

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450444

研究課題名(和文)ヘリコバクター属菌持続感染とATP分泌性腸球菌の炎症性腸疾患発症における役割解明

研究課題名(英文)Pathogenicity of Helicobacter species and role for development of inflammatory bowel diseases

研究代表者

山中 仁木(YAMANAKA, Hitoki)

長崎大学・先端生命科学研究支援センター・助教

研究者番号：30533921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Helicobacter属菌には病原性を示し人獣共通感染症菌と認識される菌種が多々あり、現在も新たな菌種が分離検出されている。本研究では、実験用マウスで高頻度に検出される同属の未分類菌MIT01-6451について、性状と病原性について明らかにすることを目的とした。その結果、本菌の形態や生化学的性状と共に、生息部位である下部消化管以外に免疫不全マウスにおいて肝臓の壊死や分娩異常など生殖器で病原性を示す可能性を見出した。また、免疫不全マウスで脱肛など盲腸以下の大腸で炎症を示し、免疫正常マウスでも各種免疫反応が有意に亢進することがわかり、本菌の病原性とそのメカニズムの一端を明らかにしつつある。

研究成果の概要(英文)：Many Helicobacter species indicate pathogenicity and novel species have been isolated recently. The purpose of this study was characterization and clarifying the pathogenicity of unclassified species, MIT01-6451, detected frequently in laboratory mice. The morphological and biochemical characterization of MIT01-6451 were demonstrated and its colonization sites were clarified which were cecum and colon of mice. Since MIT01-6451 infection in immunodeficient mice induced necrosis in liver and abnormal delivery, our study indicated that MIT01-6451 shows pathogenicity in hepatic and reproductive tissues other than intestine. The infection in immunodeficient mice also showed rectal prolapse and inflammation in cecal and colonic mucosa. In immunocompetent mice, although the clinical symptoms were not observed, inflammatory and various Th responses were detected in lymphocytes of cecal and colonic mucosa. A part of mechanisms of MIT01-6451 pathogenicity in mice were clarified in this study.

研究分野：実験動物感染症、細菌性人獣共通感染症

 キーワード：ヘリコバクター属菌 大腸粘膜 盲腸粘膜 粘膜固有層リンパ球 ヘルパーT細胞反応 感染防御機構  
生殖器 ATP分泌性腸球菌

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患はクローン病と潰瘍性大腸炎の二つに大別され、慢性炎症を繰り返し下痢症状に悩まされる難治性疾患である。これまでに原因として遺伝的要因の他、腸内常在細菌あるいは病原細菌が発症に重要な役割を担っていることが指摘されてはいるが、その詳細なメカニズムは解明されていない。

ヘリコバクター属菌は哺乳動物や鳥類の消化管や肝臓から分離され、病原性を示すものも多い。同属菌は、主に胃に生息する gastric 型と胆管系あるいは盲腸以下の下部消化管に主に生息する enterohepatic 型に分けられ、これらの菌は炎症性腸疾患の発症に何らかの関与が疑われている。また、現在も多くの未分類菌が検出される一方、同属菌はガス環境や栄養要求性など培養条件が菌種や株によって異なり取り扱いが難しく病原性に関する知見の蓄積が乏しい。

一方、腸管腔内に分泌された ATP が、腸管粘膜における IL-17 産生ヘルパー T 細胞 (Th17) あるいは肥満細胞を活性化し腸炎発症を誘導することが明らかになった (Atarashi et al., *Nature*, 2008; Kurashima et al., *Nat. Commun.*, 2012)。また、腸内常在細菌には ATP 分泌性腸球菌 (*Enterococcus gallinarum* など) が存在し、これらの細菌が腸管粘膜免疫に影響を及ぼしている可能性が指摘された (Iwase et al., *J. Clin. Microbiol.*, 2010)。しかしながら、どのようなメカニズムで均衡が保たれていた菌叢バランスを破綻し、ATP 分泌性腸球菌群が優勢となり腸粘膜における炎症を誘導するかについては明らかではない。

申請者らは、国内で飼養される実験用マウスで未分類のヘリコバクター属菌 MIT01-6451 が同属菌の中で高頻度に検出され、主に盲腸以下の下部消化管に生息する enterohepatic 型であることを明らかにした。そこで、この菌の分離と病原性を含む性状解析を行い、実験結果の精度に影響するなど実験用マウスが保有する影響について評価する必要性が考えられた。また、申請者らは、実験用マウスの糞からバンコマイシン耐性腸球菌である *E. gallinarum* や *E. casseliflavus* が実験用マウスで広く保有されていることを明らかにした。

### 2. 研究の目的

本研究では、マウスにおける MIT01-6451 の病原性を明らかにするとともに持続感染による大腸における炎症誘導の分子機序を明らかにする。また、実験用マウスで広く保有される腸球菌の ATP 分泌性を含む性状を明らかにする。更に、その腸球菌の腸内分布が MIT01-6451 菌持続感染によりどのような影響を受け、大腸粘膜における炎症誘導機構に関係しているかを明らかにすることを最終目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験用マウスから検出されるバンコマイシン耐性腸球菌の性状解析

当大学動物実験施設に実験動物生産業者 (4 社) から導入される各種系統マウスの糞を回収し、その抽出液を 6 µg/ml バンコマイシン添加ブレインハートインフュージョン培地にて 2 日間好気培養し、バンコマイシン耐性腸球菌を検出した。これらの菌の同定は同定キット (シスメックスピオメリュ) を用いて行い、薬剤耐性についてはディスク法を用いて調査した。また、耐性機序を調べるため、これまでに明らかになっている耐性遺伝子を PCR により検出およびシーケンス解析を行った。ATP 分泌性については、RPMI 培地に各分離菌を培養後、菌をフィルター除去した上清中 ATP を測定キット (Promega) を用いて検出し調べた。

#### (2) MIT01-6451 の分離と形態学・生化学的性状解析

感染マウスの糞抽出液を用いてメンブレンフィルター法により 3-5 日間程度好気培養して菌分離を行った。培地は、7% 馬溶血液添加ブルセラ培地あるいは Trypticase soy 培地、その他変法スキロー培地 (ニッスイ) を用いた。

細菌の形態はネガティブ染色を行い電子顕微鏡により観察し、生化学的性状解析は主に API campy 同定キット (シスメックスピオメリュ) を用いて行った。

#### (3) MIT01-6451 の垂直感染と繁殖効率への影響の検討

BALB/c および C57BL/6 マウスは、PBS に浮遊させた MIT01-6451 を 3-4 日毎に経口投与し感染させた。免疫不全 (SCID) マウスは、経口感染させた免疫正常マウスと同居させることで感染させた。これらの各系統において雌雄マウスを mating し、妊娠 16-18 日目における母マウスを安楽殺後、生殖器や乳腺、そして胎子組織と各胎盤を採取し各組織中 DNA を抽出した。また、出産後の新生子と母マウスの生殖器等を採取し同様に各組織の DNA を抽出した。これらの DNA を試料とし、MIT01-6451 遺伝子の検出を行った。同時に、感染による胎子数や産子数への評価も行った。

#### (4) MIT01-6451 感染による大腸における免疫応答解析

上記と同様の方法で感染させた BALB/c と免疫不全 (SCID) マウスを用いた。感染マウスの盲腸および大腸の粘膜固有層リンパ球を EDTA およびコラゲナーゼ消化後に Percoll 密度勾配により回収した。回収されたリンパ球から RNA を抽出し cDNA 作製後にリアルタイム PCR により各種サイトカイン mRNA 発現を相対定量した。血清および糞中抗体価は ELISA により測定した。組織学的観察のため

各組織を 10%中性ホルマリンで固定後、パラフィン包埋し、各切片はヘマトキシリン・エオジン染色の他各種免疫細胞を免疫染色により検出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験用マウスから検出されるバンコマイシン耐性腸球菌の性状解析

市販マウス 21 系統の内、19 系統のマウスからバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) である *E. gallinarum* 19 菌と *E. casseliflavus* 5 菌分離された。これらの分離菌が保有するバンコマイシン耐性遺伝子は、*vanC1* あるいは *vanC2/3* でそれぞれバンコマイシンに対し低度耐性を示した。これらの分離菌からはグラチナーゼや溶血素産生は見られず、病原関連遺伝子 (6 種) も検出されなかった。また、分離菌の中にはエリスロマイシン (マクロライド系、1 菌)、テトラサイクリン系 (2 菌)、ニューキノロン系 (3 菌) に耐性を示す菌が存在した。各種薬剤耐性機序について調べたところ、キノロン耐性に関する DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼ遺伝子の変異の他、キノロン耐性およびマクロライド耐性に関する薬剤結合阻害、不活化酵素あるいは排出ポンプの各種遺伝子は検出されなかった。しかし、テトラサイクリン系薬剤に耐性を示した分離菌 2 菌からは *tet(0)* 遺伝子が検出された。一方、各分離菌について ATP の分泌を検出したところ、好気 (図 1) および嫌気培養でほぼ全ての分離菌の培養上清中に ATP が検出され分泌性であることが分かった。

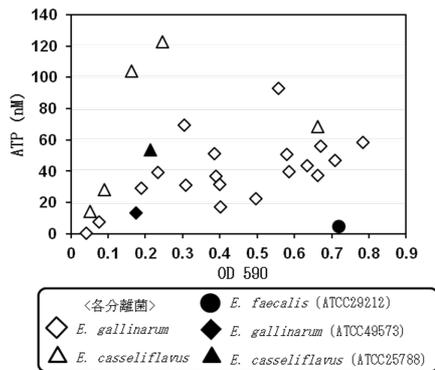


図1. 分離菌培養上清中のATP濃度

これらの結果から、実験用マウスにおいてバンコマイシン低度耐性腸球菌が広く保有されており、その腸球菌には機序は明らかではないがその他の薬剤に対して耐性を示すことを明らかとなった。また、これらの腸球菌は ATP 分泌性であることから、抗生剤の服用やストレスなどで腸内細菌叢バランスが破綻することでこれらの腸球菌が優勢となり、腸粘膜における Th17 反応や肥満細胞を活性化し腸炎を誘導する可能性が考えられた。

##### (2) MIT01-6451 の分離と性状解析

実験用マウスの糞抽出液を用いて培養したところ、1 mm以下の極小のコロニーある

はフィルム状コロニーを形成して増殖し分離することができた。この菌について、グラム陰性のらせん状桿菌で両端に 1 本ずつの有鞘の鞭毛を保有し、カタラーゼ・オキシダーゼ産生でウレアーゼ非産生性など生化学的性状を明らかにし新菌種であると考えられた (図 2)。

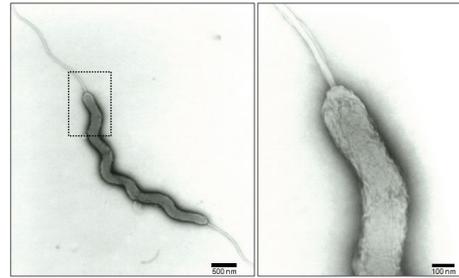


図2. MIT01-6451 分離菌 (電子顕微鏡像)

##### (3) マウスにおける MIT01-6451 の垂直感染と繁殖効率への影響

免疫正常の BALB/c および C57BL/6 マウスでは、胎子への感染は認められず、母マウスの子宮・膈・乳腺および各胎子の胎盤からも菌遺伝子は検出されなかった。免疫不全 (SCID) マウスでは、胎子への感染は認められなかったものの、母マウスの一部で生殖器や乳腺および胎盤から菌遺伝子が検出された。また、免疫正常の 2 系統マウスでは出生直後の新生子は感染しておらず、生後 1 週間頃から感染が認められた。出産した母マウスの生殖器や乳腺からも菌遺伝子は検出されなかった。SCID マウスでは、免疫正常マウスと同様に出生直後の新生子は感染が認められなかった。しかし、SCID マウスの中には分娩異常を示し、死産や娩出中に死亡する母マウスも認められた。それらの死亡胎子の胎盤を調べたところ、菌遺伝子が検出された。

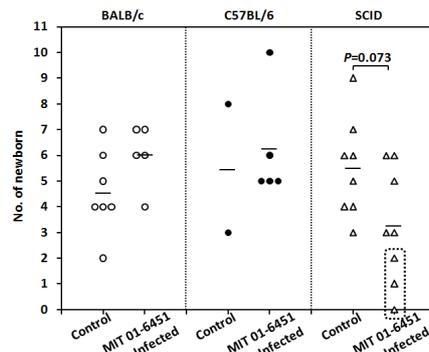


図3. MIT01-6451 感染による産子数への影響

これらの結果から、MIT01-6451 は胎盤を介し胎子への垂直感染を起こす可能性は極めて低いものの、宿主が免疫不全の場合、MIT01-6451 は腸管腔外の生殖器組織に移行し分娩や妊娠維持機構に影響を示し繁殖効率の悪化を引き起こす可能性が考えられた (図 3)。また、新生子への感染は、娩出時の産道感染あるいは出生後母乳を介した感染の可能性は極めて低く、出生後の母マウスとの接触や食糞行動により経口感染を起こすと考えられた。これらの得られた知見は実験

用マウスの微生物学的品質管理上有用である。

#### (4) 免疫不全(SCID)マウスの肝臓および下部消化管における MIT01-6451 の病原性

MIT01-6451 に感染した免疫不全(SCID)マウスは、肉眼的には約 30%の雄で脱肛と肝臓に白斑が認められた。雌では、脱肛は認められなかったが、同様に肝臓に白斑が観察された。白斑が認められた肝臓組織を観察したところ肝細胞の壊死と単球系細胞による貪食像と免疫細胞の浸潤が認められ、巣状壊死を起こしていた(図 4a・b)。また、この肝臓組織 DNA から MIT01-6451 遺伝子が検出された。

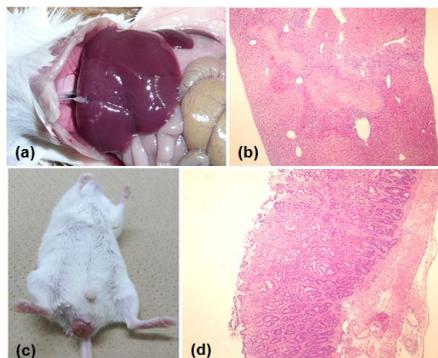


図4. MIT01-6451感染SCIDマウスの肝臓と直腸の病理像  
(a) 肝臓の白斑(壊死), (b) 巣状壊死(HE染色)像  
(c) 脱肛 (d) 脱肛を示したマウス直腸の組織(HE染色)像

脱肛を起こした雄マウスの盲腸以下の大腸組織を観察したところ、直腸付近で激しい免疫細胞の浸潤と粘膜組織の肥厚が認められ、免疫染色では顕著な好中球の浸潤が検出された(図 4c・d)。しかし、結腸の近位に行くに従いその炎症は認められなかった。また、盲腸で好中球の浸潤など炎症像が認められた。一方、雌の SCID マウスでは脱肛を示す個体はなく大腸の長さに変化はなかったが、盲腸重量が非感染群と比較して軽く盲腸粘膜において炎症が起きている可能性が考えられた。更に、盲腸および大腸粘膜固有層リンパ球の各種サイトカイン mRNA 発現を調べたところ、炎症性(TNF)および Th1 系サイトカイン(IFN) mRNA 発現が有意に亢進しており、現在、雌マウスにおける盲腸以下の消化管の病理組織変化について調べている。

以上の結果から本研究では、MIT01-6451 は腸管粘膜において適切な免疫応答による感染防御機構が機能しなければ、下部消化管粘膜に侵入し炎症を起こすとともに、肝臓に移行するなど消化管以外の組織で病態を誘導することを明らかにした。

#### (5) 免疫正常マウスにおける MIT01-6451 の消化管への病原性

BALB/c マウスに MIT01-6451 を経口感染させ、感染後 3 週(短期感染群)および 6 ヶ月以上(長期感染群)の両群で調べたところ、両群とも体重・大腸の長さ・盲腸重量に変化はなく肉眼的病理変化は認められなかった。しかし、長期感染群の盲腸および大腸の病理組織変化を観察したところ、孤立リンパ節数につ

いて盲腸粘膜では差はなかったが大腸粘膜で非感染群に比べ有意に多かった。また、細胞浸潤など炎症病理スコアリングにより評価したところ、大腸では差はなかったが盲腸粘膜で有意に高く軽度の炎症が認められた(図 5)。そこで、盲腸およびそれ以下の大腸

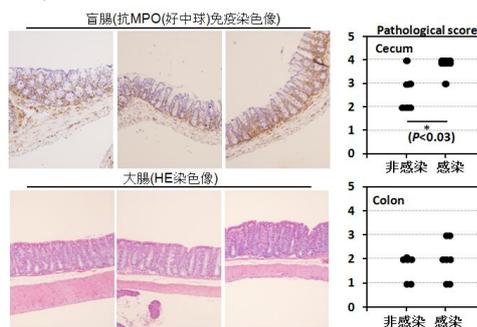


図5. 長期感染群盲腸および大腸の組織像と病理スコア  
(組織像はそれぞれ別のマウス組織)

の粘膜固有層リンパ球を採取し各種サイトカイン mRNA 発現を調べたところ、長期感染群では発現が高い傾向を示すサイトカインもあったがいずれも有意差は認められなかった。一方、短期感染群では、Th1(IFN)・Th2(IL-4)・Th17(IL-17A)の各 Th 反応系サイトカイン発現が有意に亢進していた。また、同時に調節性 Treg(IL-10)の発現も有意に亢進していた。更に血中 IgA および IgG、糞中 IgA 力価を調べたところ、各群で非感染群と比較して有意に高く、長期感染群で短期感染群と比較して有意に高かった(図 6)。

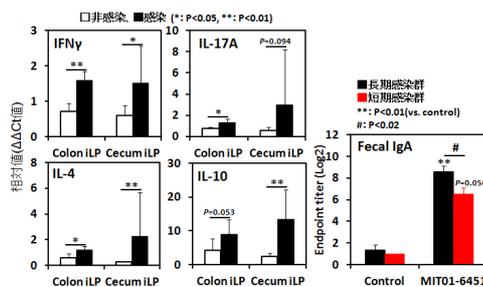


図6. 短期感染群の盲腸および大腸粘膜固有層リンパ球のサイトカイン mRNA発現と長期・短期感染群の糞中IgA力価

これらの結果から、MIT01-6451 感染初期には、腸管粘膜における感染防御機構が十分に機能する前に菌の組織侵入を受け各種免疫反応が活性化すると同時に、Treg 系サイトカイン(IL-10)発現も亢進し過剰な免疫反応が抑制され肉眼的病理変化が観察されるまでには至らなかったと考えられた。また、長期感染になると、孤立リンパ節数が多かったことから大腸において B 細胞による IgA 分泌など粘膜の感染防御機構が十分に働き菌の組織侵入を受ず、各種サイトカイン反応が収束に向かい大腸における炎症病態も認められなかったと考えられた。以上より MIT01-6451 感染により免疫正常マウスの消化管に病原性を示す可能性があり、本研究ではその機序の一端について明らかにすることができた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Yamanaka H, Nakanishi T, Takagi T, Ohsawa M, Kubo N, Yamamoto N, Takemoto T, Ohsawa K. *Helicobacter* sp. MIT 01-6451 infection during fetal and neonatal life in laboratory mice. *Exp. Anim.* (査読有), 64(4):375-82, 2015. doi: 10.1538/expanim.15-0034.

Suda T, Masuyama R, Bouillon R, Carmeliet G. Physiological functions of vitamin D: what we have learned from global and conditional VDR knockout mouse studies. *Curr. Opin. Pharmacol.* (査読有), 22:87-99, 2015. doi: 10.1016/j.coph.2015.04.001.

Akasaka K, Maeno A, Murayama T, Tachibana H, Fujita Y, Yamanaka H, Nishida N, Atarashi R. Pressure-assisted dissociation and degradation of "proteinase K-resistant" fibrils prepared by seeding with scrapie-infected hamster prion protein. *Prion* (査読有), 8(4):314-8, 2014. doi: 10.4161/pri.32081

Yamanaka H, Takagi T, Ohsawa M, Yamamoto N, Kubo N, Takemoto T, Sasano S, Masuyama R, Ohsawa K. Identification and characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* species frequently isolated from laboratory mice. *Exp. Anim.* (査読有), 63(3):297-304, 2014.

Ohsawa K, Black D, Ohsawa M, Eberle R. Genome sequence of a pathogenic isolate of monkey B virus (species Macacine herpesvirus 1). *Arch. Virol.* (査読有), 159(10):2819-21, 2014. doi: 10.1007/s00705-014-2130-3.

Black D, Ohsawa K, Tyler S, Maxwell L, Eberle R. A single viral gene determines lethal cross-species neurovirulence of baboon herpesvirus HVP2. *Virology* (査読有), 452-453:86-94, 2014. doi: 10.1016/j.virol.2013.12.038.

Christakos S, Lieben L, Masuyama R, Carmeliet G. Vitamin D endocrine system and the intestine. *Bonekey Rep.* (査読有), 5:3:496, 2014. doi: 10.1038/bonekey.2013.230.

Masuyama R. Role of local vitamin D signaling and cellular calcium transport system in bone homeostasis. *J. Bone Miner. Metab.* (査読有), 32(1):1-9,

2014. doi: 10.1007/s00774-013-0508-z.

Yamanaka H, Arita M, Oi R, Ohsawa M, Mizushima M, Takagi T, Kubo N, Yamamoto N, Takemoto T, Ohsawa K. Prevalence of an unidentified *Helicobacter* species in laboratory mice and its distribution in the hepatobiliary system and gastrointestinal tract. *Exp. Anim.* (査読有), 62(2):109-16, 2013.

〔学会発表〕(計 8 件)

山中仁木. Infection with *Helicobacter* species and its pathogenicity in laboratory mice, 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市), 2016 年 3 月 23-25 日.

山中仁木, 中西 太, 高木利一, 大沢牧子, 久保憲昭, 山本直土, 嶽本剛平, 大沢一貴. *Helicobacter* sp. MIT 01-6451 のマウスにおける垂直感染について. 第 62 回日本実験動物学会総会, 京都テルサ(京都府・京都市), 2015 年 5 月 28-30 日.

Yamanaka H. *Helicobacter* sp. MIT 01-6451 infection during fetal and neonatal life of laboratory mice. 第 88 回日本細菌学会総会, 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市), 2015 年 3 月 26-28 日.

山中仁木, 門松立樹, 高木利一, 嶽本剛平, 大沢牧子, 松田ちあき, 山本直土, 久保憲昭, 大沢一貴. 実験用マウスから分離されたバンコマイシン耐性腸球菌の薬剤感受性と保有する耐性関連遺伝子の検索. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 北海道大学(北海道・札幌市), 2014 年 9 月 9-12 日.

Yamanaka H. Isolation and characterization of *Helicobacter* sp. MIT 01-6451 frequently detected in SPF mice. 第 87 回日本細菌学会総会, タワーホール船堀(東京都・江戸川区), 2014 年 3 月 26-28 日.

山中仁木, 大井隆之介, 末松貴史, 大沢牧子, 高木利一, 久保憲昭, 山本直土, 嶽本剛平, 大沢一貴. *Helicobacter* sp. MIT01-6451 の分離培養と消化器系以外の組織からの検出について. 第 31 回九州実験動物研究会総会, 八千代座(熊本県・山鹿市), 2013 年 11 月 16-17 日.

山中仁木, 高木利一, 大沢牧子, 山本直土, 佐々野笑行, 久保憲昭, 嶽本剛平, 大沢一貴. 実験用マウスから検出されたバンコマイシン耐性腸球菌の病原関連因子の検索. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜大学(岐阜県・岐阜市), 2013 年 9 月 20-22

日.

山中仁木, 末松貴史, 大沢牧子, 水島めぐみ, 高木利一, 久保憲昭, 山本直土, 嶽本剛平, 大沢一貴. 国内飼養マウスで高頻度に検出される *Helicobacter* sp. MIT 01-6451 の分離培養と性状解析. 第60回日本実験動物学会総会, つくば国際会議場(茨城県・つくば市), 2013年5月15-17日.

〔図書〕(計 1 件)

山中仁木, 大沢一貴. ヘリコバクター属菌感染について, 実験動物感染症と感染症動物モデルの現状(日本実験動物学会発行), p81-86, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/lac/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山中 仁木 (YAMANAKA, Hitoki)

長崎大学・先導生命科学研究支援センター・助教

研究者番号: 30533921

### (2) 研究分担者

増山 律子 (MASUYAMA, Ritsuko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号: 60297596

### (3) 研究分担者

大沢 一貴 (OHSAWA, Kazutaka)

長崎大学・先導生命科学研究支援センター・教授

研究者番号: 90244756