

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870094

研究課題名(和文) マラリアにおける宿主病原体相互作用への腸内細菌の影響の解明

研究課題名(英文) The effects of intestinal microbiota on host-pathogen interaction during malaria infection

研究代表者

谷口 委代 (Taniguchi, Tomoyo)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20620800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マラリアは発熱などの主要症状に加え高頻度に消化器症状を認めるが、その詳細なメカニズムは不明であった。本研究では、マラリアの病態を腸内細菌との関与という全く新しい角度から検証を行って、マラリア原虫に感染したマウスでは、小腸病態が生じているとともに腸内細菌叢が劇的に変化して腸内細菌バランス失調が起こっていることを明らかにした。さらにマウスで得られた知見を熱帯熱マラリア患者で検証を行って、マラリア患者が健常者と異なる腸内細菌叢をもつことを見出した。マラリア患者および感染マウスにおいて腸内細菌とマラリア病態との間に関連が認められたことから、腸内細菌がマラリア病態形成に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gastrointestinal symptoms are frequently observed in malaria patients in addition to the malarial triad of fever, anemia, and splenomegaly. However, the association between intestinal microbiota and malaria pathology is poorly understood. In this study, we revealed that mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA suffer from intestinal pathology in the small intestines associated with remarkable changes in microbiota. Microbiotic analyses of stool samples also revealed that *P. falciparum* patients have a different microbiota composition compared with healthy controls. Furthermore, some genera or clusters of microbiota in malaria patients and infected mice correlated with malaria pathology including gastrointestinal symptoms. These results indicate that intestinal microbiota may affect malaria pathogenesis.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 熱帯熱マラリア 消化器症状 腸内細菌叢 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、エイズ、結核などと並ぶ最も重要な感染症である。マラリアに対する有効なワクチンは未だなく開発が急務となっているが、マラリアでは免疫記憶が樹立されにくいこともあり困難を極めている。マラリアの病態にはマラリア原虫によるものと、マラリア原虫に対する免疫応答によるものが複雑に絡み合っており形成される。したがって、ワクチン開発を含むマラリアの効果的なコントロールにはマラリア原虫宿主相互作用の解明が必要不可欠である。

下痢はまた、年間 130 万人の死亡者が見積もられ、2 歳以下の子供の死亡原因の 72% を占める非常に重要な疾患である。マラリアの症状として腹痛、下痢、嘔吐といった消化器症状が高頻度に見られるにも関わらず、マラリアの腸管への影響はほとんど研究されていない。一方で、マラリア患者でのサルモネラや蠕虫の腸管感染がマラリアを重症化させることが報告されてきた。我々はこれまでにマウスモデルにおいて腸管寄生蠕虫がマラリアの病態に影響を与えることを見出し、Tetsutani *et al* Eur J Immunol, 2009 and Tetsutani K *et al* Am J Trop Med Hyg, 2008)、腸管でのイベントがマラリアに影響を与えることが想定された。近年、腸内環境、とくに腸内細菌の変調が全身の免疫系の調節に関わっていることが報告されている。

以上の臨床的観察と先行研究から、「マラリアと腸内細菌が相互作用することによって免疫系の変調や病態形成に関わる」という仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究課題は、マラリアと腸内細菌の双方向の影響を、1) マラリア原虫感染の腸内環境への影響、2) 腸内細菌のマラリアの病態に与える影響、3) 関連する腸内細菌の特定について解析することで、マラリア原虫感染における宿主病原体相互作用への腸内細菌の影響を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、マウスモデルを用いてマラリアと腸内細菌の双方向の影響を、以下の3点について解析することで、両者の相互作用を解明する。またウガンダ国でマラリアの臨床研究に取り組んでいることから、本研究で得られるマウスモデルの知見をヒトでの検証を試みる。

- 1) マラリア原虫感染の腸内環境への影響
感染時の腸内細菌叢の変調の確認、消化器症状・腸管免疫を解析する。
- 2) 腸内細菌のマラリアの病態に与える影響
抗生物質投与により腸内細菌数を減じた動物にマラリア原虫を感染させ、マラリア病態等を解析する。
- 3) 関連する腸内細菌の特定
腸内細菌の変調を詳細に検討すること

で大きく変化した細菌に着目し、病態に関わる腸内細菌種の同定を試みる。

4. 研究成果

1) マラリア原虫感染の腸内環境への影響
ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA 株 (PbA) 感染において脳マラリアに感受性を示す C57BL/6 (B6) マウスと抵抗性を示す BALB/c マウスを用いて、以下の検討を行った。

消化器症状の観察

B6 マウスが脳症状を呈する感染 9 日目において消化器症状の観察を行った結果、B6 マウスでは肉眼的には腸管の短縮が、組織学的には小腸において腸管上皮細胞の剥離や出血、著明な絨毛の短縮が認められたが(図1)、大腸における炎症細胞の集簇等は認められなかった。一方、BALB/c マウスでは、大腸の短縮が認められた以外、腸管病態は認められなかった。これらのことから、PbA 感染 B6 マウスの小腸で病的な事象が起きていることが示された。これは、ヒト熱帯熱マラリア患者において報告されている小腸病態と一致する結果であった。

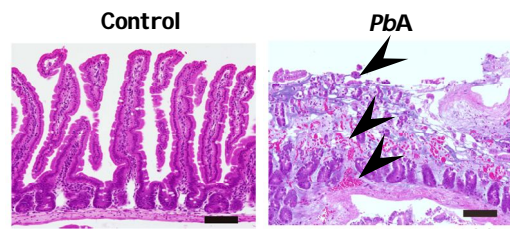


図1. PbA 感染 B6 マウスにおける組織学的変化
小腸における腸管上皮細胞の剥離と出血 (矢頭)

腸内細菌叢変動の確認

PbA 感染前後のマウスの糞便を経時的に採取して、次世代シーケンサーによる 16S rRNA 遺伝子を用いた腸内細菌叢の網羅的な把握を行った結果、感染に伴い Firmicutes 門の減少と Proteobacteria 門の増加に特徴づけられる腸内細菌叢の劇的な変化、すなわち腸内細菌バランス失調 (dysbiosis) が起こっていることを見出した。その変化は、脳症状を呈する B6 マウスにおいてより顕著であった(図2)。これらの結果から、脳マラリアを含むマラリアの病態に腸内細菌が関与している可能性が示唆された。

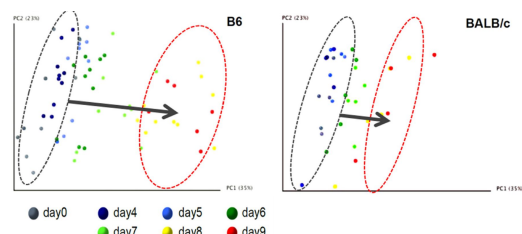


図2. PbA 感染による腸内細菌叢の変化
感染による菌叢変化 (左○から右、矢印方向)

次に、本研究で得られたマウスモデルの知見をヒト熱帯熱マラリア患者で検証を行った。マラリア流行地であるウガンダ国の病院において熱帯熱マラリア患者から消化器症状の聞き取りを行うとともに、感染時と回復時に糞便を採取して、16S rRNA 遺伝子を用いた菌叢解析を行った。その結果、患者における腸内細菌叢は、健常者と顕著に異なっており、重症患者では、嘔吐や下痢といった消化器症状を含むマラリア病態と腸内細菌叢パターンとの間に相関が認められた。

以上のことから、マウス同様、熱帯熱マラリア感染において腸内細菌叢の変化が生じていること、そしてマラリアの病態に腸内細菌が関与している可能性が示唆された。

腸管における免疫応答の解析

腸管における免疫応答の解析をした結果、*PbA* 感染に伴いパイエル板および腸間膜リンパ節におけるリンパ球数の減少が認められたが、腸管上皮間および粘膜固有層リンパ球における感染による顕著な変化は認められなかった。

2) 腸内細菌のマラリアの病態に与える影響

抗生物質 (ampicillin、neomycin、vancomycin、metronidazole) を投与して腸内細菌を減少させた B6 マウスに *PbA* を感染させると、11-13 週齢のマウスにおいて感染早期における Parasitemia (原虫の赤血球寄生率) の有意な低下と生存率の延長が認められた。

3) 関連する腸内細菌の特定

ネズミマラリア原虫感染に影響を及ぼす腸内細菌の同定

次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢の解析から、Parasitemia および脳症状と相関が認められる菌が、B6 マウスにおいて 23 属、BALB/c マウスにおいて 16 属、判明した。その内、B6 において特異的な菌は 10 属、BALB/c において特異的な菌は 3 属見出され、残りは、両マウスに共通する菌であった。これらの結果から、マラリア感染において共通して変化する菌および脳マラリアを含む *PbA* 感染の感受性および抵抗性に関与する可能性のある菌が絞り込まれた。

我々はその中でも、*PbA* 感染 B6 マウスにおいて脳症状発症前に顕著に減少する *Lactobacillus* 属に着目し、B6 マウスの糞便から MRS 培地を用いて *Lactobacillus* 属を分離・培養してコロニーから DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定して、顕著に減少する *Lactobacillus* 種を同定した。

同定腸内細菌種投与によるネズミマラリア感染動態の解析

同定した *Lactobacillus* 種は、*PbA* 感染後、脳症状発症前に顕著に減少する菌であるため、同定菌を B6 マウスに毎日経口投与して

減少菌を補充して感染動態を観察することにより、同定菌の *PbA* 感染に与える影響を評価した。その結果、非投与 (対照) 群では、脳症状を呈する時期に死亡することなく、その後、高原虫血症を呈して、1 ヶ月程で死亡するマウスが 1 割程度認められたが、*Lactobacillus* 種投与群では 25 匹中 6 匹 (24.0%) のマウスにおいて、生存率の延長が認められた。その一方で、正常細菌叢投与群 31 匹中 11 匹 (35.5%) において、生存率の延長が認められた。

これらの結果から、分離 *Lactobacillus* 種の *PbA* 感染に与える効果が弱いものの認められ、さらに正常細菌叢の投与により *PbA* 感染 B6 マウスの脳症状による死亡率をある程度低下させることができたことから、腸内細菌のマラリア病態への関与および病態制御の可能性が示唆された。

本研究により *PbA* を感染させた B6 マウスにおいて、腸内細菌叢が劇的に変化して腸内細菌バランス失調 (dysbiosis) を起こしていることを突き止めた (Taniguchi *et al* / Sci Rep, 2015)。また、熱帯熱マラリア感染による腸内細菌叢の変化を明らかにするとともに、マラリア原虫感染における宿主病原体相互作用に腸内細菌が関与する可能性を示した。今後の更なる解析によりマラリアと腸内細菌の相互作用の詳細が明らかになれば、消化器症状の軽減・防御免疫の解明など、マラリアコントロールの新たな戦略を提案できる可能性が広がる。

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 5 件)

Akiyama T, Pongvongsa T, Phrommala S, Taniguchi T, Inamine Y, Takeuchi R, Watanabe T, Nishimoto F, Moji K, Kano S, Watanabe H, Kobayashi J. Asymptomatic malaria, growth status, and anaemia among children in Lao People's Democratic Republic: a cross-sectional study. *Malar J.* 18;15(1):499, 2016. 査読有
DOI:10.1186/s12936-016-1548-3

Taniguchi T, Miyauchi E, Nakamura S, Hirai M, Suzue K, Imai T, Nomura T, Handa T, Okada H, Shimokawa C, Onishi R, Ochia A, Hirata J, Tomita H, Ohno H, Horii T and Hisaeda H. *Plasmodium berghei* ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis. *Sci Rep.* 5:15699, 2015. 査読有
DOI:10.1038/srep15699

Okada H, Suzue K, Imai T, Taniguchi T, Shimokawa C, Onishi R, Hirata J and Hisaeda H. A transient resistance to

blood-stage malaria in interferon-g-deficient mice through impaired production of the host cells preferred by malaria parasites. *Front Microbiol.* 6:600, 2015. 査読有
DOI:10.3389/fmicb.2015.00600

Imai T, Ishida H, Suzue K, Taniguchi T, Okada H, Shimokawa C, Hisaeda H. Cytotoxic activities of CD8⁺ T cells collaborate with macrophages to protect against blood-stage murine malaria. *Elife.* 11;4, 2015. 査読有
DOI:10.7554/eLife.04232

Imai T, Iwawaki T, Akai R, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Okada H, Hisaeda H. Evaluating experimental cerebral malaria using oxidative stress indicator OKD48 mice. *Int J Parasitol.* 44(10):681-5, 2014. 査読有
DOI:10.1016/j.ijpara.2014.06.002

〔学会発表〕(計 9 件)

谷口委代, 宮内栄治, Olia Alex, 長安英治, Osbert Katuru, 鈴江一友, 今井孝, 下川周子, 大西里咲, Odongo-Aginya E.I., Palacpac Nirianne, 丸山治彦, 木村英作, 美田敏宏, 大野博司, 堀井俊宏, 久枝一, ウガンダ国の熱帯熱マラリア患者において腸内細菌叢の変化が起こる, 第 86 回日本寄生虫学会大会, 札幌, 2017.5.28-29
Taniguchi T, Miyauchi E, Nakamura S, Hirai M, Suzue K, Imai T, Nomura T, Handa T, Okada H, Shimokawa C, Onishi R, Olia A, Hirata J, Tomita H, Ohno H, Horii T and Hisaeda H, Altered gut microbiota composition in *Plasmodium falciparum* patients in Uganda, Japanese-Brazil Malaria Workshop 2017, Sao Paulo, 2017.3.15-17

Taniguchi T, Miyauchi E, Nakamura S, Hirai M, Suzue K, Imai T, Nomura T, Handa T, Okada H, Shimokawa C, Onishi R, Olia A, Hirata J, Tomita H, Ohno H, Horii T and Hisaeda H, *Plasmodium berghei* ANKA infection induces intestinal dysbiosis, International Congress of Immunology, Melbourne, 2016.8.21-26

Suzue K, Amano H, Taniguchi T, Shimokawa C, Olia A, Onishi R, and Hisaeda H, Pathogen non-specific bystander T cells were attenuated upon infection with malaria parasites, International Congress of Immunology, Melbourne, 2016.8.21-26

Taniguchi T, Miyauchi E, Olia A, Nagayasu E, Sakurai M, Ikeda M, Imai T, Shimokawa C, Hirata J, Odongo-Aginya EI, Palacpac N, Maruyama H, Kimura E, Mita T, Ohno H, Horii T and

Hisaeda H, *Plasmodium falciparum* malaria alters the composition of intestinal microbiota in Ugandan patients, TICAD VI Pre-event; The 3rd International Symposium for the Promotion of Science and Technology Innovation Cooperation between Africa and Japan, Tokyo, 2016.7.13

谷口委代, 宮内栄治, 中村昇太, 平井誠, 鈴江一友, 今井孝, 野村隆浩, 半田正, 岡田紘子, 下川周子, 大西里咲, Olia Alex, 平田潤, 富田治芳, 大野博司, 堀井俊宏, 久枝一, ネズミマラリア原虫感染により腸内細菌バランス失調が起こる, 第 85 回日本寄生虫学会大会, 宮崎, 2016.3.19-20

谷口委代, 宮内栄治, 中村昇太, 平井誠, 鈴江一友, 今井孝, 岡田紘子, 大野博司, 堀井俊宏, 久枝一, ネズミマラリア原虫感染による腸管病態の変化, 第 84 回日本寄生虫学会大会, 東京, 2015.3.21-22

鈴江一友, 平井誠, 今井孝, 谷口委代, 岡田紘子, 小安重夫, 久枝一, マラリア感染宿主における皮膚炎症状軽快化の分子メカニズム, 第 84 回日本寄生虫学会大会, 東京, 2015.3.21-22

Imai T, Ishida H, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Okada H, Shimokawa C, Hisaeda H. Cytotoxic activities of CD8⁺ T cells collaborate with macrophages to protect against blood-stage murine malaria, ICOPA, Mexico, 2014.8.12

〔その他〕

ホームページ等

群馬大学プレスリリース「マラリア感染により腸内細菌叢が悪化する マラリアの新たな予防・治療法開発への道を拓く」

<http://www.gunma-u.ac.jp/information/10217>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 委代 (TANIGUCHI, Tomoyo)

群馬大学大学院・医学系研究科・助教

研究者番号：20620800