

腸内細菌の大腸組織侵入を防ぐメカニズムを解明

— 潰瘍性大腸炎への新たな治療薬開発に期待 —

【研究成果のポイント】

- 腸内細菌^{注1)}の侵入が腸管炎症を誘導するが、大腸がどのように細菌の侵入を抑制しているかは不明だった
- 腸管上皮細胞に発現する蛋白質 Lypd8^{注2)}が腸内細菌の侵入を抑制し、腸管炎症を制御することを発見
- 現在根治的治療方法がない潰瘍性大腸炎^{注3)}の新たな治療法の開発に期待

<概要>

大阪大学大学院医学系研究科感染症・免疫学講座(免疫制御学)/免疫学フロンティア研究センターの奥村龍特任研究員、竹田潔教授らのグループは、**腸管上皮細胞に発現するLypd8という蛋白質が鞭毛^{注4)}を持つ腸内細菌(有鞭毛細菌)の侵入を抑制し、腸管炎症を抑えるメカニズムを突き止めました。**

近年患者数が増加の一途をたどる潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患の原因の一つとして、腸管上皮によって主に形成される腸管粘膜バリア^{注5)}の破綻が考えられています。おびたしい数の腸内細菌が存在する大腸においては粘膜バリアの一つである粘液層^{注6)}が厚く表面を覆っており、腸内細菌が容易に大腸組織に侵入できないことがわかっていますが、**どのように細菌の侵入を抑えているかはよくわかっていませんでした。**

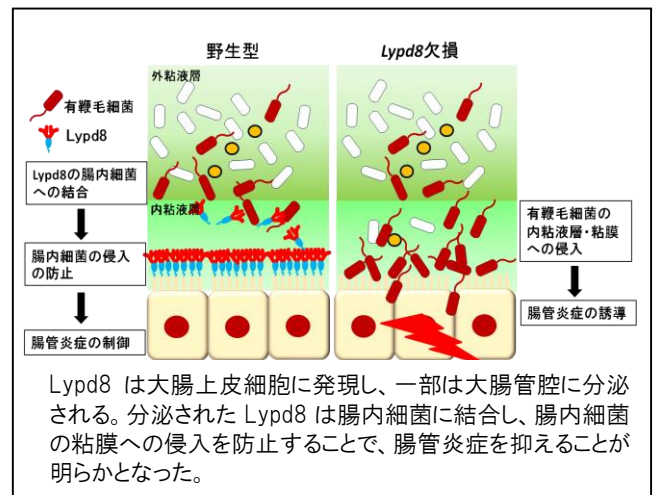
そこで、本研究では、大腸上皮細胞に特異的に高く発現しているLypd8遺伝子を欠損したマウスを作製しました。野生型マウスでは腸管の内粘液層はほぼ無菌状態に保たれていますが、Lypd8遺伝子欠損マウスでは、内粘液層に腸内細菌が多数侵入し、腸炎の実験モデルにおいては野生型マウスと比較して重篤な腸炎を発症することを見出しました。また、Lypd8は高度に糖鎖で修飾されるGPIアンカー型蛋白質^{注7)}で、大腸管腔に分泌され、特に鞭毛を持つ腸内細菌に結合し、運動性を抑えることで細菌の侵入を防止していることが明らかになりました。

潰瘍性大腸炎は、現在根治的治療がなく、発病原因のさらなる解明と新規治療開発が急務とされています。今後、Lypd8蛋白の補充療法などの粘膜バリア増強による潰瘍性大腸炎への新たな治療法の開発が期待されます。

<研究の背景>

近年患者数が増加の一途をたどる潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患の原因の一つとして、主に腸管上皮によって形成される腸管粘膜バリアの破綻が知られています。実際、腸管粘膜のバリア機能が低下しているマウスにおいては粘膜への腸内細菌への侵入が観察され、腸管炎症が起こるまたは起こりやすくなっていることがわかっています。すなわち、**粘膜バリア形成のメカニズムの全容解明は炎症性腸疾患の病態解明に重要であるとともに、新たな治療法の開発の可能性を広げます。**おびたしい数の腸内細菌が存在する大腸では、粘膜バリアの一つである粘液層に厚く覆われており、腸内細菌が容易に大腸組織に侵入できないことがわかっていますが、**どのように細菌の侵入を抑えているかに関してよくわかっていませんでした。**

研究グループは、大腸上皮細胞に特異的に高く発現するLypd8に着目しました。Lypd8は高度に糖鎖修飾されるGPIアンカー型蛋白質で大腸管腔内に恒常的に分泌されていることがわかりました(図1)。またヒトにおいてもマウスと同様に大腸上皮に発現していますが、潰瘍性大腸炎の患者では発現の著しい低下が観察されました(図2)。Lypd8を欠損するマウスを作製すると、このマウスの大腸では正常であれば無菌に保たれている内粘液層に腸内細菌が侵入して



おり(図 3)、特に大腸菌やプロテウス属菌などの有鞭毛細菌が侵入していました(図 4)。有鞭毛細菌の多くが悪玉菌として知られ、腸管炎症との関連を指摘されていることから、次に Lypd8 欠損マウスに腸炎を引き起こし、野生型マウスと比較すると、有意に腸炎が重症化しました(図 5)。次に、Lypd8 分子の機能をさらに解析するため、有鞭毛細菌の一つであるプロテウス菌を使って、Lypd8 分子の細菌への作用を調べました。電子顕微鏡を用いた観察で Lypd8 はプロテウス菌の鞭毛に結合することがわかり(図 6)、さらに寒天培地を用いた実験にて Lypd8 はプロテウス菌の運動性を抑制することがわかりました(図 7)。

本研究の結果より、大腸上皮に高く発現する Lypd8 は、大腸管腔内に分泌され、特に有鞭毛細菌の鞭毛に結合し、運動性を抑制することで細菌の粘膜への侵入を防止し、腸管炎症を抑制していることがわかりました。

<本研究成果の意義>

本研究では、Lypd8 が腸内細菌の侵入を抑え、腸管炎症を制御していることを明らかにしました。近年、潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患の患者数は増加の一途をたどっています。今後、Lypd8 蛋白質の補充療法などの粘膜バリア増強による潰瘍性大腸炎への新たな治療法の開発が期待されます。

<掲載論文・雑誌および特記事項>

論文タイトル: “Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia”

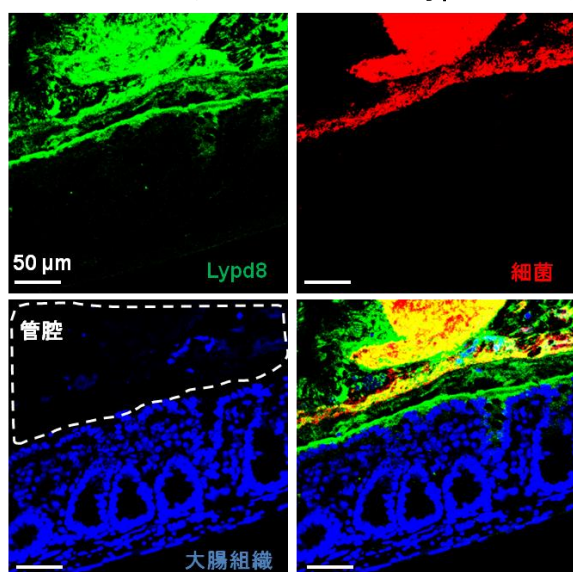
(Lypd8 は有鞭毛細菌と大腸上皮を分け隔てる)

著者: 奥村 龍、倉川 尚、中野隆史、香山尚子、木下 允、元岡大輔、後藤和義、喜村大志、神山長慶、楠 貴志、上田仁康、呉紅、飯島英樹、Soumik Barmann、大澤日出樹、松野裕旨、西村潤一、大場雄介、中村昇太、飯田哲也、山本雅裕、梅本英司、佐野浩一、竹田 潔

また、本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ(AMED-CREST)の研究開発領域「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術」(研究開発総括: 菅村和夫、研究開発代表者: 竹田)の一環で行われました。なお、本研究開発領域は、平成 27 年 4 月の日本医療研究開発機構の発足に伴い、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)より移管されたものです。また、本研究は、大阪医科大学との共同で行いました。

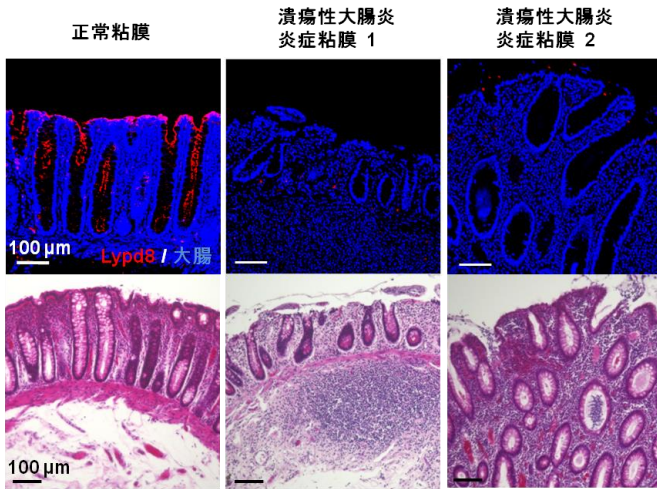
<参考図>

図 1 マウス大腸組織における Lypd8 の発現



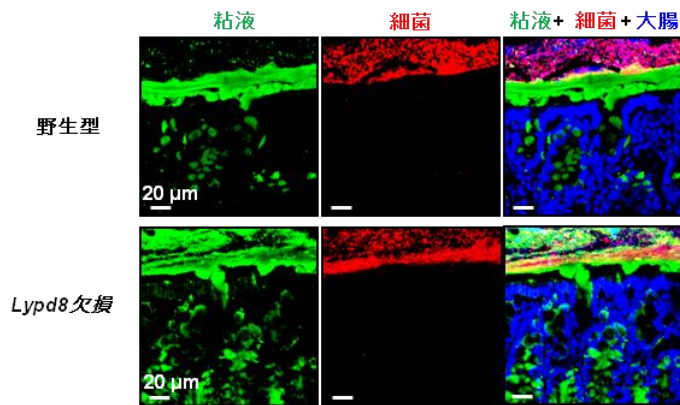
内容物を含んだマウス大腸を固定し、組織切片を作製。大腸組織切片を抗 Lypd8 抗体^{注8)}と細菌 DNA に特異的に結合するプローブ^{注9)}(細菌)を用いて染色し、観察した。Lypd8 は大腸腺組織最上層の上皮細胞に発現し、大腸管腔内に分泌されることが観察された。

図 2 潰瘍性大腸炎患者の大腸における Lypd8 の発現



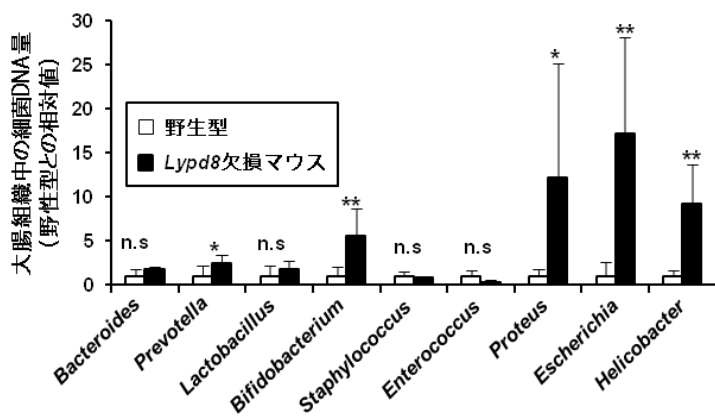
ヒト大腸組織切片の抗 Lypd8 抗体を用いた免疫染色(上段)とヘマトキシリン・エオシン染色(下段)。Lypd8 は正常大腸粘膜では大腸上皮に発現しているが、潰瘍性大腸炎患者二人の炎症粘膜においてはほとんど発現が認められない。

図 3 Lypd8 欠損マウスでは大腸内粘液層に多数の腸内細菌が侵入する



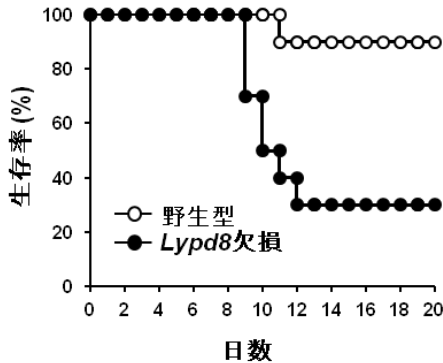
(上段)野生型マウスおよび Lypd8 欠損マウス(下段)の大腸組織を抗 Muc2 抗体(粘液)と細菌 DNA に特異的に結合するプローブ(細菌)で染色し、観察した。その結果、Lypd8 欠損マウスでは大腸内粘液層に多数の腸内細菌が侵入していることが観察された。

図 4 Lypd8 欠損マウス大腸組織には野生型マウスと比較して有鞭毛細菌が有意に多く検出される



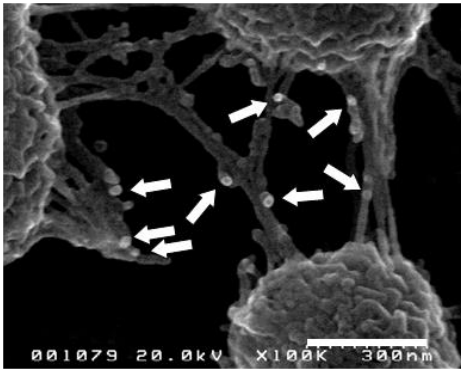
野生型マウスと比較して、Lypd8 欠損マウスの大腸組織には、鞭毛を持ち運動性が高い *Proteus* (プロテウス属菌)、*Escherichia* (大腸菌)、*Helicobacter* (ヘリコバクター属菌)が有意に多く検出された。

図 5 Lypd8 欠損マウスは、化学物質誘導性腸炎が重症化する



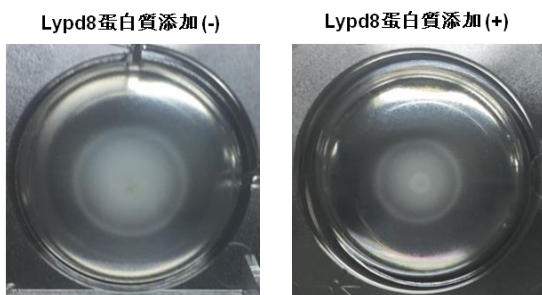
デキストラン硫酸ナトリウムを野生型マウスと Lypd8 欠損マウスに内服させ、化学物質による腸炎を誘導し、生存率を解析した。その結果、Lypd8 欠損マウスでは死亡率が高く、腸炎が重症化することがわかった。

図 6 Lypd8 はプロテウス菌の鞭毛に結合する



プロテウス菌と Lypd8 蛋白質を反応後、蛋白質に対する抗体を用いて Lypd8 を標識し、走査型電子顕微鏡にて観察。Lypd8 蛋白質とプロテウス菌鞭毛の結合が観察された。矢印で示した粒状の構造が Lypd8 蛋白質と鞭毛との結合を示している。

図 7 Lypd8 はプロテウス菌の運動性を抑制する



軟寒天培地に Lypd8 蛋白質を添加し、プロテウス菌の移動円の半径を測定し、運動性を評価した。Lypd8 蛋白質を添加した群では移動円の大きさが小さくなり、Lypd8 蛋白質により運動性が抑えられることが観察された。

<用語解説>

注1)腸内細菌

ヒトおよび動物の腸管内に生息している細菌の総称。ヒトの腸管には約 100 兆個の細菌が存在するといわれている。

注2)Lypd8

Ly6/uPARドメインをもつことを特徴とする Ly6/uPAR ファミリー分子の一つ。これまで機能に関しては全くわかっていなかった。

注3)潰瘍性大腸炎

大腸粘膜に連続的にびらんや潰瘍をきたす原因不明の炎症性疾患。現在、根治的治療は存在せず、国内で患者数は増加傾向であることから、発病原因のさらなる解明と新規治療開発が急務である。

注4)鞭毛(べんもう)

毛状の細胞小器官の一つ。鞭毛を持つ細菌(有鞭毛細菌)は鞭毛をモーターのように回転させ運動する。

注5)腸管粘膜バリア

主に腸管上皮により作り出される粘液や抗菌ペプチドなどの感染防御機構。

注6)粘液層

腸管上皮を覆う粘液の層。大腸では外粘液層と内粘液層の二つの層があり、大腸上皮直上に存在する内粘液層は密度が高く、上皮に固く接着し、ほぼ無菌の状態に保たれている。

注7)GPI アンカー型蛋白質

グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)によって細胞膜につなぎとめられている一群の蛋白質。一部の GPI アンカー型蛋白質は酵素により切断、遊離し、細胞外に分泌されることが知られている。

注8)抗体

特定の蛋白質などの分子を認識し、それに結合する糖蛋白質。組織切片の染色で特定の蛋白質を染色する際に用いられる。

注9)プローブ

DNA の相補性を利用し、特定の遺伝子、細菌、ウイルスを検出するために用いられる DNA 断片。