

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 腸管上皮細胞の糖鎖を介した腸内微生物叢制御機構の解明
(英語) Regulation of gut micro- and mycobiota mediated by intestinal epithelial glycosylation

研究開発担当者 (日本語) 千葉大学真菌医学研究センター感染免疫分野微生物・
免疫制御プロジェクト 准教授 後藤 義幸

所属 役職 氏名： (英語) Project for Host-Microbial Interactions in Symbiosis and Pathogenesis,
Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center,
Chiba University, Associate Professor, Yoshiyuki Goto

実施期間： 平成 28年 10月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語)
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

腸管各部位における腸内細菌・真菌叢の解析

平成 28年度は、腸管上皮細胞の α 1, 2-フコースの腸内細菌叢に対する影響を調べるために、野生型および Fut2 欠損マウスの十二指腸、回腸、盲腸、大腸および糞便を採取した。さらに、上皮細胞の α 1, 2-フコースの発現が減弱する抗生物質 (アンピシリン) 処理マウスを用いて糞便中の腸内細菌叢を次世代シーケンサーにて解析し、特定の腸内細菌叢の変化を観察した。腸管上皮細胞の α 1, 2-フコースの腸内細菌叢への影響を解析するために、平成 28年度は Fut2 欠損マウスにくわえて、上

皮細胞特異的に Fut2 を恒常的に発現した遺伝子改変マウスの作製を進めた。Fut2 遺伝子発現用のベクターを構築して直鎖にした後に、マイクロインジェクション法を用いて受精卵に導入した。生まれてきたマウスを PCR 法にてスクリーニングを行い、3 系統のマウスにベクターの挿入が観察された。これらのマウスの腸管上皮細胞における α 1, 2-フコースの発現量を解析したところ、野生型マウスでは発現が観察されない十二指腸部位でもほとんどの上皮細胞が恒常的に α 1, 2-フコースを発現しており、その発現は回腸部位と同レベルであった。現在、野生型、Fut2 欠損および Fut2 遺伝子発現マウスの腸管各部位における腸内細菌叢の解析を進めている。

腸内細菌の中には偏性嫌気性細菌が多く、嫌気環境下でないと生育できないものがほとんどである。将来的に腸内細菌を用いた疾患の治療法を検討するためには腸内細菌の嫌気培養法を確立し、有用な細菌を分離することが必要となる。平成 28 年度は、腸内細菌の培養を試みるために、嫌気培養装置を導入して様々な培地を使用して、腸内細菌の分離を開始した。現在までに、Reinforced Clostridium Medium を中心に 201 株の細菌を分離、保存している。

マウスにおける腸内真菌叢の解析を行うために、平成 28 年度は真菌特異的な DNA 配列である internal transcribed spacers (ITS)配列を用いたシーケンス解析、定量的 PCR 法の確立を目標とし、これまでに真菌の一種である *Candida albicans* を経口投与したマウスの糞便中に含まれる真菌 DNA の抽出法の検討を行った。その結果、ビーズを用いた FastPrep による細胞破碎と DNA 抽出キットを組み合わせた方法が、最も効率良く真菌 DNA を回収できることを見出した。さらに、野生型およびアンピシリン処理マウスの糞便中に含まれる腸内真菌について解析した結果、アンピシリン処理マウスにおいて腸内細菌の減少とともに腸内真菌の増加を確認している。アンピシリン処理マウスの糞便を採取し、培養法を用いて真菌を単離したところ、二種類の真菌を単離し、これらの真菌が飲水を介して腸内へ定着することも明らかとした。

腸管上皮細胞の α 1,2-フコースと I 型糖尿病、炎症性腸疾患との関わりについて

ヒトにおいて、FUT2 遺伝子の不活性型変異多型は、I 型糖尿病ならびにクローン病の原因遺伝子の一つであり、本研究では I 型糖尿病ならびに炎症性腸疾患の発症における Fut2 遺伝子の役割を明らかにする。平成 28 年度は、I 型糖尿病と Fut2 の関係性を明らかにすることを目的として、Fut2 欠損マウスの遺伝的背景を I 型糖尿病モデルマウスである NOD にするために戻し交配を開始している。また、炎症性腸疾患のモデルマウスである IL-10 欠損マウスを導入し、Fut2 欠損マウスと交配させることで IL-10、Fut2 二重欠損マウスを作製している。

Analysis of site-specific bacterial and fungal population in the intestine

In this year, luminal contents of duodenum, ileum, cecum, large intestine and faeces of wild-type and Fut2-deficient mice were collected for analyzing the role of intestinal epithelial α 1, 2-fucose on gut microbiota. Next, we examined fecal microbiota of antibiotics, especially ampicillin-treated mice whose expression of epithelial α 1, 2-fucose was attenuated by using next generation sequencer and found a change of specific bacterial population. In order to analyze the role of epithelial α 1, 2-fucose on gut microflora, we developed genetically modified mice which constitutively expressed Fut2 specifically in epithelial cells. We constructed a vector for Fut2 expression, linearized, and then introduced into a fertilized egg using the microinjection method. The transgenic mice were screened by PCR method, and insertion of vector sequences was observed in three mice. We analyzed the

expression level of α 1, 2-fucose in the intestinal epithelial cells of these mice. Most of the epithelial cells in the duodenum site where expression is not observed in the wild-type mice constantly express α 1, 2-fucose. Its expression level was comparable to the ileal epithelial cells. We are currently analyzing gut microflora residing in each intestinal tract of wild-type, Fut2-deficient, and Fut2 gene expressing mice.

Most commensals are obligate anaerobic bacteria and are difficult to grow unless they are cultivated under anaerobic condition. In order to develop novel therapeutic approaches using commensal bacteria in the future, it is necessary to establish anaerobic culture method for isolating useful commensal bacteria. In this year, we started culture of commensal bacteria by introducing an anaerobic chamber with various media. So far, we isolated and preserved the 201 strains of bacteria using Reinforced Clostridium Medium.

In order to analyze commensal fungi in mice, we aim to establish sequencing analysis and quantitative PCR method using internal transcribed spacers (ITS) sequences which are specific for fungi. In this year, we developed the extraction method of fungal DNA from feces of mice orally administered a kind of fungi, *Candida albicans*. As a result, we found that the combination of Fast Prep using beads and DNA extraction kit could most efficiently isolate fungal DNA. We next analyzed fecal commensal fungi of wild-type and ampicillin-treated mice. We confirmed an increase in commensal fungi in ampicillin-treated mice and reduction of gut microbiota. We collected feces from ampicillin-treated mice and isolated fungi using the culture method. Two strain of gut fungi observed in drinking water as well were isolated.

Relationship between intestinal epithelial α 1,2-fucose and type I diabetes and inflammatory bowel disease (IBD)

In humans, nonsense polymorphism of FUT2 gene is responsible for the development of type I diabetes and Crohn's disease. In this study, we reveal the role of Fut2 gene on the regulation of type I diabetes and IBD. In this year, we started backcross of Fut2-deficient mice into NOD background mice which are type I diabetes model for clarifying the relationship between type I diabetes and Fut2 gene. IL-10-deficient mice, which are model of IBD, are started to cross with Fut2-deficient mice to establish IL-10/Fut2 double-deficient mice.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 1件）

後藤 義幸、SFB による免疫細胞を介した腸管バリア形成機構の解明. 腸内細菌学雑誌. 2016, 30, 159-163,

Goto Y, Uematsu S, Kiyono H. Epithelial glycosylation in gut homeostasis and inflammation. Nature Immunology. 2016, 17, 1244-1251

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Commensal bacteria and ILC3 regulate intestinal homeostasis, oral presentation, Yoshiyuki Goto, American Association of Immunologist annual meeting 2016, 2016/5/17, 国外
2. 腸内細菌による免疫細胞を介した腸管バリア形成機構の解明, 口頭, 後藤 義幸, 第 20 回腸内細菌学会, 2016/6/9, 国内
3. 腸内細菌と 3 型自然リンパ球による腸管上皮細胞の糖鎖修飾制御, 口頭, 後藤 義幸, 国立長寿医療研究センターNCGG セミナー, 2016/6/23, 国内
4. Commensal bacteria and ILC3 regulate intestinal homeostasis, poster presentation, Yoshiyuki Goto, Institute for global prominent research kickoff symposium, 2016/10/09, 国内
5. 免疫細胞による腸管上皮糖鎖修飾の誘導と制御, 口頭, 後藤 義幸, GlycoImmunology 2017 糖鎖免疫, 2017/1/25, 国内
6. 腸内細菌と免疫細胞による共生と排除のメカニズム, 口頭, 後藤 義幸, 第 31 回バイオテクノロジー懇談会, 2017/2/23, 国内
7. 腸管上皮細胞の $\alpha 1, 2$ -フコシル化は免疫細胞によって調節される, 口頭, 後藤 義幸, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017/3/19, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. アメリカ留学を終えて, 後藤 義幸, UJA&JSPS 共催 研究留学推進セミナー, 2016/07/02, 国内

(4) 特許出願