

令和元年6月19日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08471

研究課題名(和文)常在細菌叢の病原性細菌排除機構解明のためのオミクス解析

研究課題名(英文) Omics analysis for elucidation of pathogenic bacterial clearance mechanism of resident bacterial flora

研究代表者

大崎 敬子 (OSAKI, Takako)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：90255406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：常在細菌叢の役割として、外来病原細菌の感染を阻害する作用が知られている。ヒトの胃に慢性持続感染する *Helicobacter pylori* を外来病原細菌として、動物実験および培養系で常在細菌叢の役割を解析した。同一家族から分離され遺伝子型の異なる複数の菌株を感染させた動物では、感染順によらずほとんどの実験群において1菌株が最優勢で持続感染した。他の細菌の存在しない *H. pylori* のみの連続流動培養では、2菌株は互いの比率を変えずに共存した。*H. pylori* は感染成立時に動物の胃内最優勢菌の占有比率を減らして細菌叢を大きく攪乱するが、長期感染後には元の細菌叢が戻り、両者の拮抗が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

常在細菌叢の役割の解析は古くから検討されてきたテーマであるが、メタゲノム解析、トランスクリプトーム解析、メタボローム解析などの手法を組み合わせたオミクス解析によってさらに大きな発見が期待される。本研究はその一端として、メタゲノム解析から常在細菌叢と外来病原細菌の拮抗現象を示すことができた。また *Helicobacter pylori* 感染症の、家族内感染1例について動物実験モデルを使って検証することができ、今後の感染予防に役立つ成果の一つと考える。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to determine the impact of *H. pylori* infection to gastrointestinal microbiota. Several *H. pylori* strains isolated from family members were used to compare infectivity in Mongolian gerbils and growth in continuous flow culture. Most of the colonies isolated from the stomachs of Mongolian gerbils were determined as the same molecular type of dominant strain in all of the four grouped animals and *H. pylori* K25 was observed as the dominant strain. In continuous flow culture, two strains coexisted without changing the ratio of each other. *H. pylori* reduced the ratio of the predominant bacteria in the stomach of the animal at the early infection stage, but the original microbiota was reestablished after long-term infection. The antagonism between *H. pylori* infection and microbiota was observed.

研究分野：細菌学

キーワード：*Helicobacter pylori* 常在細菌叢 マイクロビオータ

1. 研究開始当初の背景

常在細菌叢は外来病原細菌の定着や増殖を阻害する作用や、宿主の免疫を修飾して感染防御に働く作用を有することが知られている。しかし、実際にどのようなメカニズムで外来病原細菌の増殖阻害が起きるのかは、病原細菌の菌種によって異なることから、未解明の細菌も多い。さらに、慢性感染症についてはほとんど明らかにされていない。

*Helicobacter pylori*の感染は小児期におこり、日本における主な感染ルートは家族内感染と考えられている。家族内感染の詳細を明らかにするため、同一家族から分離された菌株の遺伝子タイプについて比較解析を行い、その類似性から母子感染や両親から子への感染の頻度が高いことを示した。一方、家族内に複数の感染源が示唆される、遺伝子タイプの異なる菌株が複数存在する家族例も見られた。父、母、子供3人の感染した*H. pylori*の遺伝子タイプがそれぞれ異なる例では、何故両親の持つ菌株が3人の子供に感染していないのかは不明であった。宿主の体内での選択的増殖によって、混在した複数菌株のうち一株が残る可能性について未解明なままであった。

2. 研究の目的

- (1) 遺伝子タイプの異なる複数の*H. pylori*株を使って、投与の順序が感染にどのように影響するのかを動物実験で検証すること、さらに*H. pylori*株の感染性を規定する因子として細菌叢の役割を明らかにすることを目的とした。
- (2) 腸内細菌叢の類似性が*H. pylori*の家族内感染に影響していることを想定して、家族内感染例の糞便内細菌叢解析から、感染者と非感染者を比較した。
- (3) 慢性持続感染に対して、常在細菌叢の存在が感染性および持続性に影響しているという観点から、*H. pylori*の動物感染モデルを用いて、病原体、常在細菌叢、宿主の三者間の相互作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *H. pylori*の動物感染性の比較

スナネズミ (MGS/Sea、5週齢) に*H. pylori*K21株またはK22株 ($1 \times 10^{8-9}/\text{ml}$) を経口投与し、10日後に*H. pylori* K25株を追加投与した。別の実験系ではK25株を先行投与し、K21株またはK22株を追加投与した。2回目の投与後5週後にそれぞれの群の*H. pylori*の胃内細菌数、胃および腸内細菌叢解析を行った。*H. pylori*の胃内細菌数は、馬血液添加Brucella寒天培地上に発育したコロニー数から判定した。各コロニーからDNAを回収し、RAPD-PCRおよび*trpC*遺伝子のPCR増幅産物のダイレクトシーケンスにより、由来菌株を決定した。(論文1)

(2) *H. pylori*の増殖速度の比較

7%馬血清添加Brucella培地に*H. pylori*のK21、K22、K25株を別々に投与し、37℃、微好気環境下にて、増殖速度を比較した。

(3) *H. pylori*の連続流動培養(論文1)

7%馬血清添加Brucella培地を5%毎時の流速で新鮮な培地を加え、同量の排出が行われる連続流動（CF）培養系を用いた。10%CO₂ および5%O₂の微好気環境下で、100rpmの回転を行いながら培養した。異なる菌株の組み合わせによる混合CF培養のため、単独CF培養した培養液から1mlを別の菌株のCF培養に加えた（100倍希釈）。平板培養による総菌数の算定と培養液から回収した総DNAに対して、菌株特異的プライマーを使い定量リアルタイムPCR法による菌数算定を行った。

(4) *H. pylori*感染者、非感染者の腸内細菌叢の比較解析(論文2)

感染者非感染者の糞便から総DNAを抽出した。得られた総DNAから、ユニバーサルプライマー（Ion 16S metagenome kit）を用いて、細菌16Sr RNA遺伝子を増幅し、Ion PGMでシーケンスを解読した。得られたシーケンスデータはIon reporter経由のOUT解析とQIIME解析を行って、多様性、多様性比較解析を実施した。

(5) 感染動物の消化管細菌叢解析

スナネズミは実験1と系統の異なるMGS/slcを用いた。感染スナネズミから分離培養継代をした高感染性*H. pylori*TK1402m2株とK25株を感染実験に用いた。感染時期による差、菌株による差を見るために、感染2週、8週、40週後の胃および小腸の細菌叢を解析し、非感染群とそれぞれの群の比較をした。

4. 研究成果

(1) *H. pylori*のスナネズミ感染性

H. pylori K25株を先行投与したスナネズミに*H. pylori* K21株を追加投与し、5週後の胃から分離培養された*H. pylori*は動物3匹の合計39コロニー中26コロニーがK25株の遺伝子型と同一であった。また、*H. pylori* K25株を先行投与したスナネズミに*H. pylori* K22株を10日後に投与し、5週後の胃から分離培養された*H. pylori*のコロニーは合計8個でそのうち3個がK25株と同一と判定された。すべての動物から選考投与したK21またはK22株は認められなかった。

感染順を入れ替えて、*H. pylori* K21株または、*H. pylori* K22株をスナネズミに先行投与し、10日後に*H. pylori* K25株を追加投与した群でも同様の観察を行った。その結果、*H. pylori* K21株先行の投与群では合計28コロニー中24コロニーが*H. pylori* K25株と同一の遺伝子型であった。*H. pylori* K22株先行投与群では、33コロニー中31コロニーが*H. pylori* K25株と考えられた。以上のことからスナネズミへの感染は*H. pylori* K25株が他の2株と比べて優位であることが明らかとなった。

(2) *H. pylori*の増殖

微好気環境下の攪拌培養24時間、48時間後に、*H. pylori* K21株、K22株、K25株の増殖菌数を比較したところ、有意な差を認めず、K21株は他の2株と比べて増殖菌数が少ない傾向にあった。

H. pylori K25株とK21株との拮抗作用を検討するため、CF培養法を用いて混合培養を行った。K25株を先に接種し定常状態に達しているCF培養に、別のCF単独培養で定常状態に

あるK21株を希釈接種し消長を追ったところ、接種後12日間まで 10^7 個/ml以上で共存した状態で続いていた。また、K21株を摂取し定常状態に達しているCF培養に後からK25株を加えたCF培養においても、同様にあとから接種したK25株が接種後12日間まで 10^7 個/ml程度で維持された。以上のことから、CF培養では先行して投与された菌株が優位な菌数で、12日間維持されることが明らかになった。

(3) *H. pylori*の細胞接着性

胃癌由来AGS細胞への付着性を相対値として比較したところ *H. pylori* K25株の付着に対して、K21株は26%程度、K22株は62%と有意に低い付着性を示した。上皮細胞への付着性が高いことが、動物感染性に優位になった可能性が示唆された。

(4) *H. pylori*感染者、非感染者の腸内細菌叢の比較解析

家族内 *H. pylori*感染と腸内細菌叢の関係を分析するため、*H. pylori*の感染児および感染した母親または両親のいる家族のうち5家族から18検体の糞便DNAを回収し、16Sメタゲノム解析を実施した。

18検体を合わせて主成分分析することにより、家族内の腸内細菌叢構成の類似性と、家族間の多様性の比較を行った。また、異なる家族間の腸内細菌叢構成を科レベル、属レベル、種レベルで多様性解析比較を行うと、家族ごとに類似した結果が得られプロットが集中する傾向が認められた。PC1（第一主成分）の比率は、属 > 科 > 種の順で、それぞれ48.6%、27.2%、19.8%と種レベルの検体間多様性が最も少ない結果となった。

家族内の腸内細菌叢の類似性をとらえる指標としてManhattan距離で表すと、感染児（発端児）から最も近い距離で示されたのは5家族中母親が3例、父親が1例、同胞1例であった。母親3例のうち、2例は *H. pylori*感染者、父親は1例中1例感染者、同胞は非感染者であった。対象となった5家族にはいずれも *H. pylori*感染者である発端児のほかに非感染者の同胞が含まれていた。感染源と想定された *H. pylori*感染陽性の母親または父親と発端児間のマンハッタン距離を決定し、同じく感染源と同胞の非感染児間のマンハッタン距離を比較すると、種レベル、全5家族とも、種レベル、属レベルで前者の距離が短かった。以上のことから *H. pylori*感染児とその感染の由来となった成人家族との腸内細菌叢には非感染児と比べてより高い類似性があることが示された。

(5) *H. pylori*感染と消化管細菌叢の関係

感染性の異なる *H. pylori* TK1402株（高感染性）およびK25株（低感染性）を用いて、スナネズミ感染実験を実施した。感染2から8週後において *H. pylori* K25株は胃から培養法で検出されず、胃内細菌叢が *H. pylori* の増殖に抑制的に働いている可能性が考えられた。しかし、感染10カ月後のスナネズミにおいて *H. pylori* K25株が培養可能となり、胃内細菌叢の *H. pylori* K25株に対する抑制作用は限定的と考えられた。さらに、高感染性 *H. pylori* TK1402株は感染スナネズミの2Wから40Wまで培養可能な状態で胃内に検出された。感染動物の胃内細菌叢の主成分解析の結果により、両菌株の感染スナネズミの細菌叢は異なる領域にプロットされた。また、非感染の動物の胃内細菌叢とも異なっていた。さらに、小腸菌叢解析の結果、K25株感染はTK1402株感染と比べて高頻度に *H. pylori* DNAを

検出した。従って、TK1402株とK25株は感染棲息部位が異なり、TK1402株は胃体部から、K25株は十二指腸側の幽門部から棲息域を広げると考えられた。これらの結果は、*H. pylori*感染が胃内のみならず小腸細菌叢に影響して、変化を誘導していることを示唆する結果と考えられた。しかし、TK1402株長期感染後の胃内および小腸内細菌叢は、非感染群と近い細菌叢構成に変化しており、細菌叢と*H. pylori*感染との拮抗が観察された。

*H. pylori*感染スナネズミ胃内細菌叢解析の結果を比較して、動物の胃内細菌叢の最優勢菌である*Lactobacillus*属細菌の菌数は、*H. pylori*の細菌数と逆相関していた。*H. pylori*の胃内定着性に防御的に働く細菌構成として、*Lactobacillus*属細菌が、最優勢を保っていることが重要であり、*Lactobacillus*属細菌に対して抵抗する能力が感染性を規定している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計6件)

1. Zaman C, Osaki T, Furuta Y, Hojo F, Yonezawa H, Konno M, Kurata S, Hanawa T, Kamiya S. Enhanced infectivity of strains of *Helicobacter pylori* isolated from children compared with parental strains. J Med Microbiol. 2019 Apr;68(4):633-641. doi: 10.1099/jmm.0.000918. Epub 2019 Feb 26. 査読あり
2. Okuda M, Lin Y, Mabe K, Kato M, Osaki T, Miyamoto R, Okumura A, Kamiya S, Kikuchi S. Serum pepsinogen values in Japanese junior high school students with reference to *Helicobacter pylori* infection. J Epidemiol. 2019 Jan 12. doi: 10.2188/jea.JE20180119. 査読あり
3. Osaki T, Zaman C, Yonezawa H, Lin Y, Okuda M, Nozaki E, Hojo F, Kurata S, Hanawa T, Kikuchi S, Kamiya S. Influence of Intestinal Indigenous Microbiota on Intrafamilial Infection by *Helicobacter pylori* in Japan. Front Immunol. 2018 Feb 21;9:287. doi: 10.3389/fimmu.2018.00287. eCollection 2018. 査読あり
4. Kato S, Osaki T, Kamiya S, Zhang XS, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* sabA gene is associated with iron deficiency anemia in childhood and adolescence. PLoS One. 2017 Aug 30;12(8):e0184046. doi:10.1371/journal.pone.0184046. eCollection 2017. 査読あり
5. Osaki T, Mabe K, Zaman C, Yonezawa H, Okuda M, Amagai K, Fujieda S, Goto M, Shibata W, Kato M, Kamiya S. Usefulness of detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from fecal specimens for young adults treated with eradication therapy. Helicobacter. 2017 Oct;22(5). doi: 10.1111/hel.12396. Epub 2017 May 22. 査読あり
6. Okuda M, Kikuchi S, Mabe K, Osaki T, Kamiya S, Fukuda Y, Kato M. Nationwide survey of *Helicobacter pylori* treatment for children and adolescents in Japan. Pediatr Int. 2017 Jan;59(1):57-61. doi: 10.1111/ped.13038. Epub 2016 Aug 15. 査読あり

【学会発表】(計10件)

1. Osaki T, Yonezawa H, Takahashi M, Nozaki E, Zaman C, Hojo F, Kamiya S: 16S metagenomic analysis for gastric microbiota of Mongolian gerbil infected with *Helicobacter pylori*. XXXth International Workshop on *Helicobacter* & Microbiota in Inflammation & Cancer, France, September 7th-9th, 2017.
2. Kamiya S, Osaki T, Tokunaga K, Yonezawa H, Tanaka A, Zaman C, Hojo F, Takahashi S: Metagenomic analysis for microbial ecology between *Helicobacter pylori* and gastric microbiota in the chronic gastritis patients. The 14th Japan-Korean Joint Symposium on *Helicobacter* Research, Korea, April 8th, 2017.
3. Osaki T, Tokunaga K, Yonezawa H, Tanaka A, Takahashi M, Oka K, Zaman C, Hojo F, Kurata S, Hanawa T, Taguchi H, Kamiya S : The impact of *Helicobacter pylori* infection on

- gastric microbiota. The Joint Congress of the 19th International Symposium on Gnotobiology, the 50th Congress of Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology and the 39th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease, Tokyo, June 7th-10th, 2017.
4. Yonezawa H, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Zaman C, Hojo F, Kamiya S: Diversification of AlpA and AlpB outer membrane proteins of *Helicobacter pylori* affects biofilm formation. The Joint Congress of the 19th International Symposium on Gnotobiology, the 50th Congress of Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology and the 39th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease, Tokyo, June 7th-10th, 2017.
 5. Osaki T, Zaman C, Yonezawa H, Hojo F, Kurata S, Hanawa T, Kamiya S : Characterization of *Helicobacter pylori* strains in continuous flow culture system. 第 90 回日本細菌学会総会 , , 2017 年 3 月 19-21 日 .
 6. Kamiya S, Zaman C, Yonezawa H, Hojo F, Osaki T : Comparison of infectivity of *H. pylori* strains isolated from father, mother and 3 children of a family in gerbil model. European Helicobacter and Microbiota Study Group – EHMSG XXIXth International Workshop on Helicobacter and Microbiota in Inflammation and Cancer, Germany, September 15th-17th, 2016.
 7. Osaki T, Tokunaga K, Yonezawa H, Tanaka A, Nozaki E, Zaman C, Hojo F, Takahashi S, Kamiya S : Metagenomic analysis for microbial ecology between *Helicobacter pylori* and gastric microbiota in the patients with atrophic gastritis. European Helicobacter and Microbiota Study Group – EHMSG XXIXth International Workshop on Helicobacter and Microbiota in Inflammation and Cancer, Germany, September 15th-17th, 2016.
 8. 大崎敬子, 神谷茂 : *Helicobacter pylori* 家族内感染と腸内常在細菌叢 . 第 19 回日本臨床腸内微生物学会 , 2016 年 8 月 27 日 .
 9. 大崎敬子, 徳永健吾, 田中昭文, ザマンシンシア, 米澤英雄, 北条史, 高橋信一, 神谷茂 : *Helicobacter pylori* 感染と胃内細菌叢 . 第 22 回日本ヘリコバクター学会学術集会 , 2016 年 6 月 24-26 日 .
 10. Zaman C, Osaki T, Yonezawa H, Hojo F, Kamiya S : Animal study on *Helicobacter pylori* infection using the strains isolated from one family members. The 13th Korea-Japan Joint Symposium on Helicobacter infection , 2016 年 6 月 24-26 日 .

【その他】

ホームページ等

<https://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/education/labo/infection/#micro>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 高橋 志達

ローマ字氏名 : Takahashi Motomichi

所属研究機関名 : 杏林大学

部局名 : 医学部

職名 : 非常勤講師

研究者番号 (8 桁) : 30701099

(2) 研究協力者

神谷 茂 (KAMIYA, Shigeru)

奥田 真珠美 (OKUDA, Masumi)

米澤 英雄 (YONEZAWA, Haideo)

菊地 正悟 (KIKUCHI, Shyogo)

ザマン シンシア (Zaman Cynthia)

林 正松 (LYIN, Yingson)

北条 史 (HOJO, Fuhito)