) Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, Chow J, Reisman SE, Petrosino JF, Patterson PH, Mazmanian SK. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 2013, 155:1451-1463.
- 2) Buffington SA, Di Prisco GV, Auchtung TA, Ajami NJ, Petrosino JF, Costa-Mattioli M. Microbial reconstitution reverses maternal diet-induced social and synaptic deficits in offspring. *Cell*, 2016, 165:1762-1775.
- 3) Nakata K, Sugi Y, Narabayashi H, Kobayakawa T, Nakanishi Y, Tsuda M, Hosono A, Kaminogawa S, Hanazawa S, Takahashi K. Commensal microbiota-induced microRNA modulates intestinal epithelial permeability through a small GTPase ARF4. *J Biol Chem*, 2017, 292:15426-15433.
- 4) Sugi, Y., Takahashi, K., Kurihara, K., Nakata, K., Narabayashi, H., Hamamoto, Y., Suzuki, M., Tsuda, M., Hanazawa, S., Hosono, A., and Kaminogawa, S. Post-Transcriptional Regulation of Toll-Interacting Protein in the Intestinal Epithelium. *PloS one*, 2016, 11: e0164858.
- 5) Nakamura K, Sakuragi N, Takakuwa A, Ayabe T. Paneth cell α -defensins and enteric microbiota in health and disease. *Biosci Microbiota Food Health*, 2016, 35:57-67.
- 6) Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H Jr, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 18129-18134.
- 7) Sugi Y, Takahashi K, Kurihara K, Nakano K, Kobayakawa T, Nakata K, Tsuda M, Hanazawa S, Hosono A, Kaminogawa S. α -Defensin 5 gene expression is regulated by gut microbial metabolites. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2017, 81:242-248.
- 8) Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 2013, 504:446-450.