

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07544

研究課題名（和文）クレブシエラ菌の腸内定着阻害に関わる腸内細菌の同定

研究課題名（英文）Identification of the gut microbiota capable of colonization resistance against *K. pneumoniae*

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：腸炎の発症に関するクレブシエラ菌の腸内への定着阻害に関与する腸内細菌種をヒト健常者由来の便を用いてスクリーニングを行い、最終的に18菌株の細菌株セットがクレブシエラ菌の腸内定着阻害に寄与していることを突き止め、さらに18菌株が腸管炎症の抑制に関与していることを明らかにした。また、18菌株によるクレブシエラ菌の定着阻害は様々なメカニズムが想定されるが、細菌代謝産物や栄養競合により作用していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患はまだ根治療法が開発されておらず、治療薬の開発が急務である疾患の一つである。発症要因の一つに腸内細菌の異常が挙げられており、便移植等による治療法も検討されているが優れた治療効果は得られていない。本研究では、炎症性腸疾患の発症に関与しているクレブシエラ菌を腸内から排除するヒト健常者由来の18菌株を同定することに成功した。そこで、この18菌株を用いた、炎症性腸疾患に対する新たな治療薬や予防法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：I have searched intestinal bacteria that involved in the colonization resistance against *Klebsiella pneumoniae*. *K. pneumoniae* can contribute the activation of Th1 cell and induce intestinal inflammation. From the fecal samples collected from healthy volunteers, I screened and identified that a set of 18 bacterial strains have the ability of colonization resistance against *Klebsiella*. I found that these 18 strains strongly contributed to the inhibition of internal colonization of *Klebsiella*, and further clarified that 18 strains are involved in the suppression of intestinal inflammation. In addition, it is suggested that metabolites produced by 18 strains and nutritional competition are seem to be responsible for colonization resistance against *Klebsiella* by 18 strains.

研究分野：腸内細菌学

キーワード：クレブシエラ 腸内細菌 炎症性腸疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は大腸のみで連続性に炎症が起こる潰瘍性大腸炎と大腸から小腸にかけて非連続性に炎症が起こるクローン病の大きく 2 つの疾患があり、ともに病因が不明で根治療法が開発されておらず、厚生労働省からは指定難病に認定されている。現在、日本の潰瘍性大腸炎の患者数は 17 万人、クローン病は 4 万人程度と 10 年前から 2 倍以上と急増しており、また 10 代から 30 代の若い年代で発症することが多く、QOL の低下が学業や仕事に影響することから治療薬の開発が急務である。炎症性腸疾患の病因としては、遺伝的な要因と食事や腸内細菌などの環境要因が合わさり、免疫細胞の慢性的な活性化や過剰な活性化が引き起こされると推測されている。近年、炎症性腸疾患の発症に腸内細菌が関与しているという報告が数多くなされ、腸内細菌の異常が発症要因のひとつであることが強く示唆されている。我々のこれまでの研究において口腔由来のクレブシエラ菌(プロテオバクテリア門に属する細菌のひとつ)が腸内に定着すると大腸で強い Th1 細胞の活性化を引き起こすし、炎症の惹起・増悪に働くことを明らかにした。そこで、クレブシエラ菌の腸内への定着を阻害・抑制 (colonization resistance) する腸内細菌種を明らかにすることで、炎症性腸疾患の新たな治療薬や予防法の開発につながることを期待できる。

2. 研究の目的

我々のこれまでの研究において、クローン病患者の口腔由来の細菌を無菌マウスの腸内に定着させると、大腸粘膜固有層で IFN- γ を産生する CD4+ T 細胞である Th1 細胞が強く活性化されることを見出した。また、口腔由来細菌のうちクレブシエラ菌が大腸での Th1 細胞の活性化に寄与していること、クレブシエラ菌定着により腸管炎症が増悪されることを明らかにしてきた (Atarashi et al, 2017)。実際に炎症性腸疾患患者の便中にクレブシエラ菌やプロテオバクテリアが多く検出されていることから、炎症性腸疾患の発症にクレブシエラ菌が関与している可能性が強く示唆されている (Nagayama et al, 2020)。しかしながら、SPF マウスにクレブシエラ菌を経口投与しても腸管には定着せず、事前に SPF マウスに飲水による抗菌薬処理をした後、クレブシエラ菌を投与すると腸内への定着が見られた。このことから腸内細菌がクレブシエラ菌の腸内への定着を阻害していると考えられた。そこで本研究では、健康なヒトの腸内細菌のうち、クレブシエラ菌の腸内への定着を阻害している腸内細菌種を同定すること、その阻害メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) クレブシエラ菌の colonization resistance に関与するヒト腸内細菌の探索

無菌マウスにクレブシエラ菌を腸内に定着させ、その後健康者ヒト便を経口投与し、クレブシエラ菌の腸内からの排除にヒト由来腸内細菌が関与しているかを検証する。もし、投与したヒト便の中で排除能力に違いがあれば、一番迅速に排除できたヒト便を今後の実験に用いる。これまでの実験からアンピシリンやバンコマイシン、タイロシンなどの抗菌薬の飲水投与をした SPF マウスにおいてクレブシエラ菌の腸内への定着が促進 (colonization resistance が破綻) されることから、ヒト便投与と実験においてもアンピシリンやバンコマイシン、タイロシンなどの抗菌薬を飲水投与した場合に、クレブシエラ菌の腸内定着が促進されるかを検証する。もし特定の抗菌薬でクレブシエラ菌の排除ができなくなれば、その抗菌薬で死滅した腸内細菌種が colonization resistance に関与していると考えられる。そこでこれらの抗菌薬処理によりどのような腸内細菌種が定着しなくなるのかを、マウスの糞便から細菌 DNA を精製し、16S rRNA 遺伝子の網羅的シーケンスを行うことにより解析する。ある抗菌薬飲水でクレブシエラ菌の腸内への定着が見られたのと逆相関して減少していた腸内細菌種を探索し、colonization resistance に関与する候補細菌種としてリストアップする。

リストアップした候補細菌種をさらに絞り込むため、例えばその細菌種が耐性をもっていると推測される抗菌薬を投与して再度同様の実験を繰り返し、候補細菌種を 10-20 種類に絞り込む。

(2) クレブシエラ菌の colonization resistance に関与するヒト腸内細菌の同定

上記 (1) の実験で絞り込んだ細菌種を単離するため、クレブシエラ菌が排除され候補細菌が残っているマウスの腸内容物を採取し、数種類の腸内細菌培養用プレートに撒き細菌株を培養する。細菌を単離し、16S rRNA 遺伝子をシーケンスし候補細菌が単離できたかを確認する。もし単離できていない場合は、培地を変更し再度培養をやり直し候補細菌が単離できるまで繰り返す。10-20 種類の候補細菌が単離できたら、クレブシエラ菌を定着させたマウスに培養した 10-20 種類の候補細菌を投与し、クレブシエラ菌が腸内から排除されるか検証する。もし排除できた場合は、10-20 種類から細菌を減らしどの細菌種が colonization resistance の実行細菌であるかを解析する。もし排除できなかった場合は、上記 (1) の実験に戻り、再度スクリーニングから行う。

(3) 腸内細菌による colonization resistance の実行因子の同定と分子機構の解明

上記 b. の実験で明らかになった colonization resistance の実行細菌 (セット) とクレブシエラ菌の排除ができない、または弱かった細菌セットが定着したマウスの腸内容物を単離し、ト

ランスクリプトームおよびメタボローム解析を行う。ランスクリプトーム解析にはゲノム情報が必要なため、すべての細菌株のゲノム配列を解読する。メタボローム解析は GC/MS と LC/MS を用いて短鎖脂肪酸、胆汁酸、アミノ酸代謝物などの腸内細菌がこれまで産生することが知られている代謝物を中心に解析を行う。ランスクリプトームとメタボローム解析を統合し、どのような遺伝子、どのような代謝物が colonization resistance に関与しているのか推測する。もし、候補代謝物が入手可能な場合は *in vivo*, *in vitro* でクレブシエラ菌の排除、増殖抑制・殺菌ができるかを検証する。入手できない場合は候補遺伝子の欠損株を作成し、候補代謝物の減少とともにクレブシエラ菌の排除が弱くなることを検証する。

(4) 炎症性腸疾患モデルでの有用性の検討

IL-10 欠損マウスにクレブシエラ菌を定着させると重篤な腸炎を発症する。このモデルを用いて、上記(2)の実験で明らかになった colonization resistance の実行細菌(セット)または上記(3)の実験で明らかになった実行因子の炎症抑制効果を検証する。具体的には、クレブシエラ菌を定着させた IL-10 欠損マウスに colonization resistance の実行細菌(セット)または実行因子を経口投与することでクレブシエラ菌の腸内からの排除と炎症の減弱が見られるかを確認する。ヒトの炎症性腸疾患患者の腸内でも同様のメカニズムが働いているかを検証するため、メタゲノムデータを用いて、colonization resistance の実行因子の産生に関与する遺伝子がクレブシエラ菌の存在量と逆相関するか、colonization resistance の実行細菌(セット)がクレブシエラ菌の存在量と逆相関するかを解析する。

4. 研究成果

(1) まずヒト由来腸内細菌がクレブシエラ菌を腸内から排除できるのかを検証するため、5人の健康者より提供を受けたヒト便を用いて実験を行った。まず、無菌マウスの腸内にクレブシエラ 2H7 株を定着させた後、5人のヒト便をそれぞれ別々のマウスに経口投与した。その後便中に排出されるクレブシエラ 2H7 株の量を経時的に測定したところ、ヒト便を投与しないマウスでは数週間にわたり $1 \times 10^9 \sim 10^{10}$ CFU/g 便のクレブシエラ菌を排出し続けたが、ヒト便を投与したマウスでは徐々に便中のクレブシエラ菌量が減少し、1週間程度でほぼ検出できなくなる程度まで下がり、下がった状態が3週間以上維持されることがわかった。そこで次にこれらのヒト便の中にある腸内細菌のうちどのような細菌種がクレブシエラ菌の排除に効いているかを確かめるため、5人のうち3人の便から細菌株の単離を行い、健康者A便から37株、健康者B便から68株、健康者C便から43株を単離培養することができた。そこで、これらの単離菌のみでクレブシエラ菌の排除を行うことができるかを検討したところ、健康者A便由来37菌株を経口投与したマウスでは、迅速にクレブシエラ菌が腸内から排除され便サンプル投与マウスと同様の結果が得られた。

(2) 上記成果により同定した37菌株からクレブシエラ菌の排除を行う細菌株を絞り込むため、抗菌薬によるセレクションを行った。クレブシエラ単独定着マウスに37菌株を投与し、アンピシリンを投与したところ、クレブシエラ菌の腸内からの排除が抑制され、さらに37菌株を投与した後2週間にアンピシリンを投与および投与中止した場合、クレブシエラ菌は一時的に上昇し再度下降した。そこで、このクレブシエラ菌の上下と逆相関している細菌株を探索したところ37菌株のうち18菌株が有意に逆相関していた。そのため、このクレブシエラ菌と逆相関していた18菌株のみでクレブシエラ菌を排除できるかを検証したところ、ヒト便および37株すべて定着させた場合と同様に強力にクレブシエラ菌を腸内から排除できた。さらに37菌株から18菌株および18菌株と同種の細菌を除いた13菌株はクレブシエラ菌の排除能が弱いことを見出し、37菌株を排除能が強い18菌株と排除能が弱い13菌株に分けることに成功した。そこでこれらの菌株セットを比較することでクレブシエラ菌の排除メカニズムの探索を行う。

(3) クレブシエラ菌の排除能が強い18菌株と排除能が弱い13菌株を定着させたマウスの便中代謝産物の解析を行った。その結果リノール酸代謝物であるHYAやHYB、酢酸などが18菌株定着マウスで顕著に増加していた。また、18菌株と13菌株の腸内での機能の違いを遺伝子レベルで検討するため、すべての細菌株の全ゲノムシーケンスおよび腸内での遺伝子発現を比較するため、18菌株定着マウスと13菌株定着マウスの腸内容物のメタランスクリプトーム解析を行った。その結果、18菌株定着マウスの腸内細菌は糖代謝に関与する遺伝子群の発現が高いことが明らかになった。以上のことから、ヒト健康者便由来の18菌株はリノール酸代謝物や酢酸、糖代謝産物または栄養競合により腸内のクレブシエラ菌の排除を行なっていることが強く示唆された。

(4) 最後にマウスの腸炎モデルを用いて、クレブシエラ菌排除による18菌株の炎症抑制効果について検討を行った。IL-10欠損マウスは無菌環境では腸炎を発症しないが、クレブシエラ菌を単独定着させると強い腸炎を引き起こす。そこでこのクレブシエラ菌定着IL-10欠損マウスにクレブシエラ菌の排除能が強い18菌株と排除能が弱い13菌株を経口投与し、クレブシエラ菌の排除と腸炎の抑制効果を検証した。その結果、予想通りクレブシエラ菌の排除能が強い18菌株の投与群では排除能が弱い13菌株と比較して腸内クレブシエラ菌の量が有意に減少し、腸管の炎症スコアも有意に低下していた。以上のことから、今回炎症性腸疾患の発症に関与していることが強く示唆されるクレブシエラ菌を腸内から排除するヒト健康者由来の18菌株を同定することができ、炎症性腸疾患の治療や予防に応用可能な成果を得ることができた。クレブシエラ菌の排除メカニズムの分子機構解明についてはさらなる

解析が必要であり、今後の課題にしたい。

<引用文献>

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*. 2017 Oct 20;358(6361):359-365.

Nagayama M, Yano T, Atarashi K, Tanoue T, Sekiya M, Kobayashi Y, Sakamoto H, Miura K, Sunada K, Kawaguchi T, Morita S, Sugita K, Narushima S, Barnich N, Isayama J, Kiridooshi Y, Shiota A, Suda W, Hattori M, Yamamoto H, Honda K. TH1 cell-inducing *Escherichia coli* strain identified from the small intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gut Microbes*. 2020 Nov 9;12(1):1788898.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagayama Manabu, Yano Tomonori, Atarashi Koji et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 TH1 cell-inducing Escherichia coli strain identified from the small intestinal mucosa of patients with Crohn's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut Microbes	6. 最初と最後の頁 1788898 ~ 1788898
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19490976.2020.1788898	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新 幸二
2. 発表標題 宿主免疫系に影響を与える腸内細菌の同定
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新幸二
2. 発表標題 腸内細菌による炎症制御
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 薬剤耐性細菌又は炎症惹起性細菌に対する抗菌組成物	発明者 本田賢也、安間恵子、新幸二、成島聖子、古市宗弘、河口	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、WO/2020/179868	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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