

粘膜バリアによる腸内細菌と腸管上皮の分離

奥村 龍

1. はじめに

我々が住む地球上では、至るところに細菌、真菌などの微生物が存在している。それは我々人間にとっても例外ではなく、特に外界に直面する皮膚や、体の内側ではあるが外部環境に曝露されている鼻腔、口腔、消化管、上気道、膣などには微生物が常在し、“微生物叢”を構築している。その中でも、消化管は食物由来の栄養素が豊富に存在し、偏性嫌気性菌を中心に、おびただしい数の微生物が存在している。さらにそれらの腸内微生物は、ただそこに常在しているだけでなく、食物繊維の分解によって産生される短鎖脂肪酸や、葉酸、ビタミンK、ビタミンB類などのビタミンを我々に提供し、我々の健康維持に大きく貢献している。しかしながら、こういった有益な腸内細菌も、ひとたび組織内に侵入すれば免疫システムによって外敵とみなされ排除される。そのため腸内微生物と宿主が互いに干渉せずwin-winの関係を続けていくためには、両者を空間的に分け隔てるメカニズムが必要であり、それを可能にするのが腸管上皮細胞によって構築される“粘膜バリア”である。本稿では、その粘膜バリアが腸内細菌と腸管上皮をどのように分断しているかについて、我々の研究によって明らかになったことを含めて最近の知見を紹介し、その粘膜バリアの破綻により誘導される腸管炎症について述べたい。

2. 粘膜バリアの種類とその機能

食物の摂取とともに外来微生物が通過し、またおびただしい数の微生物が共生する消化管の表層には、それら微生物から腸管組織を保護する、または常在する微生物群に対する過剰な免疫応答を回避するために、腸管上皮によって形成される粘膜バリアといわれる障壁が存在する。粘膜バ

リアはその機能や性質により、物理的バリアと化学的バリアの二つに大別される。

まず物理的バリアとは、文字どおり物理的な壁となって微生物の侵入を防止するバリアであり、その中には上皮層を被覆する粘液層、上皮細胞表面に存在する糖鎖の集合体である糖衣、細胞間接着装置である密着結合や接着結合が含まれる。

粘液層は腸管上皮細胞の一つである杯細胞から産生される糖タンパク質のムチンによって構成され、腸管上皮を覆うことで物理的に腸管組織への細菌侵入を防止している。またムチン分子に付加されている多量のO型糖鎖は粘液の粘性を生み出し、さらに上皮細胞表面の糖鎖に結合し接着しようとする病原微生物に対して競合的に結合することで、細菌の上皮細胞への接着を防止している。糖衣は膜結合型ムチンタンパク質などの腸管上皮細胞表面に発現する膜タンパク質に付加されている糖鎖の集合体であり、その密に凝集した糖鎖により物理的に腸管組織内部への細菌侵入を防止していると考えられている。さらに粘液層、糖衣をかいくぐる微生物がいるとしても、腸管上皮細胞どうしをつなぎとめる密着結合や接着結合が、微生物の腸管組織内部への侵入を防止する。

一方で化学的バリアは、物理的バリアと異なり、微生物に化学的变化をもたらし、抗菌活性を発揮することで細菌侵入を抑制する分子群である。それらの抗菌分子には、ディフェンシンファミリー分子やReg3ファミリー分子などが含まれ、それらの分子は主として腸管上皮細胞の一つであるパネート（Paneth）細胞から産生される（図1）。

近年、粘液を保存するためにカルノア固定した腸管組織の切片に含まれる腸内細菌をFISH法で染色し、観察することで、小腸、大腸ともに腸内細菌群と腸管上皮層は粘膜バリアにより空間的に分断されていることが明らかとなった¹⁾。さらには同じ消化管であっても、小腸と大腸では粘膜バリアにより腸内細菌と腸管上皮層を分け隔てるメカニズムは異なることが明らかとなった²⁾。

小腸においては、大腸と比較して粘液を産生する杯細胞の数は少なく、粘液層はそれほど厚くないが³⁾、前述のパネート細胞が存在し、それらの細胞から産生されるディフェンシンファミリー分子やReg3ファミリー分子が特に腸内細菌と腸管上皮を分け隔てるのに重要であることが近年明らかとなった^{4,5)}。

大阪大学大学院医学系研究科免疫制御学（〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2）

Segregation of intestinal bacteria and intestinal epithelia by mucosal barriers

Ryu Okumura (Laboratory of Immune Regulation, Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Medicine, Osaka University, Yamadaoka 2-2, Suita, Osaka 565-0731)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890731

© 2017 公益社団法人日本生化学会

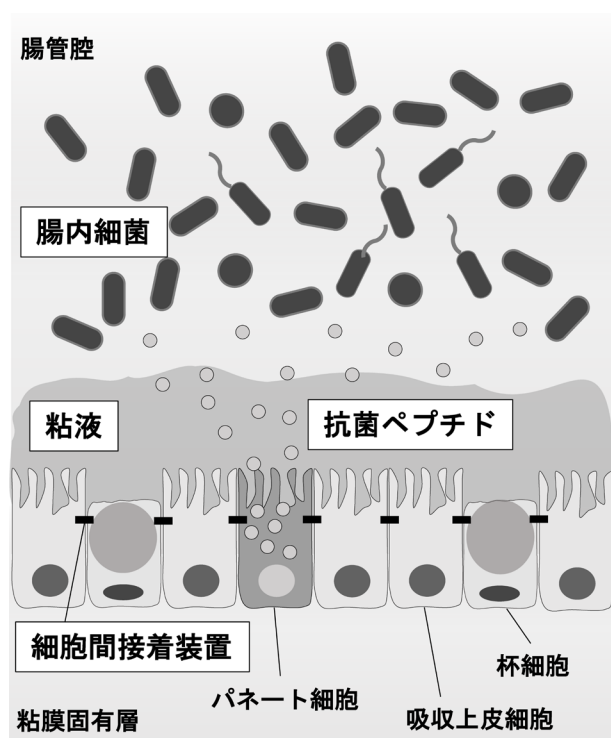


図1 腸管粘膜バリアの概観図

一方で、小腸の約100倍以上の腸内細菌が存在する大腸では、粘液層が分厚く、内粘液層と外粘液層の二層に分けられる^{1,3)}。腸内細菌のほとんどは外粘液層に存在し、内粘液層はほとんど無菌に保たれている。しかしながら、抗菌分子の産生に特化したパネート細胞が存在しない大腸において、内粘液層によりきれいに腸内細菌と上皮層が分け隔てられるメカニズムはこれまで明らかとなっていなかった。

3. 大腸において腸内細菌と腸管上皮を分け隔てる新たなメカニズム

我々は、大腸において内粘液層により腸内細菌と腸管上皮層が分け隔てられるメカニズムを明らかにするために、まず大腸上皮特異的に高発現する分子に着目した。その中で、それまで機能未知であったGPIアンカー型膜タンパク質であるLy6/Plaur domain containing 8 (Lypd8) という分子が、大腸上皮特異的に高発現していることを見いだした⁶⁾。さらに、この分子はアミノ酸配列から計13か所のN型糖鎖修飾サイトが予測されており、実際にLypd8を強制発現させた腸管上皮細胞からLypd8リコンビナントタンパク質を精製し、脱糖鎖酵素を用いた解析を行ったところ、脱N型糖鎖処理により、11万の分子量が4万へ低下し、高度にN型糖鎖修飾されていることが明らかとなった。さらにカルノア固定したマウス大腸組織の切片を、抗

Lypd8抗体を用いて免疫染色し、Lypd8の発現を解析したところ、Lypd8は大腸腺組織の最表層の上皮細胞の管腔側に高発現し、さらに大腸管腔に恒常的に分泌されていることがわかった(図2)。これまでマウスにおいて、ムチンに付加されるO型糖鎖付加酵素を欠損させると粘液層が維持されないこと、さらにフコース転移酵素を欠損させると粘膜バリア機能が低下することが報告されており、これらの知見より腸管上皮に発現するムチンなどの糖タンパク質に付加される糖鎖が粘膜バリア維持に重要であることが明らかとなっている。こういったことから大腸上皮細胞に高発現し、高度に糖鎖修飾されているLypd8も、大腸粘膜バリア機能維持に重要である可能性が考えられた。そこで我々は、Lypd8の粘膜バリアにおける機能を明らかにするため、Lypd8欠損マウスを作製し、その表現型解析を行った。

まず初めにLypd8欠損マウスの大腸組織切片を観察すると、野生型マウスと比較して大腸上皮に多数の腸内細菌が付着し、野生型マウスであれば細菌が認められない上皮直上の内粘液層や腸陰窩深部への細菌侵入が認められた。さらにLypd8欠損マウスの大腸に付着している腸内細菌をリアルタイムPCR法で解析すると、大腸菌属、プロテウス属、ヘリコバクター属といった鞭毛を持ち運動性の高い細菌が、野生型と比べて有意に多く検出され、Lypd8マウスの大腸組織のホモジェネートを培養すると*Proteus mirabilis*というプロテウス属の細菌が有意に多く検出された。これらの結果より、Lypd8は腸内細菌の中でも、特に鞭毛を持ち運動性の高い細菌の腸管上皮への侵入を抑制していることが明らかとなった(図2)。

そこで我々は、Lypd8が有鞭毛細菌の侵入を抑制するメカニズムの解析を行った。まずLypd8が腸管内で腸内細菌に会合しているかを、糞便抽出液から細菌画分を回収し、抗Lypd8抗体を用いたフローサイトメトリー解析により検討した。その結果、Lypd8は腸内細菌の約5%程度に会合していることが明らかとなった。さらにLypd8が結合する細菌を細菌属特異的プライマーによるqPCR法で解析すると、Lypd8が会合する細菌群には会合しない細菌群と比較して、大腸菌群などの有鞭毛細菌が有意に多く含まれることが明らかとなり、Lypd8は腸管内で優先的に有鞭毛細菌に会合することが示された。

次に純培養した有鞭毛細菌である*P. mirabilis*にLypd8タンパク質を反応させ、走査型電子顕微鏡を用いてLypd8の結合を解析すると、Lypd8は*P. mirabilis*の鞭毛に結合することがわかり、分離した鞭毛とLypd8タンパク質との反応においてもELISA法にてLypd8と鞭毛との結合が確認された。

さらにLypd8を含んだ軟寒天培地において大腸菌、*P. mirabilis*の運動性を評価したところ、コントロール群と比

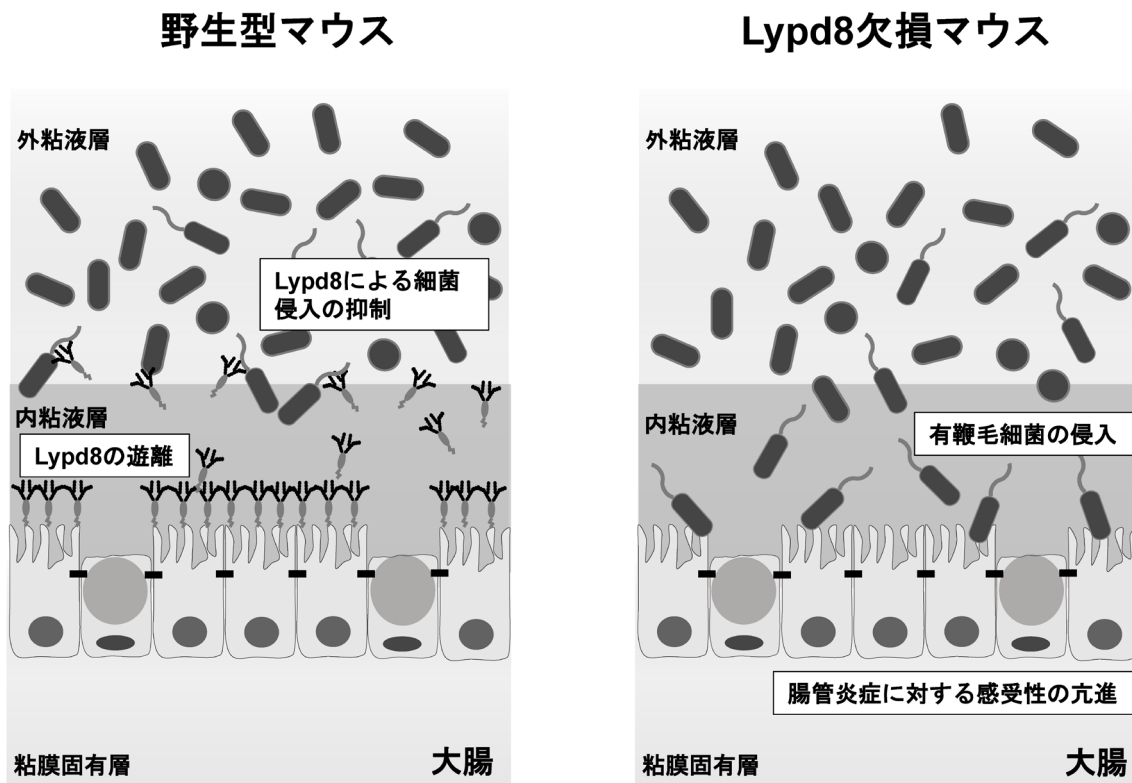


図2 Lypd8の機能とLypd8欠損マウスの表現型

較して有意に運動性が抑制された。以上の解析結果より、大腸上皮に高発現しているLypd8は、恒常的に大腸管腔内に分泌され、大腸菌やプロテウス属菌などの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侵入を防止していることが示された⁶⁾。

4. 粘膜バリアの破綻と腸管炎症

これまで述べてきたように、粘膜バリアは腸内細菌と腸管上皮を分け隔て、宿主の腸内細菌に対する過剰な免疫応答を回避するのに重要である。そのため、遺伝的要因などにより粘膜バリアに異常を来すと、腸内細菌と腸管上皮とが空間的に近接し、腸内細菌に対する免疫応答が起りやすくなる。免疫応答が強く起こると、その結果として腸管炎症が発症する。

それを示す根拠として、粘膜バリア異常を来すいくつかの遺伝子改変マウスで、腸炎を自然発症するもしくは腸管炎症に対する感受性が亢進することが近年報告されている。まず腸管において粘液を構成するムチンであるMuc2の欠損マウスにおいては、内粘液層が形成されず、腸内細菌の大腸粘膜への侵入とそれによる大腸炎が認められる^{1,7)}。さらに、ムチンのO型糖鎖修飾に必須であるcore 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyl-transferase 1 (C1galt1)が欠損すると、Muc2欠損マウスと

同様に内粘液層が形成されず、腸管炎症が発症する⁸⁾。前述のLypd8欠損マウスで大腸上皮への侵入が認められる*P. mirabilis*や大腸菌はこれまで腸管炎症との関連が報告されている細菌であり、そのためLypd8欠損マウスはSPF環境下においては腸炎を自然発症しないものの、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) によって誘導される実験的腸炎モデルに対する感受性の著明な亢進が認められる⁶⁾。

また化学的バリアの異常でもまた腸管炎症に対する感受性が亢進することが知られている。腸管上皮からの抗菌ペプチドの産生が低下する腸管上皮特異的MyD88欠損マウスやIL-22欠損マウスでは、前述のDSSによる実験的腸炎が重症化し、腸管炎症に対する感受性の亢進が認められる⁹⁻¹¹⁾。ゲノムワイド関連解析により炎症性腸疾患の疾患感受性遺伝子として同定されているNOD2の欠損マウスでは、パネート細胞からの抗菌ペプチドの産生が低下し、*Helicobacter hepaticus*感染により、クローン病様の腸管炎症を発症することが知られている¹²⁻¹⁴⁾。

さらに粘膜バリアの異常は、dysbiosisと呼ばれる腸内細菌叢の乱れをもたらすことが明らかとなっており、そのdysbiosisによって腸管炎症に対する感受性が亢進することが近年報告されている。その一例として、Nod-like receptorファミリーの一つであるNLRP6の欠損マウスでは杯細胞からの粘液放出が障害され、内粘液層が十分に形成されず、それに伴ってdysbiosisが起こり、DSSによる実験的腸

炎に対する感受性の亢進が認められる¹⁵⁾。さらに興味深いことに dysbiosis を起こす NLRP6 欠損マウスと野生型マウスを同じケージで飼育すると、その dysbiosis が野生型マウスに伝播し、腸管炎症に対する感受性が亢進することが示された¹⁵⁾。また近年、dysbiosis は炎症性腸疾患に限らず、リウマチ関節、多発性硬化症などの自己免疫疾患、肥満症や糖尿病といった生活習慣病などの発症、増悪に関連することが明らかとなっている。こういったことから粘膜バリアは腸内細菌を制御することで、腸管炎症の防止に貢献しているのみならず、全身の免疫系ならびに代謝系の恒常性維持にも貢献していることが示唆されている。

5. おわりに

本稿では、我々が最近明らかにした Lypd8 分子の機能を中心に、粘膜バリアによる腸内細菌と腸管上皮が分け隔てられるメカニズムと粘膜バリアの破綻によって誘導される腸管炎症について概説した。近年日本において、患者数が増加傾向である炎症性腸疾患は、腸内細菌を中心とする腸内環境の異常と遺伝的な要因による粘膜バリアや免疫系の異常が相まって発症する疾患であるが、現在その治療に関しては、薬剤による過剰な免疫応答の抑制が中心であり、粘膜バリアをターゲットとした治療に関しては皆無である。そのため、腸管における粘膜バリア機構をさらに明らかにすることで、炎症性腸疾患のさらなる病態の解明と粘膜バリアをターゲットとする新たな炎症性腸疾患の治療の開発が期待される。

文 献

- Johansson, M.E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., & Hansson, G.C. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 15064–15069.
- Maynard, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D., & Weaver, C.T. (2012) *Nature*, **489**, 231–241.
- Rodriguez-Pineiro, A.M., Bergstrom, J.H., Ermund, A., Gustafsson, J.K., Schutte, A., Johansson, M.E., & Hansson, G.C. (2013) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **305**, G348–G356.
- Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., & Ouellette, A.J. (2000) *Nat. Immunol.*, **1**, 113–118.
- Vaishnava, S., Yamamoto, M., Severson, K.M., Ruhn, K.A., Yu, X., Koren, O., Ley, R., Wakeland, E.K., & Hooper, L.V. (2011) *Science*, **334**, 255–258.
- Okumura, R., Kurakawa, T., Nakano, T., Kayama, H., Kinoshita, M., Motooka, D., Gotoh, K., Kimura, T., Kamiyama, N., Kusu, T., Ueda, Y., Wu, H., Iijima, H., Barman, S., Osawa, H., Matsuno, H., Nishimura, J., Ohba, Y., Nakamura, S., Iida, T., Yamamoto, M., Umemoto, E., Sano, K., & Takeda, K. (2016) *Nature*, **532**, 117–121.
- Van der Sluis, M., De Koning, B.A., De Bruijn, A.C., Velcich, A., Meijerink, J.P., Van Goudoever, J.B., Buller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I.B., & Einerhand, A.W. (2006) *Gastroenterology*, **131**, 117–129.
- Fu, J., Wei, B., Wen, T., Johansson, M.E., Liu, X., Bradford, E., Thomsson, K.A., McGee, S., Mansour, L., Tong, M., McDaniel, J.M., Sferra, T.J., Turner, J.R., Chen, H., Hansson, G.C., Braun, J., & Xia, L. (2011) *J. Clin. Invest.*, **121**, 1657–1666.
- Frantz, A.L., Rogier, E.W., Weber, C.R., Shen, L., Cohen, D.A., Fenton, L.A., Bruno, M.E., & Kaetzel, C.S. (2012) *Mucosal Immunol.*, **5**, 501–512.
- Bhinder, G., Stahl, M., Sham, H.P., Crowley, S.M., Morampudi, V., Dalwadi, U., Ma, C., Jacobson, K., & Vallance, B.A. (2014) *Infect. Immun.*, **82**, 3753–3763.
- Zenewicz, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Stevens, S., & Flavell, R.A. (2008) *Immunity*, **29**, 947–957.
- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., & Thomas, G. (2001) *Nature*, **411**, 599–603.
- Biswas, A., Liu, Y.J., Hao, L., Mizoguchi, A., Salzman, N.H., Bevins, C.L., & Kobayashi, K.S. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 14739–14744.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nunez, G., & Cho, J.H. (2001) *Nature*, **411**, 603–606.
- Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., & Flavell, R.A. (2011) *Cell*, **145**, 745–757.

著者寸描

●奥村 龍 (おくむら りゅう)

大阪大学大学院医学系研究科免疫制御学助教。医学博士。

■略歴 2005年和歌山県立医科大学医学部卒業。臨床研修医、小児科専門医研修を経て、10年大阪大学大学院医学系研究科博士課程に進学。免疫制御学教室にて学位取得後、16年4月より現職。

■研究テーマと抱負 現在の研究テーマは大腸粘膜バリア機構の解明と粘膜バリアをターゲットとした潰瘍性大腸炎の治療への応用。将来の抱負は、免疫学研究からの小児医療への貢献。

■ウェブサイト <http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/ongene/>

■趣味 音楽・映画鑑賞。