

バクテリアルトランスロケーションの抑制に関わる腸内細菌の探索

Screening of commensal bacteria species for the regulation of bacterial translocation

所属機関：千葉大学 代表研究者氏名：倉島 洋介

研究期間：2022年4月23日～2022年12月22日

滞在研究機関：University of California San Diego, School of Medicine-Department of Pathology, CA 92093, United States

共同研究者等：Peter B. Ernst

Gut microbial imbalance, called “dysbiosis”, is associated with the development of intestinal inflammatory milieu in inflammatory bowel diseases. In addition, defects in intestinal mucosal barrier function induce increase in intestinal permeability and bacterial translocation, which is the penetration of commensal bacterial from the intestinal lumen to various ex-intestinal organs.

We have previously reported that the exocrine gland of the pancreas, consisting of pancreatic acinar cells, expresses a glycoprotein called Glycoprotein 2, or GP2. GP2 accounts for 15 to 30 percent of the granular membranous protein in acinar cells and released to the intestinal lumen via pancreatic ducts. GP2 bound to type I pili on the surface membrane of bacteria, which utilize the pili for adhesion to the intestinal epithelial cells. The mice lacking GP2 shows more bacterial translocation and severe intestinal inflammation. Thus, the pancreas performs important role in intestinal defense against bacterial translocation. However, the molecular machinery of GP2 expression and secretion has not been well elucidated. In this study, we aim to uncover the mechanism of GP2 release, regulated by commensal bacterial stimulation and found the possible involvement of bacterial metabolites. We also evaluate the commensal bacteria species which regulates GP2 release and potentially regulates bacterial translocation.

研究目的

クローン病と潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患では、腸管運動の破綻によって腸管内容物の滞留が生じ、腸内細菌叢の構成の変化や局所的な常在菌の爆発的な増殖という *dysbiosis* が起こる。腸内細菌の変化に加えて、腸管バリア機能が低下することで生きた腸内細菌が腸管内から粘膜組織、リンパ節、他の臓器へと移行・感染する「バクテリアルトランスロケーション」と呼ばれる現象が起こる^{1,2}。一方、食物消化の過程では、膵臓から十二指腸内への膵液分泌による腸管での食物消化促進が重要な役割を持つ。この外分泌機能を担う膵臓の腺房細胞の分泌顆粒には、Glycoprotein2 (GP2)と呼ばれる糖タンパクが多く含まれる。GP2はアミラーゼなどの消化酵素が含まれる顆粒の顆粒膜タンパク質のうち、

15-30%を占めるといわれており、膵臓より産生されたのちに大量に腸管腔へと分泌される³。

腸管の GP2 と腸内細菌の局在の観察をすると、GP2 が腸内細菌と結合し凝集している様子が腸管腔内で見られ、GP2 は大腸菌をはじめとする腸内細菌の線毛と呼ばれる上皮細胞への接着に必要な部位 (アドヘシン) に結合し、菌のバクテリアルトランスロケーションを抑えていることが我々の研究から明らかとなっている⁴。全身もしくは膵臓特異的に GP2 を欠損させたマウスでは、バクテリアルトランスロケーションが野生型マウスに比較して起こりやすく、腸炎が重症化することが示された。膵臓が外分泌を介して細菌感染から体を守る粘膜の第一線のバリアとして働いていることが示された。バクテリアルトランスロケーションは多臓器不

全を引き起こすことから、GP2 分泌による生体防御機構の解明や増強法の確立は、腸炎のみならずバクテリアルトランスロケーションによって悪化する様々な疾患に対する予防法や治療法への応用につながると考えられる。そこで我々は、膵臓からの GP2 の分泌に着目し、マウスの膵液中及び腸管内容物中の GP2 量を定量したところ、腸内細菌由来の何らかの因子が GP2 産生に関わっていることが示唆された。

本研究では、カリフォルニア大学サンディエゴ校（以下 UCSD）の研究グループとの共同研究により、GP2 の産生・分泌を司る腸内細菌シグナルの同定を目指した。マウス腸内環境に対して、栄養や細菌叢への様々な介入を試みることで、腸内環境の変化をもたらす膵臓 GP2 産生・分泌への影響を精査した。さらに GP2 産生に関与する細菌群や、栄養素、代謝物についても探索を進め、GP2 の産生促進を介したバクテリアルトランスロケーションによる多臓器不全を防ぐ新たな方法の確立を目指した。

研究経過

本研究計画では、低栄養素餌や種々の抗生物質によってマウス腸内環境に対して介入し、これらをもたらす膵臓 GP2 分泌への影響を精査した。膵臓から分泌された GP2 については、糞便並びに膵液の ELISA によって測定した。また、腸内細菌叢については 16SrRNA 菌叢解析を実施し、GP2 の産生に関与する腸内細菌の有無についても解析を進めた。

GP2 産生に関わる細菌群の絞り込みと同時に、候補として挙げられた細菌由来の代謝物については、マウスへの投与実験によってその関与を明らかにした。また、GP2 の遺伝子、タンパク発現、安定性、細胞内顆粒移行、顆粒放出について、遺伝子発現並びにタンパク発現の測定を進めた。さらに、マウスから膵臓のオルガノイドを作製し、*in vitro* での評価系の構築を図った。

考察

膵臓からの GP2 分泌を介した生体防御機構の解明

並びに増強法の確立は、腸炎のみならずバクテリアルトランスロケーションによって悪化する様々な疾患に対する予防につながる⁵。本研究では、栄養素や腸内細菌叢をもたらす膵臓機能への影響という観点から、様々な介入法を検討し、膵臓機能への影響を調べた。その結果、腸内環境が膵臓機能に影響を与えることが見いだされ、腸膵連関による生体防御機構の一端が示された。特に、腸膵連関に関わる代謝物については、多臓器不全に関わるバクテリアルトランスロケーションに対する新たな制御法の確立につながる可能性が示唆された。

参考文献

1. Vieira M et al., Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans. *Science* 2018. 359: 1156-1161.
2. Nakamoto N et al., Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis. *Nat Microbiol* 2019. 4: 492-503.
3. Fukuoka S, Freedman SD, Scheele GA. A single gene encodes membrane-bound and free forms of GP-2, the major glycoprotein in pancreatic secretory (zymogen) granule membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 88 :2898-902.
4. Kurashima Y et al., Pancreatic glycoprotein 2 is a first line of defense for mucosal protection in intestinal inflammation. *Nat Commun* 2021. 12: 1067.
5. Zhang Z., Tanaka I., Pan Z., Ernst P.B., Kiyono H., Kurashima Y. Intestinal homeostasis and inflammation: Gut microbiota at the crossroads of pancreas-intestinal barrier axis. *Eur J Immunol*. 2022 52 :1035-1046.

研究の発表

誌上発表

1. Zhang Z., Tanaka I., Pan Z., Ernst P.B., Kiyono H., Kurashima Y. Intestinal homeostasis and inflammation: Gut microbiota at the crossroads of

- pancreas-intestinal barrier axis. *Eur J Immunol.* 2022
52 :1035-1046. doi:10.1002/eji.20214953.2022.
2. Kamioka M., Goto Y., Nakamura K., Yokoi Y., Sugimoto R., Ohira S., Kurashima Y., Umemoto S., Sato S., Kunisawa J., Takahashi Y., Domino S.E., Renauld J.C., Nakae S., Iwakura Y., Ernst P.B., Ayabe T., Kiyono H.. Intestinal commensal microbiota and cytokines regulate Fut2⁺ Paneth cells for gut defense. *Proc Natl Acad Sci USA.* 18:19(3):e2115230119. doi: 10.1073/pnas.2115230119. 2022.
 3. Kurashima Y et al., Intestinal Mucosal Defense and Diseases: A Prospective Review of the Pancreatic-Gut Axis. *Chiba Medical Journal in press*
 4. 田中 和, 潘 臻, 倉島 洋介, 清野 宏. 膵臓 Glycoprotein2 による恒常性維持と腸炎回避機構 *臨床免疫・アレルギー科.* 77 (2):198-204. 2022. 科学評論社
 5. 倉島洋介.腸内細菌の制御を担う膵臓の役割. *胆と膵.* 44 (3). 229-234.2023. 医学図書出版
 6. 倉島洋介, 清野宏. マイクロバイオーームと膵腸 関連. *肝胆膵.* 86 (3): 369-376. 2023. アークメディア