

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07904

研究課題名(和文) 発癌と炎症を促進するEnterococcus属を取り巻く腸内環境の解明

研究課題名(英文) Roles of Enterococcus in carcinogenesis and inflammation

研究代表者

飯田 宗穂 (IIDA, Noriho)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：40705604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Enterococcus属は常在腸内細菌だが、免疫力の低下した宿主には病原性を持つ細菌であり、その存在を制御することが求められている。肝臓モデルマウスにおいて、健全な腸内細菌叢の移植がE. faecalisの腸内での増殖を抑制した。その結果、肝腫瘍数も減少させた。潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいては、健康者の細菌叢の移植により、E. faecium腸炎を抑制する。しかし、プレドニゾロンを内服していると、腸管からのムチンの分泌が抑制され、抗菌ペプチドの量も減少した。その結果、E. faeciumが増殖することが分かった。Enterococcusを制御する細菌叢や宿主の因子について解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌叢が人の健康と疾患に大きな役割を持つことが解明されてきた。しかし100種類以上かつ100兆個近い細菌を含む腸内細菌叢は複雑であり、腸内細菌叢を制御する治療手段は未だ十分に発達していない。細菌叢の構成はpH、酸素含有量、栄養素含有量、抗菌物質の存在、ホストの免疫など腸内環境に制御され決定される。そのため、それらの因子を決定する細菌と細菌の相互作用、細菌とホスト細胞の相互作用の解明が求められているが十分には解明されていない。

研究成果の概要(英文)：Because Enterococci are opportunistic pathogens, colonization and proliferation of Enterococci should be regulated. In mouse liver carcinogenesis model, transplantation of microbiota derived from healthy donors suppressed proliferation of E. faecalis in the gut, resulting in decrease of the number of liver tumors. In mouse colitis model, microbiota of healthy donors suppressed proliferation of E. faecalis, but prednisolone enabled colonization of E. faecium due to decrease of mucin and antimicrobial peptide. Thus, factors regulating Enterococci were clarified in this study.

研究分野：消化器病学

キーワード：腸内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢が人の健康と疾患に大きな役割を持つことが解明されてきた。しかし 100 種類以上かつ 100 兆個近い細菌を含む腸内細菌叢は複雑であり、腸内細菌叢を制御する治療手段は未だ十分に発達していない。細菌叢の構成は pH、酸素含有量、栄養素含有量、抗菌物質の存在、ホストの免疫など腸内環境に制御され決定される。そのため、それらの因子を決定する細菌と細菌の相互作用、細菌とホスト細胞の相互作用の解明が求められているが十分には解明されていない。

無菌マウスでは肝発癌モデルでの発癌が少なく、腸内細菌叢が肝発癌を促進することが報告されている。我々は今までの研究で、ヒトにおいても肝細胞癌患者の腸内細菌叢の構成は健常者と大きく異なり、肝癌患者細菌叢移植マウスでは有意に肝発癌が増加することを見出した。肝に発癌の無かったマウスと比較すると、発癌したマウスの腸内細菌叢には *Enterococcus* 属が有意に多いことが分かった。*Enterococcus faecalis* を投与したマウスで肝発癌の増加が確認され、発癌に因果関係を持っていた。投与に用いた *E. faecalis* は gelatinase というプロテアーゼを有する株であり、マウスの腸管透過性を亢進させていることが分かった。透過性の亢進によって便中の発癌物質が肝に流入し発癌を促進させたと結論した。また、炎症性腸疾患モデルである IL10 欠損マウスにおいて、*E. faecium* が腸炎を増悪させることも分かった。

面白いことは、これら *Enterococcus* 属は常在腸内細菌であり、食中毒菌のような外来菌ではない。肝癌患者の細菌叢は *Enterococcus* が増加しやすい腸内環境を作る一方で、健常者腸内環境には *Enterococcus* の増加を抑制するメカニズムが存在する。どのように他の細菌やホスト細胞が *Enterococcus* 属と相互作用し、*Enterococcus* を増減させる腸内細菌叢を形成しているか、というのが本研究の核心となる学術的な問いである。

2. 研究の目的

本研究では *Enterococcus* 属に関連した複雑な腸内細菌叢コミュニティの成立のメカニズムを解明することによって、肝発癌や腸炎を生じる腸内環境を制御する手がかりを見出すことが目的となる。細菌叢を構成するメカニズムの 1 つの鍵となるのが、細菌と細菌の相互作用の理解であるが、まだ解明すべきことが多い。*Enterococcus* を特異的に殺菌する抗菌薬は存在せず、メカニズムを解明することによって、肝発癌や腸炎を制御する新たな治療法に結びつく可能性がある。将来の創薬につながる創造的な仕事である。

3. 研究の方法

(A) *Enterococcus* 属と相互作用し、発育を抑制する細菌の推定

ヒト便から *Enterococcus* 属を分離培養する

肝癌患者や潰瘍性大腸炎患者便からの *Enterococcus* 属の分離培養を行い DNA を抽出し、シーケンシングを行い菌種の同定と遺伝子同定を行う。*Enterococcus* の毒性遺伝子として、gelE、sprE (プロテアーゼ)、asa1 (細胞凝集物質)、hyl (ヒアルロニダーゼ)、他、cylA、esp、epaB を想定している。

メタゲノムデータを用いたネットワーク解析

Enterococcus 属と相互作用する細菌を同定するために、ネットワーク解析を行う。他の細菌の相関を計算しネットワーク解析を行う。*Enterococcus* 属と相互作用し、排他的で共存しない菌種の候補を推定する。

(B) *Enterococcus* 属との相互作用生体内で観察

無菌マウスでの *Enterococcus* 属と発育抑制候補菌を無菌マウスに同時に投与する。便中の *Enterococcus* を定量し生着の程度を観察する。以下のモデルで肝発癌や腸炎が軽快するか観察する。

<肝発癌モデル>

肝発癌を促進する *E. faecalis* と、*Enterococcus* の発育を抑制する菌を同時に C57BL6 マウスに投与する。ジエチルニトロサミン、四塩化炭素にて肝発癌を誘導し、*Enterococcus* の抑制が発癌の抑制につながるか観察する。肝組織 mRNA、血液中の LPS などの代謝産物も測定する。

<腸炎モデル>

大腸炎を自然に発症する IL-10 欠損マウスに *E. faecium* を投与すると腸炎が増悪することが報告されている。*Enterococcus* の発育を抑制する菌を同時に投与し、28 日目に安楽死させ腸管の病理組織スコアと組織中サイトカインの mRNA 発現が軽減しているか確認する。

4. 研究成果

(1) 肝発癌における成果

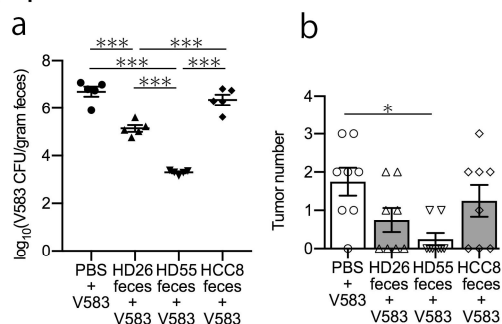
先行研究に置いて、HCVに感染した慢性肝疾患由来の肝癌患者(HD群)23名と、健常者24名(HD群)の便からDNAを抽出し、次世代シーケンサーMiseqを用いてシーケンシングを行った。細菌叢のunweighted UniFrac距離を計算し、PCoAで可視化し、統計解析PERMANOVAにて両群の比較を行うと、有意に両群が異なることが分かった($P=0.002$)。線形判別分析を利用したLEFSEを用いて両群間で存在に有意差のある細菌種を抽出したところ、28菌種が有意に異なっていた。HCC群に多かった細菌種には、*Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. anginosus*, *Lactobacillus salivarius*, *L. fermentum*, *Enterococcus faecalis*, *Veillonella parvura*など口腔内常在菌が多く含まれた。これら両群の便をマウスに移植し、ジエチルニトロサミン、四塩化炭素にて肝発癌を誘導して8ヶ月目に安楽死させたところ、HCC群での肝腫瘍発生率は79.5%と高かったのに対して、HD群では14.5%と腫瘍発生率は低かった。腫瘍陽性マウスと腫瘍陰性マウスの腸内細菌叢をシーケンシングにて比較したところ、腫瘍陽性マウスにはEnterococcaceae科の細菌が有意に多かったため、PCR法にて*E. faecalis*の便中コピー数を決定したところ、腫瘍陽性マウスに*E. faecalis*が増加していることが分かった。*E. faecalis*をマウスに経口かつ経直腸的に接種した後にジエチルニトロサミン、四塩化炭素にて肝発癌を誘導したところ、肝腫瘍数の増加が見られた。

以上のことから、肝発癌には*E. faecalis*が関与することが分かったため、ヒトの腸内細菌のシーケンシングデータから、*E. faecalis*と負に相関して存在する細菌種を同定した。33菌種が*E. faecalis*と有意に負の相関を持って腸内に存在することが分かった。このうち、上位3菌種である*Collinsella aerofaciens* ($r = -0.339$, $P = 0.0047$), *Coprococcus comes* ($r = -0.319$, $P = 0.0081$), *Blautia obeum* ($r = -0.279$, $P = 0.0213$)に着目した。

*Collinsella aerofaciens*と*Coprococcus comes*を多く含む健常者HD26の便と、*Blautia obeum*

を多く含む健常者HD55の便、さらに3菌種ともほぼ含まない肝癌患者HCC8の便を準備し、それぞれマウスに経口的かつ経直腸的に移植を行った。その後、*E. faecalis*株V583を接種し、便中の*E. faecalis*のコピー数を測定し定着を確認したところ、HD26便、HD55便を定着させたマウスではPBSを入れたコントロールマウスに比べて有意に*E. faecalis*の数が減少した。しかし、HCC8を定着させたマウスにおいては*E. faecalis*の数は減少しなかった。HD26便に比べてHD55便の方が、*E. faecalis*の増殖抑制効果が高かった(図1a)。これらのマウスにジエチルニトロサミン、四塩化炭素にて肝発癌を誘導したところ、HD55便を前もって移植した群において有意に肝腫瘍数が低下したが、HD26便、HCC8便を移植したマウスでは肝腫瘍数はコントロールのPBS群と変化しなかった(図1b)。これらのことから、健常者の便には*E. faecalis*の増殖をin vivoで抑制する効果があることが分かった。特にHD55便が*E. faecalis*の増殖抑制効果が高かったことから、HD55便に多く含まれる*Blautia obeum*が*E. faecalis*の増殖抑制効果をもたらす細菌種の候補の1つであると考えられた。

図 1



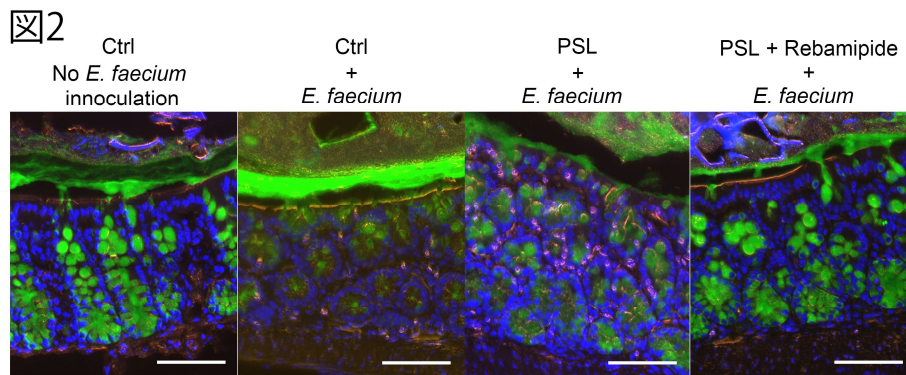
HDまたはHCCの便を移植した後に

*E. faecium*を接種し、便中コピー数を測定した(a)。その後薬剤発癌処置を行い肝腫瘍数を測定した(b)。

(2) 潰瘍性大腸炎における効果

先行研究において、*E. faecium*が健常者に比べて潰瘍性大腸炎患者に多いことを、便シーケンシングデータから明らかにしていた。潰瘍性大腸炎患者から分離した*E. faecium*を、腸炎モデルマウスであるIL10欠損マウスに経口的かつ経直腸的に接種すると腸炎が増悪することが分かった。

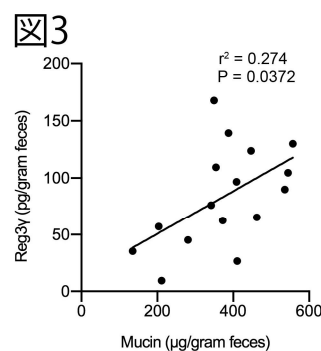
健常者の便を IL10 マウスにあらかじめ経口的かつ経直腸的に移植を行った。その後 *E. faecium* を接種すると、腸内への定着は軽度に留まった(図2)。しかし、経口ステロイド薬であるプレドニゾロンをマウスに内服させた状態で *E. faecium* を接種すると、多数の *E. faecium* が定着した。このメカニズムを調べるため、MUC2 を同時染色したところ、プレドニゾロン群においては MUC2 が少なくなっており、便中ムチン量も低下していることが分かった。ムチン分泌促進薬であるレバミピドを投与すると MUC2 発現が増加し、健常者便移植後の *E. faecium* 定着も減少した。これらマウスにおいて便中ムチン量と Reg3g の量を測定したところ、正の相関があることが分かった(図3)。Reg3g は抗菌ペプチドであり、*E. faecium* を殺菌する効果があるペプチドである。よって、ムチンは Reg3g のリザーバーとして腸内で働いており、プレドニゾロンを内服するとムチンとともに Reg3g の量が低下し、*E. faecium* の定着が増加し、腸内で増殖すると考えられた。*E. faecium* の増殖抑制においては、健常者便細菌叢が有効に働く可能性があるが、そのメカニズムとしてムチンと Reg3g が重要であると考えられた。プレドニゾロン内服下ではムチンや Reg3g が十分量に存在しないため健常者の便細菌叢移植の効果も乏しく、*E. faecium* の定着・増殖を抑制できないと考えられた。



E. faecium MUC2 DAPI

マウスに *E. faecium* を定着させた。PSL, プレドニゾロン内服群。Ctrl, 対照群。

以上から、*E. faecalis* や *E. faecium* の定着や増殖抑制を行うためには健常者の有する細菌叢が重要であり、ムチンや Reg3g といったホストの因子とも共同して働くということが分かった。



マウス便中のムチンと Reg3γ を測定した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	北村 和哉 (KITAMURA Kazuya) (00579633)	金沢大学・附属病院・助教 (13301)	
研究分担者	藤永 由佳子 (FUJINAGA Yukako) (60252954)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関