

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05068

研究課題名（和文）腸内細菌叢の成熟に伴う腸管病原菌に対する感染抵抗性獲得機構

研究課題名（英文）Colonization resistance against enteric pathogen by gut microbiota

研究代表者

金 倫基 (Kim, Yun-Gi)

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・准教授

研究者番号：00620220

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は腸内細菌が腸管病原細菌感染に与える影響について明らかにすることを目的として二つのプロジェクトを行った。

- 1) 腸管病原細菌の定着を強く阻害するクロストリジウム目菌群の腸内での増殖メカニズムについて検証した。その結果、乳児の腸内細菌叢から産生される代謝物質（コハク酸）が、クロストリジウム目菌群の腸管内での増殖を促進することが明らかになった。
- 2) 腸内細菌の組成や代謝に影響を与える食餌に着目し、食餌による腸内細菌を介した腸管病原細菌の定着・増殖抑制効果を検証した。その結果、食餌を変えることにより、腸内細菌叢の組成も変化し、腸管病原細菌感染に対する抵抗性に影響を与えることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、乳幼児型から大人型への腸内細菌叢の成熟ステップが、腸管病原細菌に対する感染抵抗性を獲得するのに重要なプロセスであることが明らかとなった。また、食事因子が腸内細菌を介して腸管病原細菌感染に対する感受性に影響をすることも観察された。これらの成果は、腸内細菌を介した腸管病原細菌に対する感染予防薬開発のための基盤となる知見を提供するものであり、臨床応用への波及効果も大きいと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, two projects were conducted to clarify the effect of gut microbiota on enteropathogenic bacterial infection.

- 1) We assessed the growth mechanism in the intestine of Clostridia which strongly inhibit colonization of enteropathogenic bacteria. As a result, a metabolite (succinic acid) produced by the gut microbiota from infants promoted the growth of Clostridia in the intestine.
- 2) Focusing on the diet that influences the composition and metabolism of gut microbiota, we assessed the effect of the diet on the colonization and growth of enteropathogenic bacteria via gut microbiota. As a result, the gut microbiota composition was changed by switching the diet, and that influenced the resistance against the enteric pathogen infection.

研究分野：腸内細菌学

キーワード：腸内細菌 腸管病原細菌 食餌 代謝物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

乳幼児期は腸管感染に対して高い感受性を示すが、これは未成熟な免疫系・腸内細菌叢によるものと考えられている。腸内細菌叢は腸管免疫系の発達にも重要な役割を果たしていることが明らかになりつつあるが、一方で腸管病原細菌に対する感染抵抗性が腸内細菌叢の成熟とともにどのように変化しているのかは不明な点が多い。我々は既に、腸内細菌叢の成熟に伴い増加してくるクロストリジウム目細菌群が腸管病原細菌の定着抵抗性を高めていること、クロストリジウム目細菌群の増加に乳幼児期に腸内に存在する細菌(乳幼児菌)が必要であることを見出している。

また、食餌は腸内細菌叢の組成や代謝に影響を与える重要な因子の一つであることから、食餌因子が腸内細菌を介して腸管病原細菌感染に影響を与える可能性がある。しかし、食餌  
腸内細菌 腸管感染との間の関係についての知見は乏しい

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、(1) 乳幼児菌によるクロストリジウム目細菌群の腸内での増殖促進メカニズムを解明する(プロジェクト1)(2) 食餌因子が腸内細菌を介して腸管感染に与える影響を解析する(プロジェクト2)ことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ノトバイオームマウスを用いたメタボローム解析

C57BL/6の無菌マウスを使用した。無菌マウスおよび乳幼児型の腸内細菌叢を定着させたマウス、さらに、乳幼児型の腸内細菌叢で優勢な *E. coli*, *Lactobacillus murinus*, *Bacteroides acidifaciens*などを定着させたマウスの糞便を用いてメタボローム解析を行い、乳幼児型の腸内細菌によって増えてくる代謝産物の絞りこみを行った。

### 腸管病原細菌感染

(1) コハク酸、酢酸、または乳酸をクロストリジウム目細菌群の投与7日前から飲水投与し、その後14日間、投与を継続した。無菌マウス、または、短鎖脂肪酸を投与した無菌マウスにクロストリジウム目細菌群を経口摂取させた後、*S. Typhimurium* SL1344  $\Delta$ *spiA*株を経口感染させ、生存率および糞便・盲腸内の *Salmonella* 菌数を算定した。

(2) C57BL/6Jマウスに抗生剤を投与した後、通常水に交換するとともに、飼料Aまたは飼料B摂食群に分けた。その2日後に、*Clostridioides difficile*を経口感染させ、10日間生存率を観察した。

## 4. 研究成果

### (プロジェクト1)

我々はこれまでに、無菌環境下で飼育され、腸内細菌をもたない無菌の成獣マウスの腸管内に、乳児マウスおよび成獣マウス由来の腸内細菌叢を移植する実験手法を用いることにより、腸管病原菌感染における腸内細菌叢の役割について解析した。その結果、腸内細菌叢による病原菌への感染抵抗性は、乳児期の腸内細菌叢では低く、成獣期の腸内細菌叢では高いことが分かった。この乳児の腸内細菌叢による腸管病原菌に対する定着抵抗性(コロナイゼーションレジスタンス:以下CR)の低下は、成獣マウス腸内の優勢菌群であるクロストリジウム目菌群の欠如によることが、腸内細菌叢のメタゲノム解析により明らかになった。実際に、乳児の腸内細菌叢を腸管内に定着させた成獣マウスにクロストリジウム目菌群を経口投与することで、腸管病原菌に対するCRが高くなり、病原菌感染による腸管組織傷害も抑えられたが、別の優勢菌群であるバクテロイデス目菌群の経口投与ではそのような効果は見られなかった。以上の結果から、クロストリジウム目菌群が腸管

病原菌に対する宿主のCRを強化することが示唆されたため、まず、乳児マウスへの当該菌群の投与を試みた。その結果、クロストリジウム目菌群を経口投与した乳児マウスでは、非投与乳児マウスと比べ、*Salmonella* 感染後の生存率が有意に上昇した（図1）。この結果から、乳児マウスにおいてもクロストリジウム目菌群の投与が腸管病原菌感染に対して防御的に働くことが示唆された。

前述のように、クロストリジウム目菌群のみでは無菌マウスの腸管内で効率的に増えることができず、乳幼児の腸内細菌叢の存在によってその増殖が促進されることを観察している。そのため、乳幼児期に定着している腸内細菌

の代謝産物がクロストリジウム目細菌群の腸管内での増殖・定着に関与している可能性が考えられた。そこで、乳幼児の腸内細菌を定着させた無菌マウスの糞便サンプルを用いてメタボローム解析を行った（図2A）。その結果、12,16日齢のマウスでそれぞれ優勢だった *E. coli* や *B.*

*acidifaciens* を定着させたマウスの糞便中でコハク酸濃度が上昇していることが観察された（図2B）。さらに、12,16日齢のマウスの腸内細菌を移植したマウスの糞便中においても同様にコハク酸濃度の上昇が見られた（図2C）。そこで、コハク酸がクロストリジウム目細菌の腸管内での増殖・定着に関与するかどうかを検証した。コハク酸、酢

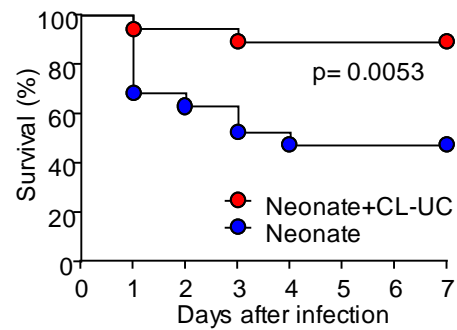


図1. 乳児マウスへのクロストリジウム目細菌群により *Salmonella* 感染後の生存率が上昇する。A. 乳児マウスに Clostridiales 細菌群または PBS を投与し (Neonate+CL-UC または Neonate)、*Salmonella* を感染させた後の生存率を観察した。

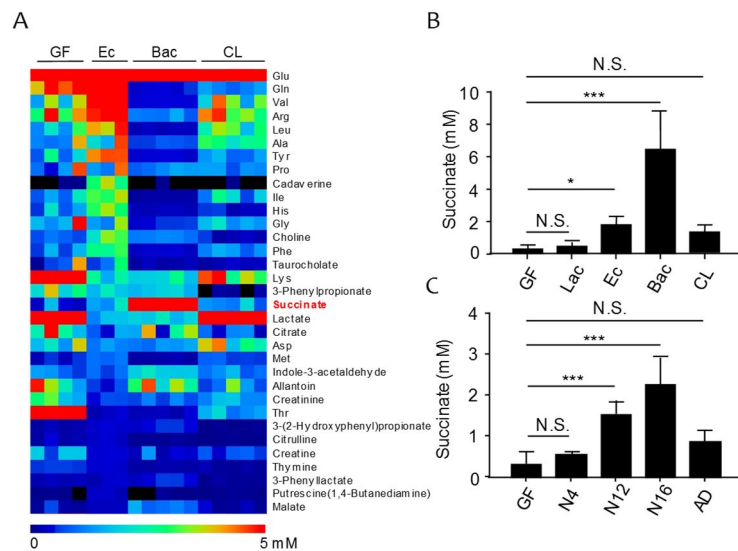


図2. 乳幼児由来の腸内細菌を無菌マウスへ定着させることにより、糞便中のコハク酸量が増加する。A. 無菌マウス (GF) に *E. coli* (Ec)、*B. acidifaciens* (Bac)、クロストリジウム目細菌群 (CL) を定着させた後、各マウスの糞便サンプルを用いたメタボローム解析結果。B. 無菌マウス (GF) に *L. murinus* (Lac) *E. coli* (Ec)、*B. acidifaciens* (Bac)、クロストリジウム目細菌群 (CL) を定着させた後、各マウスの糞便サンプル中のコハク酸量を測定した。C. 無菌マウス (GF) に4日 (N4)、12日 (N12)、16日 (N16)、7週齢 (AD) のマウスの腸内細菌を定着させた後、各マウスの糞便サンプル中のコハク酸量を測定した。

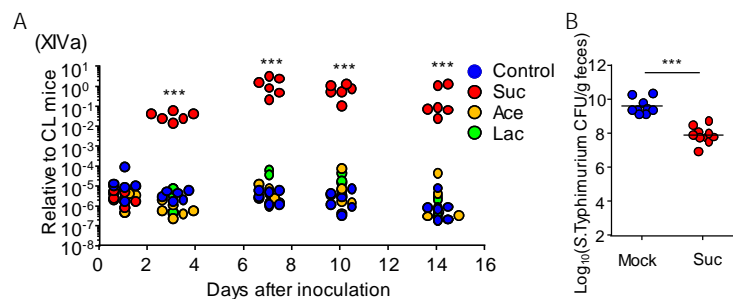


図3. 腸内細菌代謝産物であるコハク酸はクロストリジウム目細菌群の腸管内での増殖・定着を促進させる。A. 無菌マウスにコハク酸 (Suc)、酢酸 (Ace)、乳酸 (Lac) を7日間飲水投与した後、クロストリジウム目細菌群を経口投与した後の糞便中の *Clostridium* cluster XIVa の数を Real-Time PCR にて比較した (Clostridiales 細菌群のみが定着したマウスの糞便中の *Clostridium* cluster XIVa の数を1とした時の相対比較)。B. 無菌マウス (Mock) または、コハク酸を7日間飲水投与した無菌マウス (Suc) に、*Salmonella* を感染後、1日目の糞便中の菌数を算定した。

酸、乳酸それぞれを7日間飲水投与した無菌マウスに、クロストリジウム目細菌群を経口投与したところ、コハク酸投与マウスのみで当該菌群の腸管内での増加が観察された(図3A)。さらに、無菌マウスまたは、コハク酸を投与した無菌マウスにクロストリジウム目細菌群を経口投与した後、*Salmonella*を感染させ、1日後の糞便中の菌数を比較した。その結果、コハク酸投与群において*Salmonella*の糞便中の菌数が有意に減少していた(図3B)。

(プロジェクト2)

次に、飼料Aと飼料B摂取マウスにおけるCDIの感受性を比較した。抗生物質を投与した後、飼料Aまたは飼料Bを2日間摂食させたマウスに*C. difficile*を経口感染させ、生存率を10日間観察した。その結果、飼料A摂取群では飼料B摂取群と比べ、*C. difficile*感染後の死亡日数が有意に長くなることが観察された(図4A)。また、感染1日後の大腸組織を観察すると、飼料B摂取群では炎症性細胞の浸潤が引き起こされていたが、飼料A摂取群では見られなかった(図4B)。さらに糞便

中の lipocalin-2 (炎症マーカー) の濃度も、飼料B摂取群と比べて飼料A摂取群で有意に低かった(図4C)。また、感染1日後の*C. difficile*の糞便中の菌数も飼料A摂取群では飼料B摂取群と比べて有意に少なかった(図4D)。以上の結果から、飼料Aの摂食は*C. difficile*感染に対する抵抗性を強化することが明らかとなった。食事は腸内細菌叢の組成や代謝に大きな影響を及ぼすことから、次に飼料A摂食による*C. difficile*感染抵抗性に腸内細菌が関与しているかどうかを検討した。飼料Aまたは飼料Bを摂食させた無菌マウスに*C. difficile*を感染させ、生存率お

よび糞便中の菌数を比較した。その結果、無菌マウスでは飼料Aを与えても*C. difficile*感染後の生存日数に違いは見られなかった(データ不記載)。感染1日後の糞便中の*C. difficile*の菌数も飼料A摂食群、飼料B摂食群で大きな違いは見られなかった(データ不記載)。以上の結果から、食餌の違いによる*C. difficile*感染病態の変化には腸内細菌が関与する可能性が示唆された。

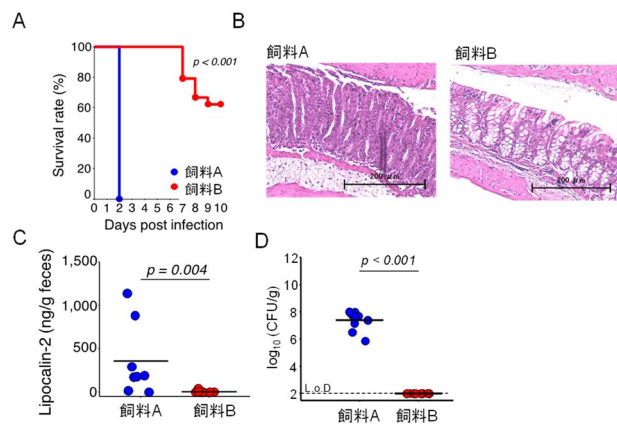


図4. 飼料Aの摂食は*C. difficile*感染に対する抵抗性を強化する。抗生物質を飲水投与したC57/BL6Nマウスに飼料Aまたは飼料Bを摂取させたその2日後に*C. difficile*を経口感染させた。A, マウスの生存率。B, 感染1日後の大腸組織のH&E染色像。Bar: 200μm。C, 感染1日後の糞便中のLipocalin-2濃度。D, 感染1日後の糞便中の*C. difficile*の菌数。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kim YG, Sakamoto K, Seo SU, Pickard JM, Gilliland MG III, Pudlo NA, Hoostal M, Li X, Wang TD, Feehley T, Stefka AT, Schmidt TM, Martens EC, Fukuda S, Inohara N, Nagler CR, N&uacute;ez G	4. 巻 356
2. 論文標題 Neonatal acquisition of Clostridia species protects against colonization by bacterial pathogens	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 315-319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aag2029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Isobe J, Maeda S, Obata Y, Iizuka K, Nakamura Y, Fujimura Y, Kimizuka T, Hattori K, Kim YG, Morita T, Kimura I, Offermanns S, Adachi T, Nakao A, Kiyono H, Takahashi D, Hase K	4. 巻 32
2. 論文標題 Commensal-bacteria-derived butyrate promotes the T cell-independent IgA response in the colon	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 243-258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 10件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Yun-Gi Kim
2. 発表標題 Neonatal Acquisition of Clostridia Species Controls Colonization Resistance Against Bacterial Pathogens
3. 学会等名 IMKASID（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yun-Gi Kim
2. 発表標題 Role of gut microbiota in intestinal pathogen colonization
3. 学会等名 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金 倫基
2. 発表標題 腸内細菌による腸管病原細菌の定着阻害作用
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yun-Gi Kim
2. 発表標題 Role of gut microbiota in health and disease
3. 学会等名 7th Tokyo Tech International Symposium on Life Science and Technology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yun-Gi Kim
2. 発表標題 Identification of gut microbial metabolite effective to obesity
3. 学会等名 Keio International Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金 倫基
2. 発表標題 抗肥満作用を発揮する腸内細菌由来代謝物の探索
3. 学会等名 バイオインダストリー奨励賞受賞者企画セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金 倫基
2. 発表標題 腸内細菌による腸管病原細菌の定着阻害作用
3. 学会等名 第28回内毒素LPS研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金 倫基
2. 発表標題 腸内細菌叢をターゲットにした創薬開発と課題
3. 学会等名 第23回日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金 倫基
2. 発表標題 腸内細菌による腸管病原細菌の定着阻害作用
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yun-Gi Kim
2. 発表標題 Role of gut microbiota in intestinal pathogen colonization
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----