

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19753

研究課題名（和文）機能性プロバイオティクスによる疾患治療と予防への挑戦

研究課題名（英文）Development of functional probiotics as therapeutics or prophylactics for autoimmune diseases

研究代表者

桑原 知巳（Kawahara, Tomomi）

香川大学・医学部・教授

研究者番号：60263810

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：自己抗原に対する免疫応答は免疫寛容と呼ばれるメカニズムにより抑制されている。この免疫寛容に重要な役割を果たすのが制御性T細胞である。本研究では、制御性T細胞を誘導する酪酸を産生する*Clostridium butyricum*（ブチリカム菌）に自己免疫性疾患の原因となる自己抗原を発現させ、腸管粘膜局所で自己抗原に対する免疫寛容を誘導する機能性プロバイオティクスの開発を試みた。*Clostridium perfringens*由来のIV型線毛に自己抗原を融合し、細胞壁に提示するブチリカム菌の作製に成功した。また、本菌の酪酸産生を誘導する植物発酵抽出物を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患患者は日本国内だけでも数百万人と見積もられており、現在も増加している。自己免疫疾患の発症と関連する遺伝子変異や環境因子は複雑で疾患毎に異なっており、その多くは効果的な根治療法がなく、炎症と免疫を強力に抑えるステロイドや免疫抑制剤による対症療法が中心である。近年、関節リウマチなどに対して、病態形成に強く関連する物質（炎症性サイトカイン）を制御する抗体薬品が開発され効果を上げているが、これらも自己免疫疾患を根治するものでなく、また、100%の効果を上げることは出来ていない。本研究成果は、新たな自己免疫疾患の治療法や予防法の開発に重要な知見を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：Immune responses to self-antigens are suppressed by a mechanism called immune tolerance. Regulatory T cells play an important role in this immune tolerance. In this study, we expressed an autoimmune disease-associating peptide in *Clostridium butyricum*, which produces butyric acid that induces regulatory T cells, to develop the functional probiotics as therapeutics or prophylactics for autoimmune disease. We succeeded in creating a *C. butyricum* that displays an autoantigen on the cell wall by fusing it to type IV fimbriae protein derived from *Clostridium perfringens*. In addition, we identified a plant fermentation extract that induces butyric acid production in this bacterium.

研究分野：腸内細菌学

キーワード：Autoimmune disease Probiotics *Clostridium butyricum* butyric acid antigen display

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患患者は日本国内だけでも数百万人と見積もられており、現在も増加している。自己免疫疾患は免疫の中心的役割を担う T 細胞が自己の成分(自己抗原)に対して過剰な免疫応答を起こすことで生じる。通常は自己抗原に対する免疫応答は免疫寛容と呼ばれるメカニズムにより抑制されている。この免疫寛容に重要な役割を果たすのが制御性 T 細胞である。自己免疫疾患には関節リウマチや炎症性腸疾患など多種多様な疾患が含まれる。発症と関連する遺伝子変異や環境因子は複雑で疾患毎に異なっており、その多くは効果的な根治療法がなく、炎症と免疫を強力に抑えるステロイドや免疫抑制剤による対症療法が中心である。近年、関節リウマチなどに対して、病態形成に強く関連する物質(炎症性サイトカイン)を制御する抗体薬品が開発され効果を上げているが、これらも自己免疫疾患を根治するものでなく、また、100%の効果を上げることは出来ていない。自己免疫疾患の根本的な治療には自己抗原への過剰な反応を抑える制御性 T 細胞を誘導することが鍵となる。ヒト腸内常在菌の中には、菌体成分や酪酸等の代謝産物を介して宿主免疫の過剰な反応を抑制するものが報告されている。

### 2. 研究の目的

ヒトの腸管には 1,000 種、100 兆個にも及ぶ細菌が定着し、腸内フローラを形成している。腸内フローラは食物の消化、微量栄養素の供給、免疫調節や種々の薬物代謝など、宿主にとって有益な生理活性を有する。この腸内フローラの破綻が、アレルギー、肥満、糖尿病、炎症性腸疾患、精神疾患などの発症リスクを高めることが知られている (Cell Mol Life Sci., 2017)。近年、ある種の腸内細菌の代謝産物(酪酸)が腸管粘膜における制御性 T 細胞の分化を促進することが報告されている。また、酪酸を産生する *Clostridium butyricum* (ブチリカム菌)の菌体成分に制御性 T 細胞の分化誘導作用が存在することも報告されている。ブチリカム菌は整腸剤として臨床的に使用されているため安全性も確立されており、制御性 T 細胞の誘導活性も有することから自己免疫疾患の治療用プロバイオティクス(機能性腸内細菌)として利用できる可能性が高い。T 細胞の免疫応答は病原体の排除に重要な役割を担っており、非特異的な制御性 T 細胞の誘導はステロイドや免疫抑制剤と同じく感染症のリスクを高める。そこで、本研究ではブチリカム菌に自己免疫性疾患に関連する自己抗原を発現させ、この抗原特異的な制御性 T 細胞を誘導することにより、自己抗原に対する過剰免疫応答のみを抑制する手法を確立する。理論的にはブチリカム菌に発現させる自己抗原を入れ換えるだけで幅広い自己免疫疾患の治療への応用も可能となる。本研究では、自己免疫性疾患の研究に汎用されている実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルマウス(EAE マウス)を用い、機能性腸内菌による自己免疫疾患の新たな治療法の確立に挑む。

### 3. 研究の方法

#### (1)「自己抗原発現ブチリカム菌の作製」

自己抗原発現ブチリカム菌の作製に用いるためには、遺伝子操作が可能な菌株の選定を行う必要がある。いくつかの菌株について、形質転換能やシャトルベクターの接合伝達能を比較した。また、遺伝子操作に使用するシャトルベクターの安定性を評価した。

#### (2)「自己抗原発現ブチリカム菌の腸管内定着に関する検討」

上記実験により選定したブチリカム菌をマウスに経口接種し、腸管内での生残菌数を測定するとともに、4 週間に腸管免疫系の変動について検討する。

#### (3)「自己抗原表面提示系の開発」

ブチリカム菌 JCM1311 株は遺伝子操作が可能であり、本研究ではこの菌株を使用する。組換えプラスミドを使用し、近縁菌種である *Clostridium perfringens* の細胞壁結合タンパク質である IV 型線毛タンパク質(Cpp)やブチリカム菌の細胞壁結合ドメインに EAE モデルマウスの自己抗原である MOG ペプチドを融合させたタンパク質をブチリカム菌で発現させる。

#### (4)「自己抗原発現ブチリカム菌の酪酸産生を誘導する手法の検討」

各種植物発酵物の抽出液をブチリカム菌の培養液に添加し、24 時間及び 48 時間後の酪酸産生量を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) *C. butyricum* における遺伝子操作法の開発

*C. butyricum* を細胞表面提示に用いるためには、デザインした plasmid DNA を細胞内に導入する必要がある。現在までに *C. butyricum* を用いた遺伝子組み換えに関する報告は一報のみしかなく確立された手法とは言い難い。そこで当研究室において *C. butyricum* における遺伝子操作法の確立を目指し幾つか検討した。まず、最も簡便で効率的であるエレクトロポレーション法を用いた形質転換を試みた。使用した菌株は、JCM1391 株、NBRC3315 株および NBRC3858 株を用いた。10% glycerol を用いて作製した各コンピテントセルに *E. coli*-*Clostridium* シャトルベクターである pJIR418, pXCH, pXEM, pMTL82151, pMTL83151, pMTL84151, pMTL85151 をそれぞれ添加し、2.0 kV/200 Ω の条件で印加した。しかしながらいずれのベクターでも形質転換体は得られな

かった。そこで次に *C. perfringens*, *C. difficile*, *C. sporogenes*, *C. botulinum*, *C. beijerinckii* において確立されている接合伝達法を試みた。大腸菌ドナー株は S17-1 株を用い pMTL83151 の接合伝達を行ったところ、NBRC3858 株以外の株において形質転換体を得られた。ドナー：レシピエント比は 20:1 の方が高効率であった(図1)。

次に異なる replicon を持つ pMTL82151, pMTL84151, pMTL85151 についても検討したところ、JCM1391 株では全ての形質転換体を得られた(図2)。*C. butyricum* の cryptic plasmid である pCB102 由来の replicon を持つこと、および使用した plasmid の中で最も接合伝達効率が良かった pMTL83151 を今後の実験に使用することとした。次に *C. butyricum* に導入した plasmid が安定的に維持され、導入した plasmid のまま再回収できるのか調べた。導入した pMTL83151 を *C. butyricum* から抽出した後、*E. coli* DH5 $\alpha$ 株に再形質転換した。Plasmid を抽出したのち電気泳動で確認したところ、どのクローンも plasmid の巨大化が認められた(図3-A)。そこで、採取した plasmid pMTL83151' の全塩基配列を調べたところ、元の大きさ 4,476-bp から 18,675-bp へと巨大化していた。これは、3,734 塩基目への Tn7 様配列の挿入によるものであることが判明した。そこで、挿入部位付近に存在する attTn7 認識配列を部位特異的変異導入によって改変した pMTL83151-SDM を構築した。再度 *C. butyricum* に導入し plasmid の改変が認められないか確認したところ、pMTL83151-SDM に関しては plasmid の巨大化は確認されなかった(図3-B)。以上、*C. butyricum* における接合伝達法を確立するとともに、遺伝子組換えに使用するシャトルベクターの構築に成功した。

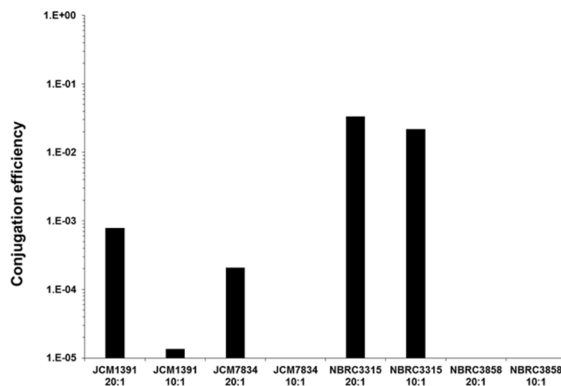


図1. 各種*C. butyricum*株におけるpMTL83151の接合伝達効率

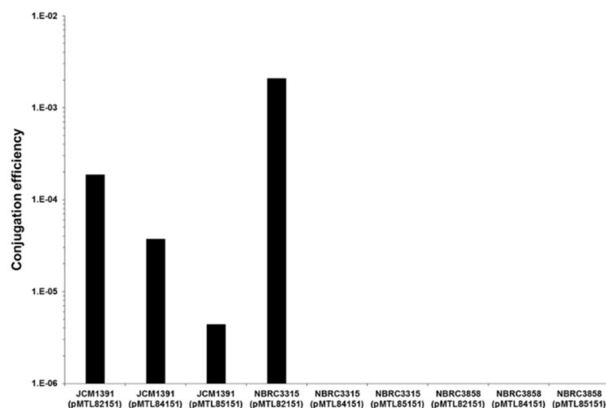


図2. 各種plasmidの接合伝達効率の比較

## (2) *C. butyricum* の使用菌株選定

細胞表面提示に用いる菌株の選定において、以前報告された制御性 T 細胞や IL-10 の誘導能が認められるか確認する必要がある。そこで、 $\sim 10^5$  cfu の *C. butyricum* I88 株、JCM1391 株および NBRC3315 株を C57BL/6 無菌マウスに経口投与し 6 週間飼育したのち、大腸粘膜固有層リンパ球を採取し、T 細胞分化をフローサイトメトリー解析した。また、分化マーカー遺伝子 (IL-17a, IL-10, Foxp3) の発現量を定量的 PCR 法にて解析した。コントロールとして Segmented filamentous bacteria (SFB) の種便も投与した。その結果、各 *C. butyricum* 菌株は  $10^6$ - $10^7$  cfu/g で比較的安定的に腸管内で維持された(図4)。また FACS 解析から、JCM1391 株および NBRC3315 株ノットパイオートマウスにおいて無菌マウスと比べて Foxp3<sup>+</sup>Treg の割合増加が確認された(図5)。ま

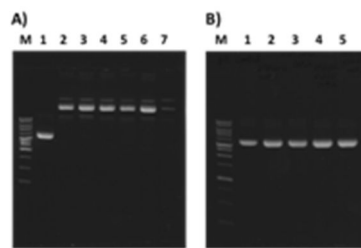


図3. A) *C. butyricum*に導入したpMTL83151の安定性。1. 導入前pMTL83151 (コントロールpMTL83151)。2. JCM1391株に導入したpMTL83151。4. 5. NBRC3315株に導入したpMTL83151。6. 7. NBRC3858株に導入したpMTL83151。B) *C. butyricum*に導入したpMTL83151-SDMの安定性。1. 導入前pMTL83151-SDM (コントロールpMTL83151-SDM)。2. 3. JCM1391株に導入したpMTL83151-SDM。4. 5. NBRC3315株に導入したpMTL83151-SDM。

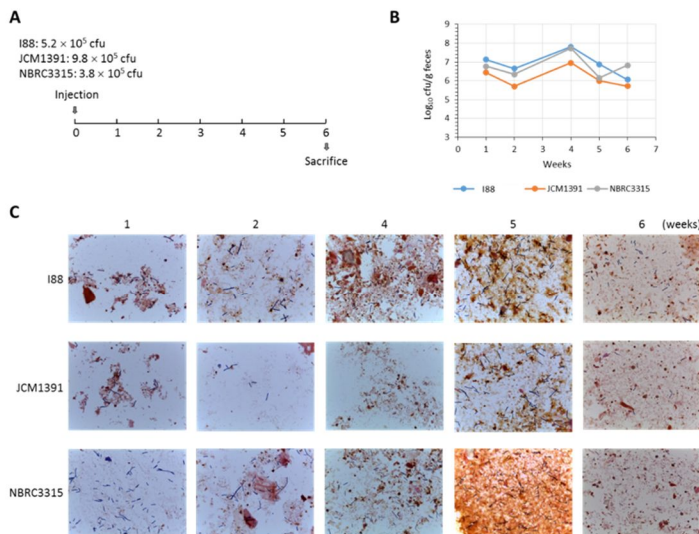


図4. *C. butyricum*の使用菌株選定のための動物実験。A) スケジュール。 $\sim 10^5$  cfuの*C. butyricum* I88株、JCM1391株およびNBRC3315株をC57BL/6無菌マウスに経口投与し6週間飼育した。B) 糞便生菌数。C) グラム染色像。

た、iTreg (Nrp-1<sup>+</sup> cells)の割合に関しては、I88 株および NBRC3315 株ノトバイオートマウスにおいて増加が確認された(図6)。分化マーカー遺伝子(IL-17a, IL-10, Foxp3)の発現量に関しては、小

(3) *C. butyricum* における Sortase-Mediated Protein Display System (SPDS)の構築細胞表面提示に用いる菌株の選定において、以前報告された制御性 T 細胞や IL-10 の誘導能が認められるか確認する必要がある。そこで、 $\sim 10^5$  cfu の *C. butyricum* I88 株、JCM1391 株および NBRC3315 株を C57BL/6 無菌マウスに経口投与し 6 週間飼育したのち、大腸粘膜固有層リンパ球を採取し、T 細胞分化をフローサイトメトリー解析した。また、分化マーカー遺伝子(IL-17a, IL-10, Foxp3)の発現量を定量的 PCR 法にて解析した。コントロールとして Segmented filamentous bacteria (SFB)の種便も投与した。その結果、各

*C. butyricum* 菌株は  $10^6$ - $10^7$  cfu/g で比較的安定的に腸管内で維持された(図4)。また FACS 解析から、JCM1391 株および NBRC3315 株ノトバイオートマウスにおいて無菌マウスと比べて Foxp3<sup>+</sup>Treg の割合増加が確認された(図5)。また、iTreg (Nrp-1<sup>+</sup> cells)の割合に関しては、I88 株および NBRC3315 株ノトバイオートマウスにおいて増加が確認された(図6)。分化マーカー遺伝子(IL-17a, IL-10, Foxp3)の発現量に関しては、腸において SFB 投与による IL-17A 発現の増加が確認されたが、*C. butyricum* 投与による Foxp3 mRNA 発現の上昇は認められなかった(図7)。

しかし、SFB および酪酸菌投与によって、IL-10 発現の増加が確認された。図4に示す通り *C. butyricum* は腸管への定着率が低く、特にグラム染色像からすると6週目では菌の減少が顕著であった。そこで、投与菌数を増加させるとともに投与回数を週2回にして分化マーカー遺伝子の発現解析を行った。 $\sim 10^7$  cfu の *C. butyricum* I88 株、JCM1391 株および NBRC3315 株を C57BL/6 無菌マウスに経口投与し 2 週間および 4 週間飼育したのち、盲腸および大腸における分化マーカー遺伝子(IL-10 および Foxp3)の発現量を定量的 PCR 法にて解析した(図8)。その結果、I88 株および JCM1391 株ノトバイオートマウスの 2 週目盲腸組織において Foxp3 mRNA 発現の上昇が認められた。また、JCM1391 株では定着 4 週目の大腸においても Foxp3 発現の増加が確認された。IL-10 の発現に関しては、JCM1391 株のノトバイオートマウスにおいて、定着 4 週目の大腸において発現上昇が認められた。以上の結果より、比較的高い Treg および IL-10 誘導能を有する JCM1391 株を今後の研究に用いることとした。

小腸において SFB 投与による IL-17A 発現の増加が確認されたが、*C. butyricum* 投与による Foxp3 mRNA 発現の上昇は認められなかった(図7)。しかし、SFB および酪酸菌投与によって、IL-10 発現の増加が確認された。図4に示す通り *C. butyricum* は腸管への定着率が低く、特にグラム染色像からすると6週目では菌の減少が顕著であった。そこで、投与菌数を増加させるとともに投与回数を週2回にして分化マーカー遺伝子の発現解析を行った。 $\sim 10^7$  cfu の *C.*

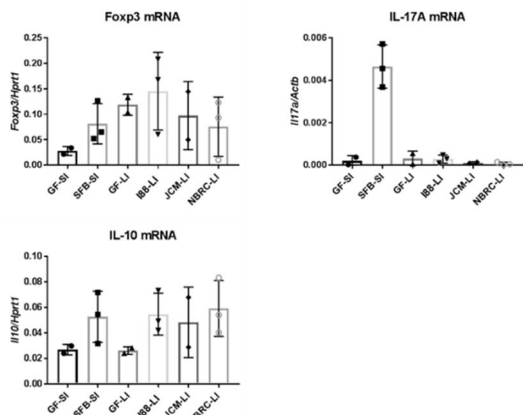


図7. 分化マーカー遺伝子 (IL-17a, IL-10, Foxp3) の転写発現量。

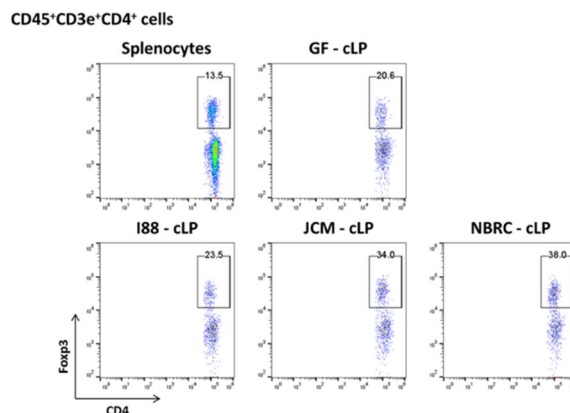


図5. FACS解析。大腸粘膜固有層リンパ球 (LPL画分) を採取し、Foxp3<sup>+</sup>Tregへの分化をフローサイトメトリー解析した。

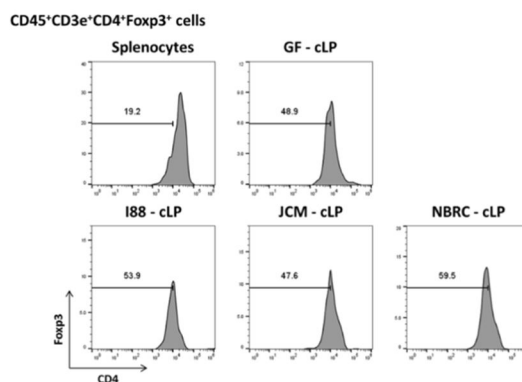


図6. FACS解析。大腸粘膜固有層リンパ球 (LPL画分) を採取し、iTreg (Nrp-1<sup>+</sup> cells)の割合をフローサイトメトリー解析した。

また、JCM1391 株では定着 4 週目の大腸においても Foxp3 発現の増加が確認された。IL-10 の発現に関しては、JCM1391 株のノトバイオートマウスにおいて、定着 4 週目の大腸において発現上昇が認められた。以上の結果より、比較的高い Treg および IL-10 誘導能を有する JCM1391 株を以後の研究に

用いることとした。

### (3) *C. butyricum* における Sortase-Mediated Protein Display System (SPDS)の構築

グラム陽性菌の表層タンパク質の中には、分泌後その C 末端領域に存在する LPXTG 配列を認識/切断する Sortase (Membrane cysteine transpeptidase) を介して細胞壁と共有結合(Sorting)しているものが存在し、線毛 (Sortase-mediated pili) も含まれる。これらは菌の宿主組織への付着・

定着、細胞への侵入等に関与すると考えられている。*Clostridium perfringens* のゲノム上には、*C. perfringens* pili (Cpp) 遺伝子として *cppB* (Tip pilin)-*cppA* (Pilin)-*srtC* (Pilin-specific sortase) cluster が存在し、CppA の発現、菌体表層における重合体の形成には SrtC が必須である事が明らかとなっている。我々は、外来タンパク質を CppA と融合させ Pili-like covalent polymer として提示させるため、xylose-inducible shuttle vector に signal peptide (CwlO 由来 23 aa)::MCS::HA tag::CppA 融合遺伝子を導入し、更に下流の *srtC* 遺伝子も含めた pXCSPDS1 を構築している(図9)。そこでこの SDPS システムが *C. butyricum* にそのまま適応可能かどうか検討した。まず、pXCSPDS1 から xylose 誘導制御領域および MCS-HA tag 領域を pMTL83151-SDM の MCS にクローニングし、pMTL83152-SDM-SPDS1 を構築した。この plasmid を JCM1391 株に接合伝達により導入し *C. butyricum* JCM1391 (pMTL83152-SDM-SPDS1)株の作製に成功した。本菌株を用いて CppA の発現を確認するとともに、提示用外来タンパク質を CppA と融合させ発現させることに成功した。

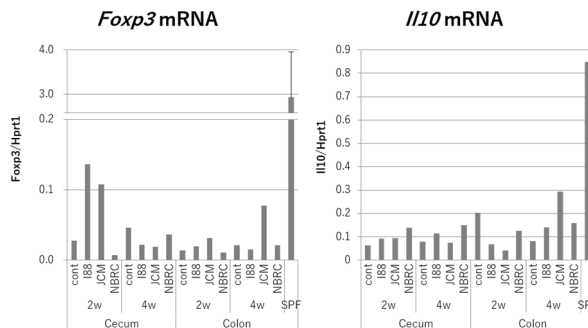


図8. 分化マーカー遺伝子 (Foxp3, IL-10) の転写発現量

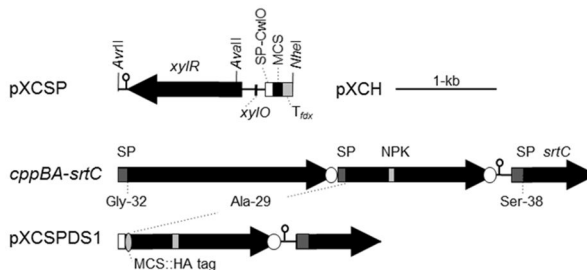


図9. Sortase-Mediated Protein Display System (SPDS)用ベクターの模式図。

### (4) 自己抗原発現ブチリカム菌の酪酸産生を誘導する手法の検討

自己抗原発現ブチリカム菌の投与により、腸管内で自己抗原に対する制御性 T 細胞を誘導するためには、ブチリカム菌による酪酸産生能を誘導する手法の開発が必要である。そこで、植物発酵物エキスをブチリカム菌の培養液に添加し、24 時間及び 48 時間後の酪酸量を比較した。その結果、植物発酵物エキス B にブチリカム菌の酪酸産生を強く促進する作用が同定された。今後は、自己抗原表層提示ブチリカム菌とこの植物発酵物エキス B からなるシンバイオティクス療法が、マウスの実験的自己免疫性脳炎の症状を抑制できるかを検討する予定である。

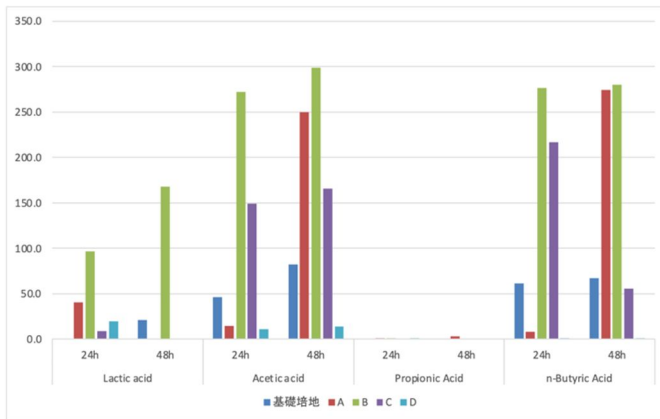


図10. 植物発酵エキスによるブチリカム菌からの酪酸産生誘導

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uemura Yuta, Hiroshima Yuka, Tada Ayano, Murakami Keiji, Yoshida Kaya, Inagaki Yuji, Kuwahara Tomomi, Murakami Akikazu, Fujii Hideki, Yumoto Hiromichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis Outer Membrane Vesicles Stimulate Gingival Epithelial Cells to Induce Pro-Inflammatory Cytokines via the MAPK and STING Pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 2643 ~ 2643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines10102643	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 Hotta Fumika, Eguchi Hiroshi, Kuwahara Tomomi, Nakayama-Imaohji Haruyuki, Shimomura Yoshikazu, Kusaka Shunji	4. 巻 13
2. 論文標題 Disturbances in the ocular surface microbiome by perioperative antimicrobial eye drops	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2023.1172345	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 Munyeshyaka Emmanuel; 今大路治之; 多田彩乃; 桑原知巳
2. 発表標題 Phase variable regulation of surface structures by promoter inversions in Bacteroides vulgatus
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nafisa Tabassum; 今大路治之; Munyeshyaka Emmanuel; 多田彩乃; 桑原知巳
2. 発表標題 Reactivity of autologous serum IgG to antigenic substances in intestinal lavage fluid derived from pediatric patients with Ulcerative Colitis
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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	今大路 治之(中山治之)  (Imahoji Haruyuki)  (80294669)	香川大学・医学部・講師    (16201)	

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