

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17690

研究課題名（和文）気管支喘息発症における腸内Staphylococcus属の役割解明

研究課題名（英文）Elucidation of asthma onset factors by intestinal Staphylococcus analysis

研究代表者

伊藤 崇 (Takashi, Ito)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・訪問研究員

研究者番号：20823561

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では喘息モデルマウスにおける腸内Staphylococcus属の役割解明を目指した。具体的には1:喘息モデルマウスにおける腸内Staphylococcus属の網羅的解析、および2:喘息モデルマウスにおいて腸管内Staphylococcus属の割合と腸管内代謝物の相関解析を行った。その結果、1:喘息モデルマウスにおいてStaphylococcus aureusの割合が上昇していること、2:喘息モデルマウスでは腸管内Staphylococcus属と糞便中乳酸量が逆相関することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気管支喘息の発症には遺伝的要因、環境要因双方の影響が考えられているが、現在の所詳細なメカニズムは明らかでない。本結果は腸内Staphylococcus属が気管支喘息の発症に寄与している可能性を示唆している。腸内細菌叢としてのStaphylococcus属と疾患の関連について詳細な報告をした論文はなく、この点で学術的意義を認める。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the role of intestinal Staphylococcus spp. in mouse models of asthma. Specifically, 1: Comprehensive analysis of intestinal Staphylococcus spp. in mouse models of asthma, 2: Correlation Analysis of intestinal metabolites with the amount of Staphylococcus spp. The results showed that 1: the amount of Staphylococcus was increased in the asthma model mice, 2: the amount of Staphylococcus spp. was inversely correlated with fecal lactic amount acid in mouse models of asthma.

研究分野：気管支喘息

キーワード：気管支喘息

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は気道を場とした慢性アレルギー性炎症であり、気道への好酸球とリンパ球の浸潤、粘液過剰産生、気道過敏性により特徴づけられる。(Lambrecht, et al., Nat Immunol, 16, 2015)。気管支喘息を中心とするアレルギー疾患の発症には他の多くの疾患と同様に複数の遺伝的要因、環境要因双方がお互いに影響すると考えられているが、それらがどのように影響を与えているか詳細なメカニズムは現在のところ明らかになっていない。

ヒト腸内には約 10^{10} 個に及ぶ細菌が生息しており、これらの一群を腸内細菌叢と呼ぶ。腸内細菌叢は生体内で一定の群として保たれており、dysbiosis と呼ばれる群の変化、乱れは炎症性腸疾患、ループス腸炎などの自己免疫疾患、癌・糖尿病・高血圧などの生活習慣病を引き起こすことが数多く報告されている(Kundu, et al., Cell, 171, 2017)。さらにアレルギー疾患と腸内環境の関連を報告した論文では、食物アレルギーを発症する児では、生後3カ月の腸内細菌叢の多様性が低下していることが明らかになっており (Azad, et al., Clin. Exp. Allergy, 45, 2015)。また食物アレルギーモデルマウスの報告では、腸内細菌の一つである Clostridium 属が IL-22 を誘導することにより、食物アレルゲンの血中への流入を抑制し、食物アレルギーの発症抑制に寄与していることが明らかとなっている (Stefka, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111, 2014)。これらの報告より、腸内細菌叢を中心とする腸内環境の変化が宿主のアレルギー・免疫応答に影響を与えることが強く示唆される。

他方、我々は先行研究より喘息を発症している小児群では喘息を発症していなかった小児群に比べ、糞便中の Staphylococcus 属の発現量が上昇していることを見出した(未発表データ)。以前より Staphylococcus 属の1種である Staphylococcus aureus の皮膚や鼻腔内などの各種臓器への常在化が各種アレルギー性疾患発症および悪化と関連することが報告されており、本結果は腸内細菌叢内の Staphylococcus 属が気管支喘息の発症に寄与している可能性を示唆しているがその詳細なメカニズムは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は自然抗原の一つである HDM (House Dust Mite) を用いた喘息モデルマウス実験および詳細な腸内細菌叢解析、腸管内代謝物解析を行うことにより、気管支喘息発症における腸内 Staphylococcus 属の役割解明を目指す。

3 . 研究の方法

【研究計画 1】HDM 誘発性喘息モデルマウスにおける腸内 Staphylococcus 属の経時的、網羅的解析

我々はヒト横断研究を用いた先行研究により、喘息発症群と喘息非発症群では糞便中で腸内細菌の一種である Staphylococcus 属の割合に差が見られることを見出した（未発表データ）。研究計画 1 ではこれらの先行 data を基に HDM 誘発性喘息モデルマウスにおける腸内 Staphylococcus 属の経時的、網羅的解析を行った。

(1) HDM 誘発性喘息モデルマウスにおける腸内 Staphylococcus 属の経時的、網羅的解析

SPF(Specific-antigen-free)下で飼育された野生型マウスに HDM を経気道投与し、アレルギー性気道炎症の惹起を行う。HDM に対するアレルゲンの陰性対照としては牛血清アルブミンの投与を行う。アレルギー性気道炎症を惹起するプロトコールの中で経時的に糞便を回収し、回収した糞便をメタノール処理、DNA 抽出を行った後、細菌叢塑性解析（16S アンプリコン解析）を行う。行った解析 data の中でアレルギー性気道炎症を起こしたマウスと陰性コントロールマウスにおける腸内 Staphylococcus 属の経時的・網羅的解析を行った。

【研究計画 2】腸内 Staphylococcus 属に関連する腸内代謝物における HDM 誘発性喘息モデルマウスへの影響の検討

近年、腸内代謝物の中で短鎖脂肪酸の一種であるプロピオン酸の濃度と Staphylococcus 属の活性が相関することが報告されている。(Ciarlo, et al., Sci Rep, 6, 2016)。これらの先行論文を基に研究計画 3 では腸内 Staphylococcus 属に関連する腸内代謝物を同定し、同定した腸内代謝物における HDM 誘発性喘息モデルマウスへの影響を検討する。

(1) Staphylococcus 属定着ノトバイオームマウスにおける糞便上清中水溶性代謝物、短鎖脂肪酸、脂溶性代謝物の経時的、網羅的解析

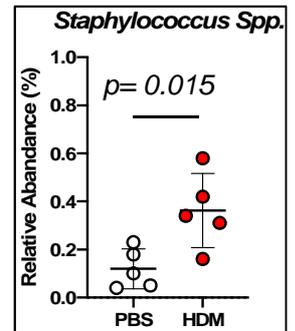
Staphylococcus 属を定着させたマウスおよびコントロールマウスに HDM を経気道投与しアレルギー性気道炎症の惹起を行い、アレルギー性気道炎症を惹起するプロトコールの中で経時的に糞便を回収する。採取された糞便はメタノール処理を行い、上清を誘導体化処理後に質量分析計を用いたガスクロマトグラフィー質量分析法(GC/MS)による水溶性代謝物の経時的・網羅的解析を行うことにより、腸内 Staphylococcus 属と相関のある腸内代謝物の同定を行った。

4. 研究成果

(1) 研究計画 1 の研究成果

まず、SPF 環境下で飼育した野生型 B6J マウスに HDM を経気道投与することによりアレルギー性気道炎症の惹起を行い、気道炎症惹起後の糞便を回収した。その後、回収した糞便内の DNA 抽出を行った後次世代シーケンサー (Miseq, イルミナ社) を用いた細菌叢塑性解析 (16S アンプリコン解析) を行った。行った解析 data の中でアレルギー性気道炎症を起こしたマウスと陰性コントロールマウスを比較し、糞便 *Staphylococcus* 属の比較を行った。その結果、HDM を経気道投与した群では糞便 *Staphylococcus* 属が上昇していることが明らかになった (図 1)。

図 1



(2) 研究計画 2 の研究成果

野生型 B6J マウスに HDM を経気道投与しアレルギー性気道炎症の惹起を行い、アレルギー性気道炎症を惹起するプロトコールの中で経時的に糞便を回収する。採取された糞便はメタノール処理を行い、上清を誘導体化処理後に質量分析計を用いたガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC/MS) による水溶性代謝物の経時的・網羅的解析を行うことにより、腸内 *Staphylococcus* 属と相関のある腸内代謝物の同定を行った。その結果、腸内 *Staphylococcus* 属の割合と短鎖脂肪酸の 1 つである乳酸が有意に逆相関することを明らかにした。その他の短鎖脂肪酸では有意差を認めなかった。

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|