研　究　報　告　書
令和５年度：Ａ課題

2025 年 4 月 18 日

公益財団法人　がん研究振興財団

理事長　　堀　田　知　光　　殿

研究施設　岡山大学 消化器肝臓内科学

住　　所　岡山市北区鹿田町 2-5-1

研究者氏名　　大塚 基之

(研究課題)
血中を循環する腸管細菌由来の膜小胞の解析による胆管癌発症機構の解明

令和６年　１月　29 日付助成金交付のあった標記Ａ課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

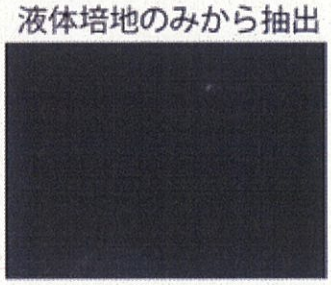
【研究背景・目的】

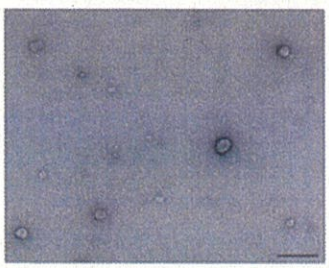
近年、腸疾患以外の様々な全身性の疾患も腸内細菌と関連があると言われている。しかしその背景にあるはずの分子生物学的な根拠の理解は十分とはいいがたい。本研究では、腸内細菌がもたらす腸管外疾患の病態生理について、細菌由来の膜小胞を「細菌が使う飛び道具」と捉えて検討する。腸内細菌に限らず、細菌は、真核細胞が放出する細胞外小胞と同様に、膜小胞を自身の菌体から放出している。腸内細菌に由来する膜小胞がもし腸上皮を通り抜け血液中に出ていくとしたら、それらが腸管内での病態だけでなく腸管外の病態を形成していることも説明可能と思われる。そこで、腸内細菌由来の膜小胞の腸管外透過という事象とそれによって惹起される現象を検討し、もって腸内細菌と腸管外疾患、特に腸管から流れる門脈血の影響を直接受ける胆管病変、特に胆管癌との関連を分子的に説明できれば、ということを最終的な目的として検討した。

【実験方法・結果】

① 腸内細菌由来の膜小胞の単離・精製

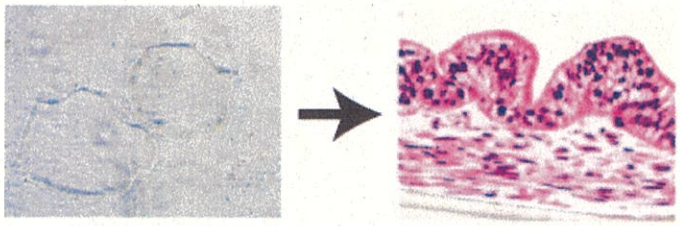
胆管癌患者の腸内細菌メタゲノム解析をした研究で、胆管癌患者では4つの菌種(*Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcaceae*, and *Alloscardovia*)がコントロールに比べて多いという研究が報告されていたため（Jia et al. Hepatology 2020）、このうちのActinomnycesに着目し、この菌体からの膜小胞の放出があるかを検討した。A.odontolyticusのMVsについての既報はないが、MVsはグラム陽性菌、グラム陰性菌をはじめとする全ての細菌から分泌されていると想定されていたため、A.odontolyticusもMVsを産生し、その後の病態に関連しているのではないかと考えた。A.odontolyticusを培養し、濃縮した上清成分からサイズ除去クロマトグラフィー法で膜小胞液を抽出した。その結果、液体培地のみからは粒子は認識されず、いっぽうで、菌体培養上清から抽出した溶液からは、ブラウン運動をする粒子の存在が確認された（右図：白い点がMVs）。この結果から、A.odontolyticusはMVsを産生していることが示された(左図 電顕写真)。この結果から、A.odontolyticusが放出するMVsがあることが示された。





② 腸管上皮透過性の検討

腸内細菌が産生したMVが腸管上皮を通過して基底側に透過することがあるのかどうか、を検討するため、in vitroでヒトiPS細胞から腸管上皮を模倣したAir-liquid interface model を作成した。ヒト大腸幹細胞を用いて「気相—液相境界面培養」による腸管上皮構成細胞の分化誘導によるヒト腸管上皮組織の3次元構築を行う。この系においては、最近よく用いられているオルガノイドとは異なり、管腔側と基底膜側の極性を持った組織が構築される。本研究内では、この3次元再構築を確立することで、極性をもった腸管上皮モデルを作成することができた（右図）。



ヒトiPS細胞から分化させてできた腸管上皮組織
（腸管上皮細胞、基底膜、間質細胞が極性を持って分化誘導できている）

③ 腸管上皮内の極性をもった小胞の分泌

腸内細菌の膜小胞の腸上皮透過性を検討するにあたり、まず腸上皮内で産生される細胞外小胞が極性を持って細胞内を移動し、極性をもって放出される者かを検討した。そのために代表的な細胞外小胞マーカーであるCD63とCD9を染色したところ、CD63は管腔側に強く染まる（右図：茶色）のに対して、CD9は基底側に染まることが多く、産生された細胞外小胞は腸管上皮内で極性を持って移動していることが示唆された。

④ 腸内細菌由来の膜小胞の腸管上皮の透過

1. 上記の3次元腸管上皮モデルで管腔側からラベルした腸内細菌由来の膜小胞を添加したところ、腸上皮細胞に取り込まれた後に、一部は基底側に異動していく様子が捉えられた。現在この再現性を確認しているところであるが、胆管癌で増加している腸内細菌であるアクチノマイセス由来の膜小胞の少なくとも一部は腸管上皮を通過して基底膜側に分泌されることが示唆された (Otsuka M et al. ***Cell Mol Gastroenterol Hepatol.*** 2024:745.)。

)。

【考察・展望】

本研究で得られた結果は、腸内細菌由来の膜小胞が、腸管上皮を通過してヒト体内に入り込む可能性を示唆する。結腸内でこのような事象が起きた場合、循環動態に入り込んだ膜小胞は解剖学的に門脈血中に入り込むこと想定されるため、このまま肝内へと移送されることが想定される。肝内で門脈と胆管は伴走するため、移送された膜小胞が胆管病変を惹起する可能性は十分考えられる。しかし、現時点では、なぜ門脈に入り込んだ腸内細菌由来の膜小胞が肝実質細胞や門脈血管自体ではなく、近傍の胆管上皮に作用するのか、作用するとしたらそれは直接浸潤なのか、間接的な影響なのか、については、明らかにするべきこととして残っている。このような残された課題は或るものの、腸内細菌由来の膜小胞が肝内に移送される可能性は、これまでの腸内細菌を中心とした臓器連関を説明する因子として重要な可能性があり、今後さらに検討を進めることで、腸内細菌と胆管病変の連関や病態解析に資するものと思われる。

【成果発表】

Miyakawa Y, Yasugi K, Takaki A, Matsumoto K, **Otsuka M**, Cholecystectomy Is Linked to Worse Clinical Outcomes in Primary Sclerosing Cholangitis ***Cureus*** in press.

【謝辞】

本研究にご支援いただいた公益財団法人がん研究振興財団に厚く御礼申し上げます。本研究を進めるうえで同財団の御支援は必要不可欠でした。ありがとうございました。