

令和元年6月3日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15293

研究課題名(和文)腸内細菌叢および腸管免疫系へ影響を及ぼす口腔内細菌の解析

研究課題名(英文)Oral derived bacteria influence intestinal immune system

研究代表者

新 幸二 (Atarashi, Koji)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：60546787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔内に存在する細菌が炎症性腸疾患患者の腸内に多く検出されることから、口腔細菌が腸内に定着し炎症を誘導している可能性が示唆されている。そこで本研究では無菌マウスに炎症性腸疾患患者から採取した唾液を投与し、そのマウスの腸内に定着し腸管免疫細胞を活性化する口腔細菌を探索した。その結果、唾液中に存在するクレブシエラ菌が腸内に定着し、大腸TH1細胞の活性化を引き起こすことを見出した。さらにこのクレブシエラ菌は、通常の腸内細菌が存在しているSPFマウスでは腸内への定着が見られず、抗生物質によって腸内細菌叢が乱れた場合にのみ定着すること、またIL-10欠損マウスの腸管炎症を悪化させることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、クローン病や潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性腸疾患の発症に口腔由来のクレブシエラ属細菌が関与している可能性があることを明らかにした。これまでクレブシエラ菌が炎症性腸疾患に関与していることを示唆するデータは存在したが、直接の関与を証明した初めての結果であり、したがってクレブシエラ属細菌が慢性炎症性腸疾患に対する新たな創薬標的となり得ることが想定されます。そこで、クレブシエラ属細菌を選択的に排除・殺菌する抗生物質などの開発やクレブシエラ属細菌が腸管内に定着させないような薬剤の開発を通して、これら疾患の予防法や治療薬の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Intestinal colonization by bacteria of oral origin has been correlated with several gastrointestinal diseases, including inflammatory bowel diseases (IBD). However, a causal role of oral bacteria ectopically colonizing the intestine remains unclear. I inoculated saliva samples from IBD patients into germ-free (GF) mice by oral gavage. I have clarified that strains of *Klebsiella* spp. isolated from the salivary microbiota are strong inducers of T helper 1 (TH1) cells when they colonize the gut. Although these *Klebsiella* strains could not colonize the gut of SPF mice with normal microbiota, they preferentially colonize those of SPF mice with dysbiotic microbiota, such as antibiotics treatment. These *Klebsiella* strains elicit a severe gut inflammation in the context of a genetically susceptible host, such as IL10 deficient mice.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：腸内細菌 Th1細胞 クレブシエラ菌

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患、アレルギー、肥満、糖尿病、がん、動脈硬化など様々な疾患において腸内細菌の構成異常 (dysbiosis) が起こっていることが明らかになっている。抗生剤の使用や病原性細菌の侵入、炎症などの強い環境変化により、腸内細菌が影響を受け腸内細菌叢を構成する細菌種の変化が起こる。しかしながら、これらの外的要因によりどのような変化が腸内細菌叢に起こったときに疾患発症のリスクが高まるのか、細菌叢の構成異常がどのようなメカニズムで疾患発症に関与しているのかはまだ明らかになっていない。また、腸内細菌と同様に口腔内細菌においても、炎症性腸疾患の患者では健常者と異なる細菌叢になっていることが報告されている。そのため、口腔内細菌が腸管内に定着し腸管細菌および腸管免疫系に強く影響を与えている可能性が示唆されている。実際にクローン病患者の唾液を無菌マウスに投与したところ、大腸粘膜固有層において IFN- γ を産生する Th1 細胞が強く誘導されることを発見した。そこで、本研究では炎症性腸疾患の患者の口腔内細菌の中から腸管内に定着し腸管免疫系に強く影響を与える細菌を同定することで、炎症性腸疾患の原因解明さらには腸内細菌および口腔内細菌をターゲットにした予防法・診断法・治療法への応用や開発に繋げることを目標に研究を行う。

2. 研究の目的

ヒトの腸管内腔には数百種類の腸内細菌が存在し、宿主の様々な生理機能に影響を与えている。そのため腸内細菌叢を構成する細菌種の多様性の減少や特定菌種の増減など腸内細菌異常 dysbiosis が様々な疾患の発症と関連していることが明らかになってきている。しかしながら、どのような原因で dysbiosis が起こるのか、どのような細菌種が疾患発症に直接関与しているかについては明らかになっていない。そこで本研究では、口腔内細菌に着目し、口腔内細菌の中で腸内に定着し免疫系に強い影響を与える細菌を同定し、dysbiosis が疾患発症を引き起こすメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

これまでの研究において、クローン病患者の唾液を無菌マウスに経口投与し、口腔内細菌が腸内に定着した場合にどのような免疫細胞が活性化するかを解析した。その結果、大腸粘膜固有層において IFN- γ を高産生する CD4 陽性 T 細胞 (Th1 細胞) が著明に増加していた。このことから、クローン病患者の口腔内には、腸内に定着し大腸 Th1 細胞を活性化させる細菌が存在していたことが明らかになった。そこで唾液投与マウスの腸内細菌を培養・単離し、どのような細菌が Th1 誘導に関与しているかを調べたところ、*Klebsiella pneumoniae* 2H7 株が Th1 細胞の誘導に関与していることを見出した。そこで、炎症性腸疾患患者の口腔内細菌が腸管免疫系にどのような影響を与え得るか、炎症性腸疾患の発症に関与し得るかについて、主に以下の3点に焦点を当て詳細に解析を行った。

(1) 口腔内細菌単離株による Th1 誘導メカニズムの解析

K. pneumoniae 2H7 株がどのようなメカニズムで Th1 誘導を促進しているのかを解析する。具体的には、細菌側からのアプローチとして *K. pneumoniae* のゲノム比較、変異株作成を行う。また、マウス側からのアプローチとして様々な遺伝子欠損マウスを用いて、Th1 誘導に変化がある遺伝子を探索する。

(2) 口腔内細菌単離株の腸炎への関与の検討

K. pneumoniae 2H7 株が Th1 細胞を強く誘導することにより、腸管に炎症を引き起こしうるのか、または腸炎モデルの増悪に寄与するのかについて検討を行う。また、2H7 株が炎症性腸疾患の患者で増加しているかを、データベースに登録された情報を元に解析を行う。

(3) Dysbiosis における 2H7 株の役割の解析

Dysbiosis と 2H7 株がどのように関連しているかを、dysbiosis の結果または原因の両面から炎症性腸疾患の発症と 2H7 株との関わりについて検討を行う。

4. 研究成果

(1) 口腔内細菌単離株による Th1 誘導メカニズムの解析

腸内に定着し、腸管免疫系に強い影響を与える口腔細菌を探索するため、クローン病患者の唾液を無菌マウスに経口投与し6週間後に腸管の免疫細胞を解析した。その結果、大腸粘膜固有層の Th1 細胞が強い活性化していることが明らかになった。そこで次に Th1 誘導に関与している細菌を特定するため、このマウスの腸内細菌を培養し優勢菌である8菌株を単離した。この8菌株の中に Th1 細胞を強く活性化させる細菌を調べたところ、*K. pneumoniae* 2H7 株が唯一 Th1 細胞を活性化したため、*K. pneumoniae* 2H7 株がクローン病患者の唾液投与マウスにおける Th1 細胞誘導の原因細菌であると特定した。

K. pneumoniae は肺炎患者や土壌など様々な場所から多くの株が単離されており、JCM や ATCC などから合計10株の *K. pneumoniae* を入手した。それらすべてをそれぞれ無菌マウスの腸管に定着させ、大腸の Th1 細胞の誘導を解析したところ、強く Th1 細胞を誘導する株が5株、中程度に誘導する株が3株、ほとんど誘導しない株が2株であった。そのため、これらの株のゲノム配列を解読し、どのような遺伝子が異なっているのかを調べることで、*K. pneumoniae* の Th1 細胞誘導メカニズムにつながる知見が得られることが予想された。そこで、これらすべての株

からゲノム DNA を抽出し次世代シーケンサーでゲノム配列を解読し、Th1 細胞誘導の強さと 관련된 遺伝子を網羅的に解析した結果、長鎖脂肪酸・マンノース・フルクトース・ガラクトース・4 型分泌装置などに関わる 61 個の遺伝子が検出されたが、どれも相関係数はそれほど高い値ではなかった。一方で、10 株の *K. pneumoniae* のうち、強く Th1 細胞を誘導する 40B3 株とほとんど Th1 細胞を誘導しない KCTC2242 株のゲノム配列が非常に相同性が高いことが確認できた。そこで、次にこれら 2 株間の塩基配列を詳細に比較し、40B3 株が保有し KCTC2242 株が保有していない 2kb 以上領域として、3 つの領域を同定した。その一つ領域では 8,631bp が KCTC2242 株で欠損しており、ペプチドグリカンの構成に必要なタンパク質をコードしている遺伝子が含まれていた。このことから、ペプチドグリカンの構成が 40B3 株と KCTC2242 株で異なっている可能性が示唆され、TH1 誘導の違いに繋がっている可能性が高いと考えられた。そこで、40B3 株からこの領域を欠損した変異株と KCTC2242 株へ挿入した変異株の作製を行い、大腸の TH1 細胞の活性化を解析したところ、40B3 欠損株は 40B3 野生株と比較して弱く、KCTC2242 挿入株は KCTC2242 野生株と比較して有意に TH1 細胞が活性化されていた。このことから、*K. pneumoniae* の Th1 誘導はペプチドグリカンの構成が関与していることが示唆された。

遺伝子欠損マウスを用いた解析においても、細菌の細胞壁の構成成分であるペプチドグリカンなどを認識する Toll-like receptors (TLRs) の必須アダプター分子である Myd88/Trif 二重欠損マウスでは、*K. pneumoniae* による Th1 誘導がほぼ完全に見られなかった。このことから細菌側からもマウス側からも細菌の細胞壁の構成成分、とくにペプチドグリカンが Th1 細胞の活性化に重要な働きをしていることが強く示唆された。

(2) 口腔内細菌単離株の腸炎への関与の検討

K. pneumoniae 2H7 株を野生型の無菌マウスに単独定着させても、腸管に炎症が引き起こされている様子は観察できなかった。そのため、*K. pneumoniae* 単独では腸炎を発症しないことが示唆された。ヒトの炎症性腸疾患においても、腸内細菌などの環境要因と遺伝要因の複数の要因が絡み合って発症すると想定されている。そこで次に、IL10 欠損マウスを無菌化し、*K. pneumoniae* 2H7 株を腸内に単独定着させた。IL10 欠損マウスは無菌環境下で飼育すると腸炎を発症することはないが、*K. pneumoniae* 2H7 株を定着させるだけで強い腸管炎症が惹起された。腸炎の程度は、*K. pneumoniae* 2H7 株と同じ唾液投与マウスから単離した大腸菌 2B1 株と比較して有意に悪化していたことから、炎症が起こりやすい遺伝的背景の場合 *K. pneumoniae* 2H7 株は腸炎を悪化させることが強く示唆された。

ヒトの炎症性腸疾患患者の腸内に *K. pneumoniae* が増加し、炎症に関与しているかを解析するため、クローン病と潰瘍性大腸炎の患者便のメタゲノム解析のデータを用いて健常者と *Klebsiella* 属細菌の量比を比較したところ、炎症性腸疾患の患者で有意に *Klebsiella* 属細菌が増加していることが明らかになった。このことから、炎症性腸疾患の発症・増悪に *Klebsiella* 属細菌が関与している可能性が示唆された。

(3) Dysbiosis における 2H7 株の役割の解析

腸内細菌がない無菌マウスに *K. pneumoniae* 2H7 株を投与すると、便中の CFU が 1g あたり 10^9 CFU と非常に高密度で腸内に定着することがわかった。しかし、通常の腸内細菌が存在している SPF マウスに *K. pneumoniae* 2H7 株を経口投与すると、便中に *K. pneumoniae* 2H7 株は検出できない。このことから、腸内に常在している細菌が *K. pneumoniae* の腸内への定着阻害を行っていると考えられた。同時に、アンピシリン等の抗生剤を飲水投与し腸内細菌の dysbiosis を誘発した SPF マウスでは *K. pneumoniae* 2H7 株が定着することから、腸内細菌の dysbiosis が *K. pneumoniae* の腸内定着阻害の破綻を招いていることが示唆された。以上のことから、クローン病患者の口腔に存在している *K. pneumoniae* は通常腸管に定着しないように腸内常在細菌によって制御されているが、腸内細菌の dysbiosis が起こると腸管に定着し、Th1 細胞の活性化を通して腸炎の増悪に働いていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) Nakamoto N, Sasaki N, Aoki R, Miyamoto K, Suda W, Teratani T, Suzuki T, Koda Y, Chu PS, Taniki N, Yamaguchi A, Kanamori M, Kamada N, Hattori M, Ashida H, Sakamoto M, Atarashi K, Narushima S, Yoshimura A, Honda K, Sato T, Kanai T. Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis. *Nat Microbiol.* 査読あり 4(3):492-503. 2019 doi: 10.1038/s41564-018-0333-1.

(2) Atarashi K, Suda W, Luo C, Kawaguchi T, Motoo I, Narushima S, Kiguchi Y, Yasuma K, Watanabe E, Tanoue T, Thaiss CA, Sato M, Toyooka K, Said HS, Yamagami H, Rice SA, Gevers D, Johnson RC, Segre JA, Chen K, Kolls JK, Elinav E, Morita H, Xavier RJ, Hattori M, Honda K. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. *Science.* 査読あり 358(6361):359-365. 2017 doi:

10.1126/science.aan4526.

〔学会発表〕（計 4 件）

- (1) 新幸二. 口腔由来クレブシエラ菌の腸管定着と炎症誘導. 第 27 回東京免疫フォーラム. 2018.3 東京
- (2) Atarashi K, Suda W, Kawaguchi K, Hattori M, Honda K. Intestinal colonization by oral origin Klebsiella induces TH1 responses and inflammation. Next Gen Immunology, Rehovot, Israel, 2018
- (3) 新幸二. 口腔細菌による腸管免疫系活性化機構の解明. (シンポジウム) 第 89 回日本生化学会大会. 2016.9 仙台
- (4) 新幸二, 成島聖子, 河口貴昭, 安間恵子, 本田賢也. 口腔内細菌による腸管免疫活性化機構の解明. (シンポジウム) フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2016.9 東京

〔図書〕（計 1 件）

- (1) 新幸二, 田之上 大, 本田 賢也. 腸内細菌叢による免疫バリア調節機構(解説/特集). 羊土社 実験医学, 35, 1129-1136. 2017

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：Th1 細胞を誘導する細菌/TH1 CELL STIMULATORY BACTERIA COLONIZING IN HUMAN ORAL CAVITY

発明者：本田賢也、新幸二、成島聖子、須田互、服部正平

権利者：学校法人慶應義塾

種類：特許権

番号：PCT/JP2017/039522

出願年：2017/11/1

国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.microbiolimmunol.med.keio.ac.jp/>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。