

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08008

研究課題名(和文) 潰瘍性大腸炎自然発症マウスとMaldi型質量分析計による大腸炎起因菌の同定

研究課題名(英文) Identification of causative bacteria for ulcerative colitis by using model mice and Maldi mass-spectrometer.

研究代表者

入江 厚 (Irie, Atsushi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師

研究者番号：30250343

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)：申請者らが樹立したヒト白血球抗原HLA-DR4のトランスジェニックマウスのホモ接合体は、潰瘍性大腸炎様の炎症性腸疾患を自然発症する。これまでの研究からこの疾患の病因には、HLA-DR4分子の過剰発現による小胞体ストレスと、何らかの腸内細菌が関与することが示されていた。本研究は上記大腸炎の起因菌の同定を目的とする。抗生剤のスペクトル等の検討の結果、上記大腸炎の発症にはヘリコバクター種の *Helicobacter japonicus* の存在が関与することが示された。この細菌はマウスの糞便から単離され、その駆除により発症が抑えられ、その後同菌を投与すると概ね2ヶ月以内に大腸炎を発症することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎(UC)の病因として腸内細菌叢の関与が古くから疑われているが、関与する菌種、発症機構については未だ明らかではない。近年、大腸上皮細胞に生じる小胞体(ER)ストレスがUCの有力な原因として注目されているが、ヒトのUCの病態に類似する実験動物モデルが少ないことが、UCの病因病態の解明とその治療法の確立を困難なものとしてきた一因となっている。本研究の成果はUC起因菌の存在とERストレス発生のメカニズム、および大腸のどの部位から大腸炎が発症しどのように進展するのかを明らかにし、従前の研究では得られなかった動的UCの病態解明に資することを目指す。

研究成果の概要(英文)：We have established human leukocyte antigen HLA-DR4 transgenic mice of which homozygotes spontaneously develop ulcerative colitis-like inflammatory bowel disease. Previous studies have shown that the etiology of this disease involves endoplasmic reticulum stress due to overexpression of HLA-DR4 molecules and some gut microbiota. The purpose of this study was to identify the causative organism of the above-mentioned colitis. As a result of examination of the spectrum of antibiotics, it was shown that the presence of *Helicobacter japonicus*, a *Helicobacter* species, is involved in the onset of the colitis. It was shown that this bacterium was isolated from the feces of the mice, its onset was suppressed by its elimination by administration of antibiotics, and then when the bacterium was administered, the colitis developed in about two months.

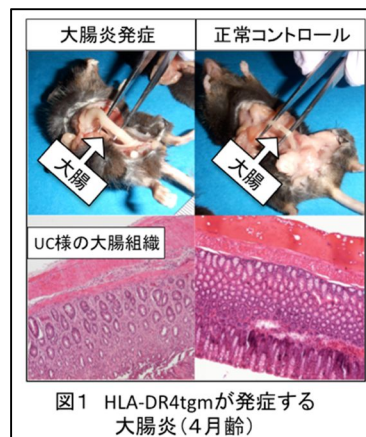
研究分野：免疫学

キーワード：潰瘍性大腸炎 炎症性腸疾患 小胞体ストレス HLA-DR トランスジェニックマウス 動物モデル

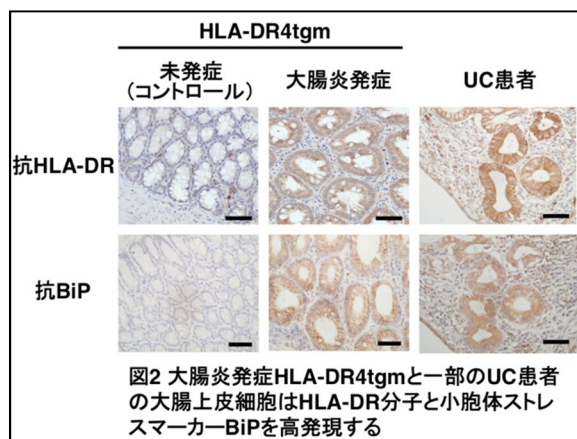
1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎(UC)は厚生労働省により「特定疾患」に指定される、原因不明の難病である。本疾患の患者数は人口 100 万人あたりおよそ 100 人程度と言われているが、診断法の改善等により、患者数(医療受給者証および登録者証の交付件数)は毎年約 10,000 人の割合で増加している。患者の多くは 20 代で発症し、大腸粘膜に潰瘍やびらんを生じ、発熱・体重減少・貧血などを伴う下痢や腹痛を繰り返し、日常生活に大きな支障をきたす。さらに生涯にわたり治療の継続を余儀なくされるため、根本的な治療法の開発が急務となっている。

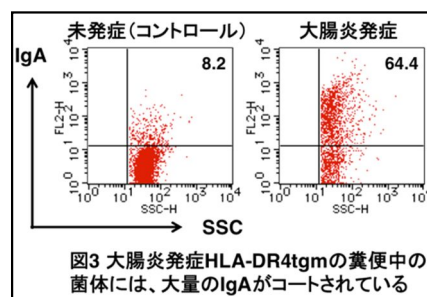
UC の病因として腸内細菌叢の関与が古くから疑われているが、関与する菌種、発症機構については未だ明らかではない。いっぽう近年、大腸上皮細胞に生じる小胞体(ER)ストレスが UC 有力な原因として注目されている。その根拠は、ER ストレス関連のシグナル伝達経路を担う分子の遺伝子破壊マウスに大腸炎が発症することである。これは、タンパク質の合成時に生じる不良品の蓄積を処理するシグナル伝達経路が働かないために、常時大量の粘液成分等を産生する大腸上皮細胞に ER ストレスがかかり、大腸炎を発症するためと考えられている。このような遺伝子改変マウスは、大腸炎の発症に至るシグナル伝達経路の解析には優れたツールであるが、UC 患者の発症メカニズムとは乖離がある。また大腸炎モデルとして簡便で広く使用される、人工的に腸内に炎症を誘導するデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)などの化学薬品の投与マウスも、予防法開発や発症後の経過を観察するには優れたモデルであるが、病因の解明には向かない。すなわち、これまでにヒトの UC の病態に類似する良い実験動物モデルが少ないことが、UC の病因病態の解明とその根本治療法の確立を困難なものとしてきた一因となっている。



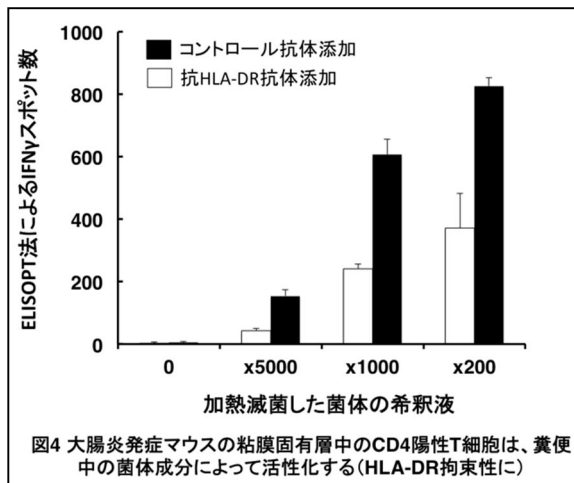
応募者らが樹立したヒト主要組織適合性抗原 HLA-DR4 トランスジェニックマウス(HLA-DR4tgmm)は、生後2~4ヶ月で下痢、脱肛、大腸の肥厚などを伴うヒト UC と似た所見の大腸炎を自然発症する(図1)。種々の検討の結果、これらのマウスでは大腸上皮細胞に HLA-DR4 分子が過剰に発現して同細胞に小胞体(ER)ストレスを生じさせ、これにより腸管のバリア機能が衰え、腸管の内容物が腸組織に侵入し、腸に炎症を起こすことが大腸炎発症の原因と考えられた。大腸上皮組織における HLA-DR の発現はヒト UC 患者でも観察される所見であり(日消誌 88, 1191-1199, 1991 年)、さらに応募者らが調べたところ、2004~2014 年間の熊本大学病院の UC 患者の大腸摘出標本 12 件のうち、6 件において HLA-DR の高発現を認め、さらにこれらの 3 件については、ER ストレスマーカーの 1 つである BiP の強陽性を認めた(図2)。



いっぽう、抗生剤の飲水投与により、HLA-DR4tgmm の大腸上皮細胞の HLA-DR4 分子の発現は抑制され、大腸炎の発症が完全に抑えられたことから、何らかの



腸内細菌が大腸上皮細胞の HLA-DR4 分子の発現を介して大腸炎の発症を引き起こすと考えられた。実際、大腸炎を発症する本マウス糞便中の菌体には、未発症のものと比較して大量の IgA 抗体が付着し（図 3）、HLA-DR4tgm の骨髓由来の樹状細胞が大腸炎発症マウスの糞便中の菌を取り込ませ、同マウスの大腸粘膜固有層中の CD4 陽性 T 細胞と共培養したところ、強い T 細胞の活性化が認められた（図 4）。以上より、本マウスの免疫系がある種の腸内細菌を認識しこれに反応することが示された。



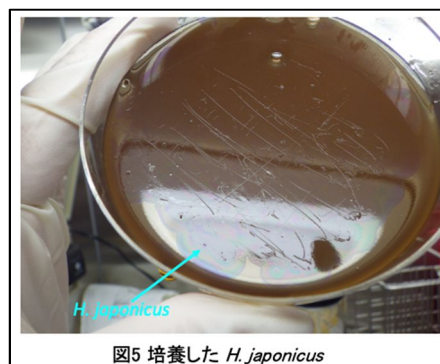
1
2. 研究の目的

本研究は、HLA-DR4tgm の腸内細菌と ER ストレスを介して大腸炎を自然発症するモデルを用いて、発症の引き金となる原因菌を同定する。そしてその起因菌の存在と ER ストレス発生のメカニズム、および大腸のどの部位から大腸炎が発症しどのように進展するのかを明らかにし、従前の研究では得られなかった動的 UC の病態解明資することを目的とする。

3. 研究の方法

アモキシシリン (A)、メトロニダゾール (M)、クラリスロマイシン (C) の飲水投与により HLA-DR4tgm ホモ接合体の大腸炎発症が著名に抑制されたことから、ヘリコバクター種の腸内細菌の関与を疑い、*Helicobacter japonicus* を大腸炎発症マウスの糞便より単離した。

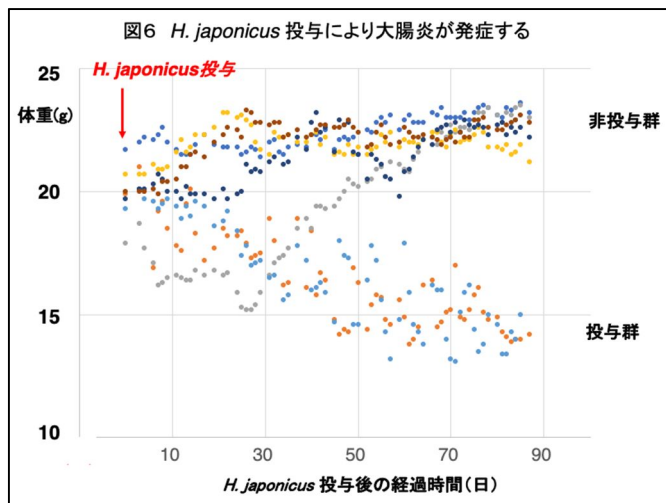
H. japonicus は微好気環境下にて羊脱繊維血液寒天培地上で培養し、増殖させた（図 5）。その懸濁液を A600 = 1.0 に調整し、100 μL をゾンデを用いてマウスに以下のように経口投与した。



マウスはあらかじめ AMC 3 種の抗生剤を飲水投与し、PCR 法にて *H. japonicus* 駆除を確認し、飲水を通常のものに戻す。*H. japonicus* 駆除の確認 5 日後に、HLA-DR4tgm ホモ接合体を 2 群に分け、一方には PBS 100 μL を、もう一方には上記 *H. japonicus* 懸濁液を経口投与し、その後の体重変化を観察した。

4. 研究成果

図 6 に示すように、*H. japonicus* 駆除後、同細菌の投与群は次第に体重が減少し、下痢、脱肛を呈した。いっぽう、非投与群には投与群で見られたような所見はなかった。



H. japonicus 駆除後およそ 90 日でマウスを屠殺し、その大腸について解析を行ったところ *H. japonicus* マウスの大腸は著明な肥厚が見られた（図 7）。病理組織学的な解析から、ホモ接合体の大腸組織には多数の単核球の浸潤が認められ、盂細胞の著減が認められた（図 8）。免疫組織科学的な解析から T 細胞、特に CD4 陽性 T 細胞の浸潤が顕著であった（図 9）。



図7 ホモ接合体の大腸(下)は、ヘテロ接合体のもの(上)と比較して肥厚が見られた。またホモ接合体では脱肛が見られた。

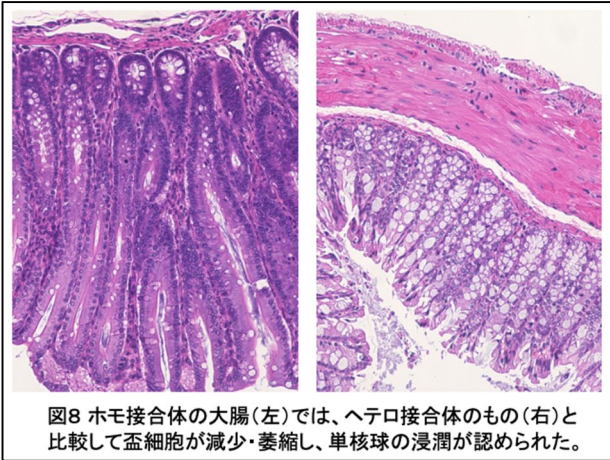


図8 ホモ接合体の大腸(左)では、ヘテロ接合体のもの(右)と比較して盞細胞が減少・萎縮し、単核球の浸潤が認められた。

以上より、1) *H. japonicus* は HLA-DR4tgm に存在する、2) *H. japonicus* を単離培養できる、3) 駆除したマウスは大腸炎を発症しないが、単離培養した同細菌の投与すると大腸炎を発症する。したがって、*H. japonicus* は HLA-DR4tgm ホモ接合体が自然発症する潰瘍性大腸炎様の大腸炎の、起因菌の少なくとも1つであると考えられた。

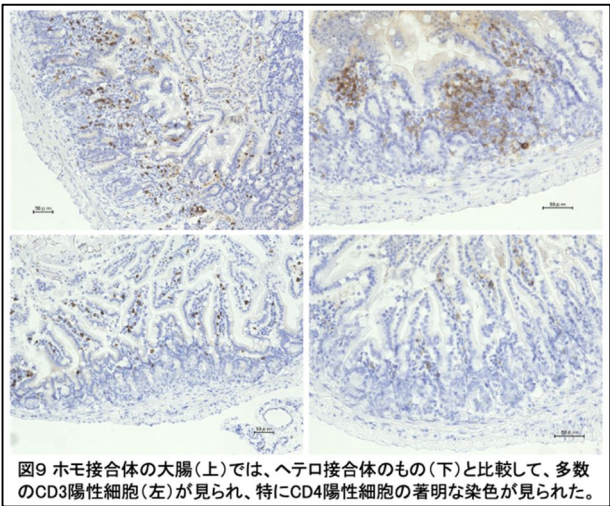


図9 ホモ接合体の大腸(上)では、ヘテロ接合体のもの(下)と比較して、多数のCD3陽性細胞(左)が見られ、特にCD4陽性細胞の著明な染色が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Imamura Ryuji, Kitagawa Saki, Kubo Tatsuko, Irie Atsushi, Kariu Toru, Yoneda Masakazu, Kamba Tomomi, Imamura Takahisa	4. 巻 81
2. 論文標題 Prostate cancer C5a receptor expression and augmentation of cancer cell proliferation, invasion, and PD L1 expression by C5a	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Prostate	6. 最初と最後の頁 147 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pros.24090	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 -
1. 著者名 Tsuruta M, Ueda S, Yew PY, Fukuda I, Yoshimura S, Kishi H, Hamana H, Hirayama M, Yatsuda J, Irie A, Senju S, Yuba E, Kamba T, Eto M, Nakayama H, Nishimura Y	4. 巻 7
2. 論文標題 Bladder cancer-associated cancer-testis antigen-derived long peptides encompassing both CTL and promiscuous HLA class II-restricted Th cell epitopes induced CD4+ T cells expressing converged T-cell receptor genes in vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncoimmunology	6. 最初と最後の頁 e1415687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2162402X.2017.1415687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsui H, Hazama S, Tamada K, Udaka K, Irie A, Nishimura Y, Miyakawa T, Doi S, Nakajima M, Kanekiyo S, Tokumitsu Y, Shindo Y, Tomochika S, Yoshida S, Iida M, Suzuki N, Takeda S, Yamamoto S, Yoshino S, Ueno T, Nagano H	4. 巻 42
2. 論文標題 Identification of a Promiscuous Epitope Peptide Derived From HSP70.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Immunother	6. 最初と最後の頁 244-250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CJI.0000000000000274	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsuruta M, Ueda S, Yew PY, Fukuda I, Yoshimura S, Kishi H, Hamana H, Hirayama M, Yatsuda J, Irie A, Senju S, Yuba E, Kamba T, Eto M, Nakayama H, Nishimura Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Bladder cancer-associated cancer-testis antigen-derived long peptides encompassing both CTL and promiscuous HLA class II-restricted Th cell epitopes induced CD4+ T cells expressing converged T-cell receptor genes in vitro.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncoimmunology	6. 最初と最後の頁 e1415687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2162402X.2017.1415687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Ueda S, Irie A, Senju S, Eto M, Nishimura Y
2. 発表標題 Effective combination immunotherapy for chemoresistant mouse bladder cancer using peptide vaccines and PD-1 blockade.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Irie A, Imamura T, Kubo T, Michibata Y, Nishimura Y
2. 発表標題 Imaging of ulcerative colitis diseased area-development by using model mice with luciferase reporter gene and inoculation of causative gut bacteria.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 入江厚, 今村隆寿, 久保多津子, 道端弥生, 西村泰治
2. 発表標題 ヘリコバクター種によりHLA-DR4トランスジェニックマウスに誘導される潰瘍性大腸炎の病態の解析
3. 学会等名 第72回日本細菌学会九州支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Irie A, Imamura T, Kubo T, Shibuya I, Sogo S, Nishimura Y.
2. 発表標題 Helicobacter species are involved in the pathogenesis of ulcerative colitis in the homozygotes of HLA-DR4 transgenic mice.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ueda S, Irie A, Senju S, Eto M, Nishimura Y.
2. 発表標題 A mouse model of combination immunotherapy for advanced and chemoresistant bladder cancer by using cancer-associated peptides vaccine and PD-1 blockade.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018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
研究 分担 者	今村 隆寿 (Imamura Takahisa) (20176499)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401)	

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
---------	---------