

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460177

研究課題名(和文) 炎症性腸疾患の起因微生物の特定と治療・予防への展開

研究課題名(英文) Identification of the responsible bacteria of inflammatory bowel disease, and development to the treatment and prevention method.

研究代表者

河村 好章 (kawamura, Yoshiaki)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：80262757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：3年間の研究期間を通して、モデルマウスの構築と、その腸内細菌叢について一定の知見を得ることが出来た。想定した起病菌については、病態変化とともに、その存在あるいは一定量の増減の可能性を見ることができ、起病菌/起病菌群の一部としての可能性が高まった。また、ある種の抗生物質の前投与による病態抑制の再現も得られたので、治療に関する知見も得られたと考えている。免疫反応特性については期限内に着手できなかったが、現在測定系の構築が終わり、実データの収集に着手している。本研究の助成期間は終了したが、引き続き本テーマの研究を継続推進していく予定である。

研究成果の概要(英文)：We were able to construct the model mice, and obtain a certain knowledge about the intestinal flora. As for the suspected pathogenic bacteria, the presence or a certain amount of increase or decrease were observed along with the disease state. From these data, it increased the possibility of the causative agent bacteria or bacterial group. In addition, the premedication of a certain antibacterial agent was effective for suppression of the worse disease condition, it was considered to be obtained the knowledge of the medical treatment. Characteristics of the immune response was not able to be undertaken in this study period, but we could construct the measuring system and start to collect the data. The period of this grant was completed, but we will continue this study.

研究分野：医歯薬学

キーワード：微生物学 感染症学 炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease, IBD)研究の現状

IBDには、潰瘍性大腸炎(UC、病変は粘膜に限られ、その部位は大腸および直腸・結腸に限局)とクローン病(病変は腸管壁全層かつ消化管全般に及ぶ)がある。両疾患とも国の特定難病性疾患(難病、公費負担)として指定されている。IBDの患者数は、1991年は約3.3万人であったが、2009年度には約14.4万人(特定疾患医療受給者証交付件数より)と、4倍以上に増えており、今後ますます患者増が懸念される難疾患である。

何れの疾患も、発症には腸内細菌の存在が必須で germ-free 環境では発症しないこと(Immunol Rev 169:195, 1999)。IBD患者の中には、抗菌薬の投与が有用な場合があること(Gut 48:647, 2001)等からその原因として、特定の細菌の刺激に始まり、それに続く不適切な炎症反応の結果、発症すると推定されている。

これまで、腸内細菌の外膜抗原 LPS や細胞壁ペプチドグリカンなどが TLR(Toll Like Receptor)を通して樹状細胞を刺激し、サイトカインを分泌、Th1 細胞または Th2 細胞に分化し、炎症反応を引き起こすとする説などが考えられてきたが、近年 IFN- γ や IL-4 などのメディエーターは発症の要因ではなく、病態の進行による結果であるとの報告もされている(Curr Opin Gastroenterol 23:365, 2007)。

一方、膨大な腸内細菌が腸管上皮に接触していても炎症を起さない機構として T-reg (抑制性 T 細胞)から分泌される IL-10 による樹状細胞の活性化の抑制が報告され、この破綻により炎症を引き起こされるとする報告がされている(New Eng J Med 361:2066, 2009)。

いずれにおいても、ひとたび炎症反応の亢進あるいは免疫寛容システムの破綻が起こると、徐々に病態悪化へと進むものと考えられる。病態増悪の免疫学的メカニズムは上述のように詳細に検討されているが、最も初期の病態発生のトリガーとなる腸内細菌の特定や炎症初期の生体反応に関する研究はほとんど進展していない。その理由は、起因微生物は腸内細菌叢の膨大な量(糞便 1g あたり 10¹¹ ~ 10¹² 個)に比べれば、その割合は非常に少なく、通常の培養法、PCR 法などでは容易に検出できず、最新の網羅的な遺伝子解析方法を精緻に実施しなければならない点にある。加えて、現在の病態モデルマウスの作成方法は特定薬物(デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)や 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)など)投与により数日程度で発症する急性疾患の発症様式である。病態進行に関するモデルとしては有用であっても、本来慢性疾患であるはずの IBD の発症初期段階を反映したモデルとは言えない。

我々は平成 21 ~ 23 年度の基盤研究(C)で、UC マウスの細菌叢のメタゲノム解析を行い、健常マウスにはほとんど存在せず、UC マウ

スに有意に存在する複数の微生物を見出すことに成功した。それらの菌群の一部は、ヒトのクローン病患者から高頻度に検出される菌群と同じであることを見出している(第 85 回日本細菌学会総会にて発表済)。

さらにクローン病との関連が示唆されている菌種に *Helicobacter* spp.がある。我々はヒト腸管に生息する *Helicobacter cinaedi* の全ゲノム配列を決定し、VI 型分泌機構(T6SS)ならびに CRISPR/Cas 領域が存在する新たな pathogenic island を見出した(J Bacteriol 194:3744, 2012)。マウスの腸管に生息する *Helicobacter hepaticus* では T6SS を使い、宿主細胞の炎症を抑制して長期間、腸管内に留まり、クローン病発症に關与すると指摘されている(Cell Host & Microbe, 7:265,2010)。我々の上述のメタゲノム解析の結果、UC マウス糞便中には有意に多数の *Helicobacter* spp.が存在していた。

2. 研究の目的

我々が開発した DNA-deduction 法(IFO Res 25:19, 2011, J Oral Biosci 54: 132, 2012)を使い、メジャー菌群のみならずマイナー菌群も含め、クローン病発症モデルの腸内細菌叢を精査解析する。これまでの知見からメトロニダゾールやイミペネム+バンコマイシンの投与により、クローン病発症を防ぐことが出来ている。これらのモデルを使い、起因微生物の特定へと繋げていく。これらの検討の過程で起因微生物の薬剤感受性も明らかとすることができ、有効抗菌薬の情報とすることができる。

一方 *Helicobacter* spp.については、当該細菌の T6SS 欠損株を作成し、マウス投与実験を行い、その挙動や炎症反応、宿主応答を確認する。

さらにマウスに起因微生物を経腸投与(または経口投与)することにより、化学物質ではなく、微生物の刺激による慢性疾患としての IBD 発症モデルの構築を行う。

IBD 発症初期段階のモデルがこれまで無かったため、前述のように免疫学的メカニズムの報告も混沌としているので、起因微生物投与後の IBD 発症初期の免疫応答について、各種のサイトカインや炎症マーカー等を測定し、どのような免疫応答から発症が始まるのかを明らかにし、その知見をもって治療および予防法を策定する。

3. 研究の方法

既に確立されている TNBS 直腸内投与法を実施する。病態進行したモデルマウス、健常マウスから糞便を回収し細菌 DNA を抽出、メタゲノム解析法を実施、存在する菌群を網羅的に明らかにする。これらの条件より得たメタゲノムデータを比較解析し、クローン病発症に強く関連すると思われる微生物群を特

定する。一方既に成功している DSS 投与による UC モデルマウスについても、さらに作出し、その特徴を見出す。これまでの研究から推定される起因微生物の特異塩基配列から蛍光プローブを作成し、FISH (Fluorescence in situ hybridization) により当該微生物の腸管内での局在、特に病変部位との関係を明らかにする。

これまでの報告から、IBD 発症に *Helicobacter* spp. が関連している可能性が強く示唆されており (Cell Host & Microbe, 7:265, 2010)、我々の UC モデルマウスを使った実験でも、当該細菌が有意に増えているデータを既に得ている。そこで、当該細菌の T6SS 欠損株を作成し、マウス投与実験を行い、その挙動や炎症反応、宿主応答を確認する。起因微生物の投与時から、定着期、発症初期、増悪期、さらに抗菌薬投与による回復期などの各段階において病態の観察と種々の免疫学的な測定を行う。

IBD 病態確認としては、外観や病態スコア、部検時の腸管の長さや形態的变化などのマクロ的観察を行う。

4. 研究成果

TNBS (トリニトロベンゼンスルホン酸) 直腸内投与法によりクローン病 (CD) モデルマウスを構築した。その CD モデルマウスの病態進行—normal、mild、sever の3段階—にともない、糞便を回収し、16S rRNA メタゲノム法を実施した。病態進行に合わせて全体的な細菌叢および特定の菌群の変化が見られるデータが得られた。しかしながら、精査解析をしていくと、病態進行とリンクして増減している細菌種までは特定することができなかった。

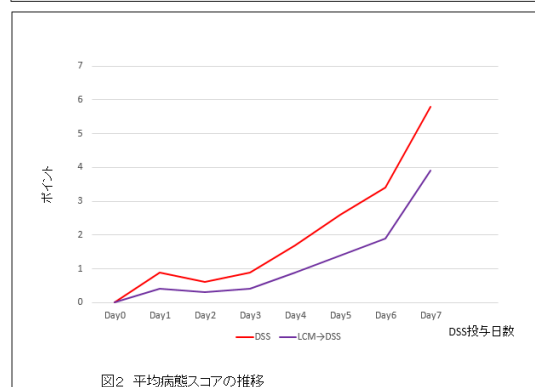
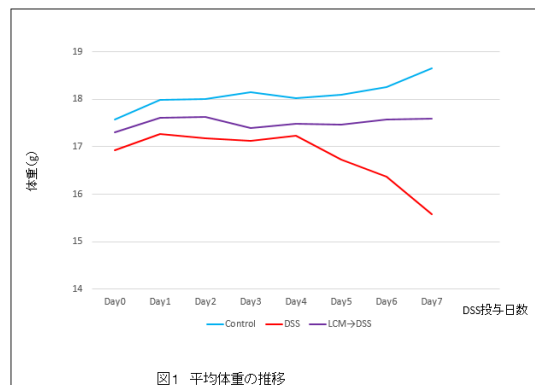
UC モデルマウスより見出された UC 起因候補株について、その遺伝情報から特異性の高いと考えられるプローブを作成した。当初非特異的な反応を抑えきれず、当該微生物の局在性等については知見を得ることができなかったが、種々反応条件を検討することで、一定の細菌を検出することができた。

一方デキストラン硫酸投与法による潰瘍性大腸炎 (UC) モデルマウスについては、以前に得られた細菌多様性が見られず、指標とした菌群の再発見はできなかった。これはマウスの遺伝的背景が均一でないことが一因と考えられたので、これまでのクローズド系の ICR マウスから、近交系の C57BL/6 を使用することとした。その結果として ICR に比べ病態の現れ方が均一的であった。

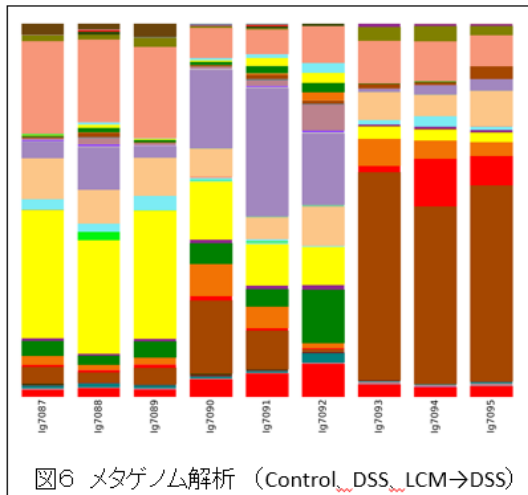
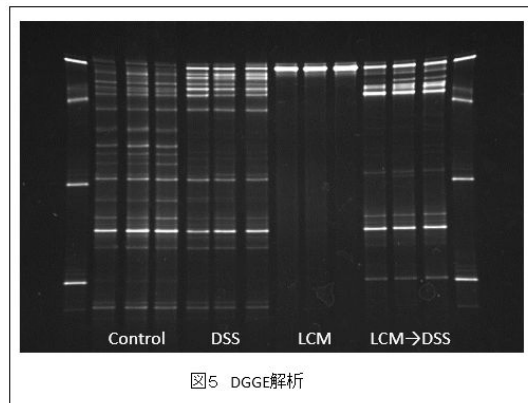
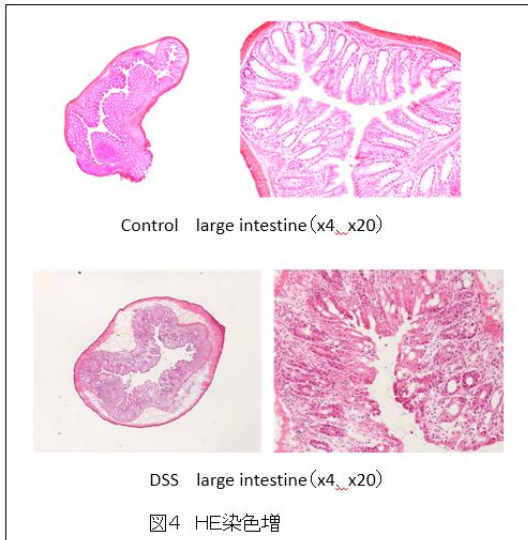
Helicobacter cinaedi の 6 型分泌機構 (T6SS) に関連する遺伝子のノックアウト株については、遺伝子レベルでの評価の結果、作成に成功することができた。しかしながら、およそ 1 年以上にわたり、その相補株を作成すべく精力的に研究を行ったが、実現には至らなかった。諸外国の多くの文献を見ても *H. cinaedi* に関する遺伝子改変の報告はほとん

ど無く、何らかの未同定の制御系があり、外来の遺伝子を導入するのは非常に困難なのではないかと推察された。

本研究の結果の一部として、UC モデルマウスの病態進行に伴う体重の減少 (図 1)、病態スコア (図 2、当研究で独自に策定。論文等で未発表のため詳細は省略) の上昇、大腸の萎縮のデータ (図 3) を示した。



また、病態ごとのマウス腸管壁の様子について図 4 に示した。さらに糞便から回収した DNA より 16S rRNA 遺伝子の一部を増幅して、そのパターンから細菌の多様性をみる DGGE (Denature gradient gel electrophoresis) を実施したところ、DSS 投与マウスは、健常マウスとは明らかに異なる細菌叢に変化していることが判った (図 5)。この DGGE の結果を踏まえ、メタゲノム解析を行った結果の一部について図 6 に示した。この図では属レベルの分類階級で多様性を確認しているが、健常マウス、DSS による病態進行マウス、リンコマイシンによる予防処置済みのマウスで大きく細菌叢が異なっていることが見て取れる。



3年間の研究期間を通して、モデルマウスの構築と、その腸内細菌叢について一定の知見を得ることが出来た。想定した起因菌については、病態変化とともに、その存在あるいは一定量の増減の可能性を見ることができ、起因菌/起因菌群の一部としての可能性が高まった。また、ある種の抗生物質の前投与による病態抑制の再現も得られたので、治療に関する知見も得られたと考えている。当初予定に照らし、免疫反応特性については期限内に着手できなかったが、現在測定系の構築が終わり、実データの収集に着手している。本助成研究の研究期間は終了したが、引

き続き本テーマの研究を継続推進していく予定である。

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6件)

Meiwa T, Tomida J, Kawamura Y, Miyata I, Yuza Y, Horikoshi Y. *Helicobacter cinaedi* bacteremia resulting from antimicrobial resistance acquired during treatment for X-linked agammaglobulinemia. *J. Infect Chemother*, 査読あり doi:10.1016/j.jiac.2016.02.008, 2016.

Abiko Y, Sato T, Sakashita R, Tomida J, Kawamura Y, Takahashi N. Profiling subgingival microbiota of plaque biofilms in the elderly. *J. Oral Biosci*, 58: 62-65, 2016 査読あり doi:10.1016/j.job.2015.12.002

Kawamura Y, Kuwabara S, Kania SA, Kato H, Hamagishi M, Fujiwara N, Sato T, Tomida J, Tanaka K, Bemis DA. *Porphyromonas pogonae* sp. nov., an anaerobic but low concentration oxygen adapted coccobacillus isolated from lizards (*Pogona vitticeps*) or human clinical specimens, and emended description of the genus *Porphyromonas* Shah and Collins 1988. 査読あり *Syst Appl Microbiol*, 38: 104-9, 2015 doi: 10.1016/j.syapm.2014.11.004.

Kawamura Y, Tomida J, Morita Y, Fujii S, Okamoto T, and Akaike T. Clinical and Bacteriological Characteristics of *Helicobacter cinaedi* Infection. *J Infect Chemother*, 20: 517-26, 2014 査読なし doi:10.1016/j.jiac.2014.06.007

富田純子、河村好章 *Helicobacter cinaedi* および *Helicobacter fennelliae* による感染症 *Journal of Helicobacter Research*, 20: In press, 2016 査読なし

河村好章、富田純子、岡本竜哉、澤智裕、赤池孝章 *H. cinaedi* と敗血症 *臨床と微生物*, 42: 177-182, 2015 査読なし https://www.kindai-s.co.jp/products/detail.php?product_id=230

〔学会発表〕(計5件)

富田純子, 中島健一, 鈴木裕可, 森田雄二, 波多野紀行, 井上誠, 河村好章
腸炎モデルマウス腸内細菌叢に優位に存在する *Clostridium* sp. ID4 による炎症誘発機構の検討
日本薬学会 第136年回、パシフィコ横浜(横浜) 2016、3月29日

松永 哲郎, 藤井 重元, 井田 智章, 津々木 博康, 澤 智裕, 河村 好章, 赤池 孝章
健常者における新興感染症菌 *Helicobacter cinaedi* 感染スクリーニングと感染疫学研究
第89回日本細菌学会総会、大阪国際交流センター(大阪) 2016、3月24日

富田純子, 川松亜衣, 繁益凧紗, 森田雄二, 河村好章
同一施設から分離された *Helicobacter cinaedi* の系統解析および環境からの検出調査
第27回日本臨床微生物学会総会、仙台国際会議場(仙台) 2016、1月30日

河村好章

PCR bias を逆利用した 16S メタゲノム精査解析法
第89回日本感染症学会学術講演会、シンポジウム、京都国際会館(京都) 2015、4月16日

久網僚, 富田純子, 森田雄二, 河村好章
DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法を用いた UC モデルマウス腸内細菌叢の構造解析
第61回日本薬学会東海支部総会・大会、名古屋市立大学(名古屋) 2015、7月4日

〔図書〕(計2件)

富田純子, 森田雄二, 河村好章, 他
薬学領域の病原微生物学・感染症学・化学療法学 第3版
増澤俊幸, 河村好章 (編集)
廣川書店、東京、2016、407頁

Sato T, Kawamura Y, Yamaki K, Ishida N, Tian L, Takeuchi Y, Hashimoto K, Abiko Y, Mayanagi G, Washio J, Matsuyama J, Takahashi N:
Oral Microbiota in Crevices Around Dental Implants: Profiling of Oral Biofilm. *In*: Sasaki K, Suzuki O, Takahashi N (eds.) Innovative Research on Biosis-Abiosis Intelligent Interface. Springer, Tokyo, p45-50, 2015.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.agu.ac.jp/lab/microbiol/TopPage.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村好章 (Kawamura Yoshiaki)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号: 80262757

(3) 連携研究者

田中香お里 (Tanaka Kaori)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・教授

研究者番号: 20242729