

Title	Segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia by Lypd8
Author(s)	奥村, 龍
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59551">https://hdl.handle.net/11094/59551</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨  
Synopsis of Thesis

氏名 Name	奥村 龍
論文題名 Title	Segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia by Lypd8 (Lypd8は鞭毛細菌と大腸上皮を分け隔てる)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>近年、潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患の患者数は国内で増加の一途をたどっているが、現段階で根治的治療といえるものは存在せず、発病メカニズムの解明が急務となっている。最近の研究により、炎症性腸疾患の発病原因の一つとして、粘液層や抗菌ペプチドなどの腸管上皮バリア機能の破綻が指摘されている。他の臓器と異なり、特に夥しい数の微生物や食物などの外界異物が存在する腸管においては、腸管上皮バリアによってそれらと腸管組織を隔離することは過剰な免疫応答を回避し、炎症を制御する上で重要とされている。小腸と比較して多数の腸内細菌が存在する大腸においては、腸管上皮バリアの一つである粘液層は分厚く、外粘液層と内粘液層の二つの層に分けられることが知られている。腸内細菌は外粘液層に存在し、内粘液層はほぼ無菌状態に保たれている。腸炎を自然発症するモデルマウスにおいては、内粘液層へ数多くの細菌の侵入が認められることから、内粘液層によって腸内細菌と腸管上皮を分け隔てることは炎症の制御に重要であると考えられている。しかし、大腸において内粘液層が無菌に保たれるメカニズムがこれまで十分に解明されてこなかった。そのメカニズムを解明するため、まず私たちは大腸上皮に特異的に高発現する遺伝子をデータベース、マイクロアレイデータ、リアルタイムPCRによって探索し、<i>Ly6/Plaur domain containing 8 (Lypd8)</i> という遺伝子が大腸上皮で特異的に高発現していることを発見した。Lypd8分子はGPIアンカー型膜タンパク質で、高度にN型糖鎖修飾される分子であり機能未知であることから、ノックアウトマウスを作製し、その生理機能を解析することにした。</p>	
<p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>最初に抗Lypd8抗体を用いた免疫染色で大腸におけるLypd8の発現パターンを調べたところ、Lypd8は大腸腺組織の最表層の上皮細胞の管腔側に発現し、大腸管腔に恒常的に分泌されていることがわかった。次にLypd8ノックアウト(KO)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は夥しい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に多数の細菌が存在していた。さらにLypd8 KOマウスの大腸組織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、またLypd8 KOマウスの大腸組織のホモジェネートを培養すると<i>Proteus mirabilis</i>というプロテウス属の細菌が有意に多く検出された。<i>P. mirabilis</i>は腸管炎症との関連が報告されている細菌であるため、Lypd8 KOマウスにDextran sulfate sodium (DSS) 腸炎を誘導し、体重減少、生存率を解析したところ、Lypd8 KOマウスは野生型マウスと比較し有意にDSS腸炎が重症化することがわかり、また抗生剤内服により有鞭毛細菌を排除するとLypd8 KOマウスのDSS腸炎に対する感受性が低下した。このことからLypd8は鞭毛細菌の上皮への侵入を抑制し、腸管炎症を制御していることが示唆された。次にLypd8が腸内細菌に結合するかを、フローサイトメトリーを用いて調べたところ、Lypd8は糞便中の細菌の一部に結合していることが明らかとなった。Lypd8が結合する細菌を解析すると、大腸菌群などの有鞭毛細菌が有意に多く検出された。また純培養した<i>P. mirabilis</i>にLypd8蛋白を反応させ、走査型電子顕微鏡を用いてLypd8の結合を解析すると、Lypd8は<i>P. mirabilis</i>の鞭毛に結合することがわかり、分離した鞭毛とLypd8蛋白との反応においてもELISA法にてLypd8と鞭毛との結合が観察された。さらにLypd8を含んだ軟寒天培地において大腸菌、<i>P. mirabilis</i>の運動性を評価したところ、コントロール群と比較して有意に運動性が抑制された。以上の結果より、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、腸管炎症を制御していることが示された。</p>	
<p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>Lypd8は大腸上皮細胞に特異的に高発現するGPIアンカー型蛋白質であり、恒常的に大腸管腔に分泌され、鞭毛細菌の鞭毛に優先的に結合することでそれらの大腸上皮への侵入を抑制し、腸管炎症を制御していることが示された。</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 奥村 龍	
論文審査担当者	(職) 氏 名 主 査 大阪大学教授 竹田 潔
	副 査 大阪大学教授 熊ノ御 淳
	副 査 大阪大学教授 朝野 和典

## 論文審査の結果の要旨

夥しい数の腸内細菌が存在する大腸の上皮は、内粘液層と外粘液層により構成される厚い粘膜層によって覆われており、内粘液層により腸内細菌と腸管上皮が分け隔てられている。しかしながら、どのような機序で腸内細菌と大腸上皮が分け隔てられるかは不明であった。本論文では、大腸上皮に特異的に発現するLypd8というGPIアンカー型蛋白質が腸内細菌の鞭毛に結合し、有鞭毛細菌の大腸組織への侵入を防いでいるという新たなメカニズムが示され、またこのLypd8分子の欠損により、腸管炎症に対する感受性が亢進することが明らかとなった。さらに潰瘍性大腸炎の患者では、Lypd8の発現が激減していることも明らかとなり、今後、Lypd8の発現を回復させるなどで腸内細菌と大腸上皮を分け隔てる方法を開発することにより、潰瘍性大腸炎の新規治療薬の開発が期待される。よって本論文の成果は学位の授与に値すると考える。