

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09584

研究課題名(和文) 粘膜免疫を介したバクテリアル・トランスロケーションの解析と制御

研究課題名(英文) Study the role of mucosal immunity of intestine in bacterial translocation

## 研究代表者

松本 哲哉 (Matsumoto, Tetsuya)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：10256688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：今回、消化管の粘膜免疫がどのようにバクテリアルトランスロケーション(BT)に関与しているかについて、マウスの炎症性腸疾患(IBD)モデルを用いて検討を行った。その結果、NKT細胞が欠如したCD1dノックアウトマウスはコントロールマウスに比較してIBD誘導後の死亡率は有意に低かった。また、IBD誘導後、CD1d欠損マウス群では体重の増加がみられたのに対し、コントロール群では急激な減少を認めた。さらにコントロール群の血便スコアは急激に上昇したが、CD1d欠損マウス群では低値であった。これらの結果により、NKT細胞はIBDの重症化に関与し、BTを介して敗血症を増悪させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bacterial translocation (BT) is the phenomenon of invasion of indigenous intestinal bacteria through the gut mucosa to normally sterile tissues and the internal organs. The mucosal immune response in the intestine might play a role in BT. Therefore, the aim of this study was to evaluate the NKT cell in the relation to BT by using mouse model of inflammatory bowel disease (IBD). Mortality rate of CD1d knockout mice which lack NKT cells was significantly lower than that of control mice. Evaluation of the body weight changes and bloody stool score after the induction of IBD suggested that the more severe inflammation was shown in the wild type control mice. These results suggested that NKT cells may play a role in the progression of IBD.

研究分野：感染症、微生物学、免疫学

キーワード：バクテリアルトランスロケーション 粘膜免疫 炎症性腸疾患 NKT細胞

## 1. 研究開始当初の背景

バクテリアル・トランスロケーション(BT)は腸管内の菌が粘膜バリアーを通過して、リンパ行性あるいは血行性に腸管以外の部位に広がる現象である。BT が起こる要因はさまざまであり、免疫不全、消化管疾患、栄養不良、各種ストレスなどが挙げられ、腸の粘膜萎縮や腸管の防御機構の障害が BT に大きく関与していると考えられる。

また、BT では細菌だけでなくリポポリサッカライド(LPS)などの菌体成分やトキシンが移行することで、各種の免疫細胞を活性化し、それに伴って産生された炎症性サイトカインが生体に高度な炎症をもたらしてSIRS(全身性炎症反応症候群)やショックなどの問題を生じる可能性が示唆されている。NKT細胞はCD1を介して糖脂質抗原の提示を受け、IL-4を産生してTh1タイプのリンパ球を活性化し、一方IFN- $\gamma$ を産生してTh2タイプのリンパ球を活性化できるユニークな細胞である。NKT細胞は第4のリンパ球として注目を集め、がん免疫などの領域においては各種の研究がなされてきた。一方、感染症においては2000年以降に少しずつ研究成果が発表されてきた。私達はまず細菌性肺炎におけるNKT細胞の関与を検討し、NKT細胞の活性化が肺内の緑膿菌の排除を高める作用を示すことを明らかにした(Matsumoto T et al. Nature Medicine, 2002)。その後、結核菌や肺炎球菌においても肺炎においてNKT細胞が防御機構に重要な役割を担っていることが明らかになっている(Chackerian A et al. Infect Immun, 2002、Kawakami K. et al. Eur. J. Immunol, 2003)。これらの結果から呼吸器におけるNKT細胞の役割はある程度、明確になってきたものの、消化管における役割はまだ十分に解明されてはいない。

我々がこれまで行った研究では、NKT細胞が機能しないCD1d欠損マウスにおいては、腸管内の細菌の増殖が異常に加速することがわかっている(Nieuwenhuis EE, Matsumoto T, et al. J Clin Invest. 2009)。しかし各種疾患において、NKT細胞がどのような役割を果たし、粘膜免疫に関与しているのかを突き止めることで疾患に対するアプローチが異なってくると考えられる。

## 2. 研究の目的

上記の背景を受けて、今回の研究では、マウスの炎症性腸疾患(IBD)のモデルを用いてNKT細胞の関与について解析することを目的に検討を行った。

なお、BTには各種の要因が関与するため、今回は免疫不全への誘導は行わず、IBDによる影響を中心にCD1d欠損マウスと健常のコントロールマウスの比較検討を行った。

またIBDによる状態の評価はいくつかのパラメータがあるが、今回は生存率や体重の変化、および血便の程度を主な解析対象とし

た

## 3. 研究の方法

### 1) 被験動物

マウスはSPFのCD1d欠損マウスを用いた。この系統のマウスはCD1dが欠損しているため、NKT細胞の機能は認められない。また、野生型(WT)のコントロールマウスとして、SPFのBALB/cマウス4~6週令、雄(日本チャールスリバー社)を用いた。飼育と管理は東京医科大学疾患モデル研究センター内にて行った。

### 2) 炎症性腸疾患(IBD)モデル作成

マウスに経口的にDextran sulfate sodium(DSS)を接種し、腸炎を作成した。モデルの作成にあたっては、DSSの投与濃度によってかなりマウスの疾患の表れ方に差があることが予備的実験においてわかっていたため、いくつか条件を変更しながら検討を行った。

### 3) IBDの重症度評価

IBD誘導後に腸炎の重症度を評価するため、経過観察中のマウスの体重変化、および採取された便の下血の状態をスコアを用いて評価した。

## 4. 研究成果

### (1) IBD誘導後のマウスの生存率

CD1d欠損マウス群およびコントロール群のマウスを対象にDSS処置後に経過観察を行った。CD1d欠損マウス群(CD1dKO)は全てのマウスが観察期間の間生存し続けたが、野生型のコントロールマウス(WT-BALB/c)は実験開始19日目で全部のマウスが死亡し、有意な生存率の低下を認めた(図1)。

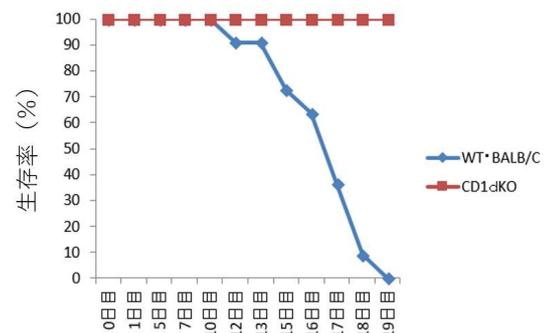


図1. IBD誘導後のマウスの生存率の推移

上記の結果より、IBDは野生型のコントロールマウスでは通常のレベルで観察されたにもかかわらず、CD1d欠損マウス群では発症に至っていない可能性も考えられた。

### (2) IBD誘導後の体重の推移の検討

さらにマウスの状態を詳細に確認するために、IBD誘導後の疾患の重症度の評価として体重の推移について検討を行った。その結果、図2に示すようにCD1d欠損マウス群はほぼ

順調に体重の増加がみられたが、コントロール群では体重の急激な減少を認めた。

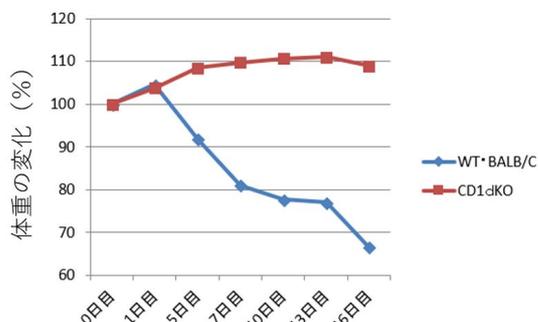


図2 . IBD 誘導後のマウスの体重の推移

この結果からも CD1d 欠損マウス群における IBD の発症がほとんどみられていない可能性が考えられた。

### (3) 血便の評価

より病態を反映させる観察項目として、さらに腸管の炎症の評価するために、血便の状態を経日的に検討した。図3に示すようにコントロール群の血便スコアは日を追うに従って上昇したが、一方の CD1d 欠損マウス群では血便の程度はかなり軽く、腸管の炎症が軽度にとまっている状況が示唆された。

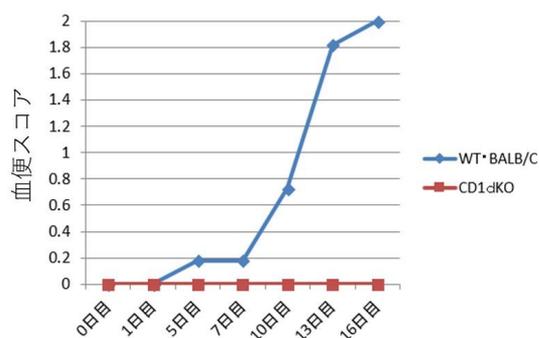


図3 . IBD 誘導後のマウスの血便スコアの推移

上記の結果を踏まえて、腸管の炎症自体が CD1d 欠損マウス群においてはみられない状況が明らかとなった。

今回の検討により、両群のマウス間の差は顕著であった。予備的実験においては、IBD の誘導の程度などによって多少の影響はあるものの、CD1d 欠損マウス群よりも野生型のコントロールにおいて IBD が重症化しやすいという傾向はいずれの実験でも認められたことから、今回の現象は再現性を含めて明らかであると考えられた。

今後、さらに今回の現象に至った機序や NKT 細胞の具体的な関与、さらに腸管の炎症の程度の評価などを踏まえて、引き続き検討を行うことによってより詳細なレベルの解析ができるものと期待している。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

- Miyazaki H, Shibuya R, Midorikawa N, Matsumoto T. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Japan after introduction of the routine immunization program. *J Infect Chemother.* 23:234-240, 2017 (査読有り)
- Fujikura Y, Yuki A, Hamamoto T, Matsumoto T. Evaluation and validity of a polymerase chain reaction-based open reading frame typing method to dissect the molecular epidemiology for *Acinetobacter baumannii* in an epidemiologic study of a hospital outbreak. *Am J Infect Control.* 2016 44:e275-e278 (査読有り)
- Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. *Int J Infect Dis.* 2016 52:37-42. (査読有り)
- Akaishi Y, Matsumoto T, Harada Y. Evaluation of the rapid influenza detection tests GOLD SIGN FLU and Quick Navi-Flu for the detection of influenza A and B virus antigens in adults during the influenza season. *Int J Infect Dis.* 2016 52:55-58. (査読有り)
- Fujikura Y, Yuki A, Hamamoto T, Matsumoto T. Blood stream infections caused by *Acinetobacter baumannii* group in Japan - Epidemiological and clinical investigation. *J Infect Chemother.* 2016 22:366-71. (査読有り)
- Mizuno Y, Miura Y, Yamaguchi T, Matsumoto T. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae colonisation in long-term overseas business travellers. *Travel Med Infect Dis.* 2016 14 :561-567. (査読有り)
- Furusawa J, Mizoguchi I, Chiba Y, Matsumoto T. Promotion of Expansion and Differentiation of Hematopoietic Stem Cells by Interleukin-27 into Myeloid Progenitors to Control Infection in Emergency Myelopoiesis. *PLoS Pathog.* 2016 12:e1005507. (査読有り)
- Nakamura I, Fukushima S, Hayakawa T, Matsumoto T. The additional costs of catheter-related bloodstream infections in intensive care units. *Am J Infect Control.* 2015 43 :1046-9 (査読有り)

9. Nakamura I, Sakamoto N, Ida Y, Matsumoto T. Combination Therapy against Polymicrobial Infection, Including by NDM-1-Producing Enterobacteriaceae Resistant to Colistin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 59:5092-3. (査読有り)
10. Yamaguchi T, Suzuki S, Okamura S, Matsumoto T. Evolution and single-nucleotide polymorphisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to vancomycin and daptomycin, based on determination of the complete genome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 59:3585-7. (査読有り)
11. Nakagawa H, Hattori T, Koike N, Matsumoto T. Investigation of the Role of Bacteria in the Development of Acanthamoeba Keratitis. *Cornea* 2015 34 :1308-15 (査読有り)
12. Nakamura I, Yamaguchi T, Tsukimori A, Matsumoto T. New options of antibiotic combination therapy for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015 34:83-7 (査読有り)
13. Yanagihara K, Kadota J, Aoki N, Matsumoto T. Nationwide surveillance of bacterial respiratory pathogens conducted by the surveillance committee of Japanese Society of Chemotherapy, the Japanese Association for Infectious Diseases, and the Japanese Society for Clinical Microbiology in 2010: General view of the pathogens' antibacterial susceptibility. *J Infect Chemother.* 2015 21 : 410-20 (査読有り)
14. Tajima K, Miyake T, Koike N, Matsumoto T. Two Different Concentrations of Topical Levofloxacin for the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2015 31 :636-41 (査読有り)
15. Yamaguchi T, Okamura S, Miura Y, Matsumoto T. Molecular Characterization of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Skin and Pus Samples of Outpatients in Japan. *Microb Drug Resist.* 2015 21:441-7. (査読有り)

〔学会発表〕(計3件)

1. 廣瀬 彩夏, 川畑 大輔, 三枝 有希, 渋谷 理恵, 上原 由紀, 松本 哲哉. *Staphylococcus lugdunensis* 28株の細菌学的検討. 第29回日本臨床微生物学会総会・学術集会, 2018
2. Ohkusu K, Matsumoto T. Evaluation of a broad-range 16S rRNA PCR and sequencing assay for diagnosis of culture-negative infective endocarditis. 28th ECCMID, 2018.
3. 成松 明知, 服部 貴明, 小池 直人, 田島一樹, 伊藤 典彦, 熊倉 重人, 後藤 浩, 松本 哲哉. 各領域における緑膿菌感染症の現状と展望. 第51回緑膿菌感染症研究会, 2017

〔図書〕(計12件)

1. 松本 哲哉. 抗菌薬. 治療薬マニュアル 2018(高久 史磨, 矢崎 義雄監), 医学書院. 2018, 1321-1328.
2. 松本 哲哉. プルセラ症. 今日の治療指針 2018(福井次矢, 高木誠, 小室一成編), 医学書院. 2018, 184-185.
3. 松本 哲哉. E S B L 産生菌感染症における抗菌薬選択のポイント. 日常診療で遭遇する耐性菌 ESBL 産生菌(松本哲哉編) 2017. 79-95
4. 松本 哲哉. *Pseudomonas* 属および関連した菌による感染症. ハリソン内科学 第5版(福井次矢, 黒川清編). 2017, 997-1003
5. 松本 哲哉. 感染症総論. 内科学 第11版(矢崎 義雄, 伊藤 裕, 木下 芳一, 須永 眞司, 南学 正臣, 長谷川 好規, 松本 哲哉, 他編) 朝倉書店. 2017, 213-217.
6. 松本 哲哉. 序論. 最新臨床検査学講座 臨床微生物学(松本哲哉編) 医歯薬出版. 2017.1-5
7. 松本 哲哉. プロバイオティクス製剤による菌血症. 薬局 68:3443-3450, 2017
8. 松本 哲哉. 抗菌薬. 呼吸器疾患最新の治療 2016-2018 (河野茂編). 南山堂, 2016, 103-110.
9. 松本 哲哉. 免疫クロマトグラフィー法の種類と特徴は?, EBM 呼吸器疾患の治療(永井厚志監). 中外医学社, 2016, 327-332
10. 松本 哲哉. 感染対策. 最新臨床検査学講座 医療安全管理学(諏訪部 章, 高木 康, 松本 哲哉編) 医歯薬出版, 2016, 23-39.
11. 松本 哲哉. 感染症診療における血中病原体抗原検出とバイオマーカーの意義. 化学療法の領域 32:1814-1817, 2016
12. 松本 哲哉. グラム陰性好気性球菌および球桿菌. 標準微生物学 第12版(中込 治, 神谷 茂編) 医学書院, 2015. 251-254

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tokyo-med.ac.jp/microbiology/>

6．研究組織

(1)研究代表者

松本 哲哉 (MATSUMOTO TETSUYA)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：10256688

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし