

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：33902

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2022

課題番号：19K23853

研究課題名（和文）潰瘍性大腸炎を発症/悪化させる特定細菌の病原因子の探索と治療・予防法の確立

研究課題名（英文）Search for bacterial virulence factors that cause/exacerbate ulcerative colitis and establishment of treatment/prevention methods

研究代表者

久網 僚（Kutsuna, Ryo）

愛知学院大学・薬学部・助教

研究者番号：00845810

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：Paraclostridium bifermentans subsp. muricolitidis PAGU 1678T株および比較対照菌株の全菌体タンパク質解析、全ゲノム解析によって、PAGU 1678T株に特徴的なセレノプロテイン代謝能を見出した。そこで、セレン含有アミノ酸であるセレノメチオニンモデルマウスへ補充したところ、腸管炎症の軽減が認められた。本研究より、必須微量元素であるセレンの利用を巡って生体とPAGU 1678T株間での競合が生じることで大腸炎病態の悪化に繋がっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎に関するこれまでの報告から、腸内細菌は本疾患への強い関与が示されている。腸内細菌の一種であるParaclostridium bifermentans subsp. muricolitidis PAGU 1678T株は単独での潰瘍性大腸炎モデルマウス病態増悪能を有するが、その病態はセレン含有アミノ酸を介したセレンの補充によって軽減された。本研究成果より、セレン利用が可能な細菌群を減らす、または適切な濃度のセレン補充など、生体内のセレン濃度のコントロールが潰瘍性大腸炎治療のターゲットとなり得ると考えている。

研究成果の概要（英文）：Whole cell protein analysis and whole genome analysis of Paraclostridium bifermentans subsp. muricolitidis PAGU 1678T revealed the ability of strain PAGU 1678T to metabolize selenoproteins. Supplementation with selenomethionine as selenium-containing amino acids in model mice reduced intestinal inflammation. This study suggests that competition between the host and the strain PAGU 1678T for selenium utilization leads to exacerbates pathosis of colitis.

研究分野：細菌学

キーワード：潰瘍性大腸炎 モデルマウス セレン

## 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis; UC) はクローン病とともに炎症性腸疾患に分類され、時に下血を伴う下痢および腹痛を主症状とし、寛解と再燃を繰り返して慢性的経過を辿る[1]。これまでの知見から、遺伝的要因、食生活やストレスなどの環境要因が発症原因として示唆されつつも、未だ明確な発症メカニズムは解明されておらず、患者数が世界規模で増加の一途を辿る現在においても、根本的な治療方法は確立されていない[2]。

健常者の腸内細菌叢の組成はおおよそ一定で安定している一方で、UC 患者では特定細菌群の増加または減少を伴う乱れが生じ、健常者と比較して全体の細菌種数は著しく減少している[3]。さらに、UC 患者への糞便細菌叢移植療法は臨床症状および QOL の改善に繋がること、IL-10 ノックアウトマウスなど自然発症大腸炎モデルが無菌環境下で飼育された際には大腸炎を発症しないことなどが明らかとなっている[4]。これらの事実は、本疾患への腸内細菌の強い関与を示しており、腸内細菌の中でも、いわゆる悪玉菌の存在と、それらの生体への影響について把握することは、UC 病態を紐解く鍵となり得るのではないかと考えている。

## 2. 研究の目的

UC は特定疾患に指定されている慢性腸炎であり、未だ発症メカニズムは解明されておらず、根本的な治療方法も確立されていない。我々は、UC モデルマウスにおいて有意に増加する特定の細菌種 *Paraclostridium bif fermentans* subsp. *muricolitidis* PAGU 1678<sup>T</sup> の存在を見出し、さらに、当該菌を UC モデルマウスに投与することにより、病態が重症化することを実験的に証明した[5, 6]。本研究では、この発見を踏まえて当該菌における UC モデルマウス病態悪化因子の探索を第一の目的として設定した。これまで、UC 病態に伴い増加する細菌群は見出されていても、それが原因または結果なのか、実際にどの菌種の何が病態に関与しているのかについて、明確な答えは得られていなかった。我々はマウス病態増悪能を有する単独菌を見出しており、これはマウス病態悪化のトリガーとなる菌体分子の特定が容易になるという利点がある。PAGU 1678<sup>T</sup> 株をより詳細に分析することで、マウス病態悪化因子を見出し、さらにはそれをターゲットとした UC 治療・予防法の提案に繋げることが出来ると考え、本研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究では、初めにモデルマウス病態悪化が PAGU 1678<sup>T</sup> 株の産生する毒素または代謝産物によるものであるのか、菌体構成成分に起因するものであるのかを調べる目的で、PAGU 1678<sup>T</sup> 株の生菌/死菌または培養上清を大腸培養細胞へ曝露させ、Real time qPCR によるサイトカイン発現への影響を評価した。さらに、培養細胞への付着能、侵入能について、潰瘍性大腸炎モデルマウス病態軽減能を有する *Clostridium butyricum* PAGU 1417<sup>T</sup> 株と併せて検討を行った。その際、PAGU 1678<sup>T</sup> 株が UC モデルマウスへの病態増悪能を有していることから、マウス大腸炎誘発剤として広く常用されている DSS (Dextran sulfate sodium) の非存在下/存在下において検証した。細胞内での局在について、FISH (Fluorescence in situ hybridization) を用いて観察した。

(2) UC モデルマウス病態増悪に関与している PAGU 1678<sup>T</sup> 株に特徴的な菌体成分を見出す目的で、PAGU 1417<sup>T</sup> 株を比較対照菌株として LC/MS を用いた全菌体タンパク質解析を実施した。また、PAGU 1678<sup>T</sup> 株に特異的な遺伝子およびその機能を見出す目的で MiSeq による全ゲノム解析を実施し、PAGU 1417<sup>T</sup> 株との比較を行った。

(3) そこから得られた PAGU 1678<sup>T</sup> 株に特徴的な成分を大腸培養細胞へと曝露させ、Real time qPCR にて関連遺伝子の挙動を確認した。さらに、モデルマウスへ当該成分を処理し、体重推移、病態評価、組織学的評価、各種サイトカイン発現への影響などに基づき、マウス病態への影響を評価した。

## 4. 研究成果

(1) PAGU 1678<sup>T</sup> 株の生菌/死菌/培養上清の Caco-2 細胞への曝露では、生菌/死菌処理による炎症応答がみられた一方で、培養上清処理による炎症応答は認められなかった。生菌処理では顕著な炎症応答がみられたが、死菌処理によっても一定の炎症応答を示したことから、PAGU 1678<sup>T</sup> 株によるモデルマウスへの一連の炎症活性には菌体成分の関与が予想された (Fig. 1)。

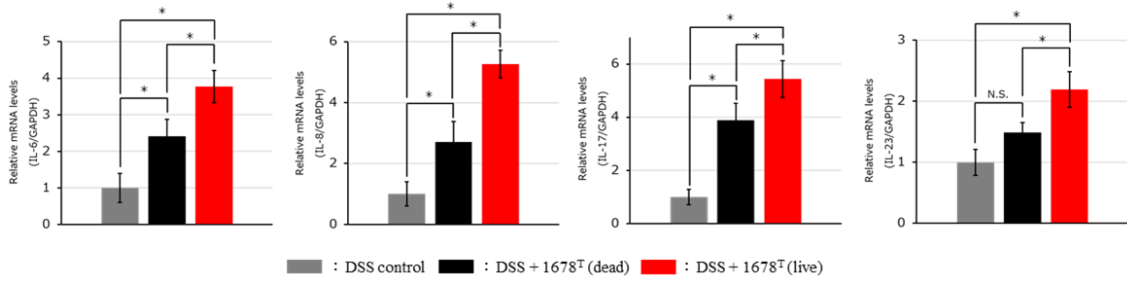


Fig. 1 PAGU 1678<sup>T</sup>株の生菌/死菌処理による細胞炎症応答

DSS添加の有無に関わらず、PAGU 1678<sup>T</sup>株とPAGU 1417<sup>T</sup>株間でCaco-2細胞への付着菌数に差はみられなかった (Fig. 2)。一方で、Caco-2細胞内への侵入菌数についてはDSS存在下の1678株において、DSS非存在下ならびにPAGU 1417<sup>T</sup>株に比しておよそ3倍も侵入していたことが認められた (Fig. 3)。また、FISHを用いたCaco-2細胞内への侵襲性および局在について、DSS存在下での1678株による顕著な細胞内への侵入が観察された (Fig. 4)。これらの結果より、DSS処理によって脆弱となった腸管組織を侵入部位として細胞内へと侵入していることが予想された。

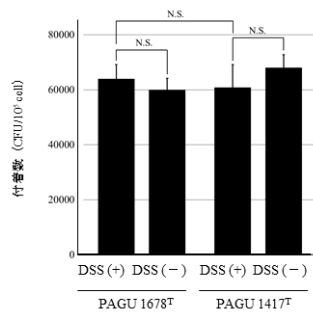


Fig. 2 細胞付着菌数

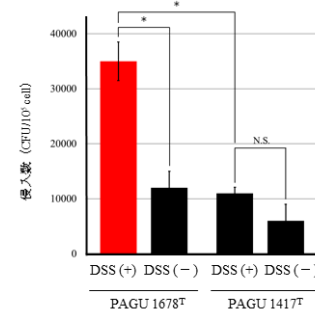


Fig. 3 細胞内侵入菌数

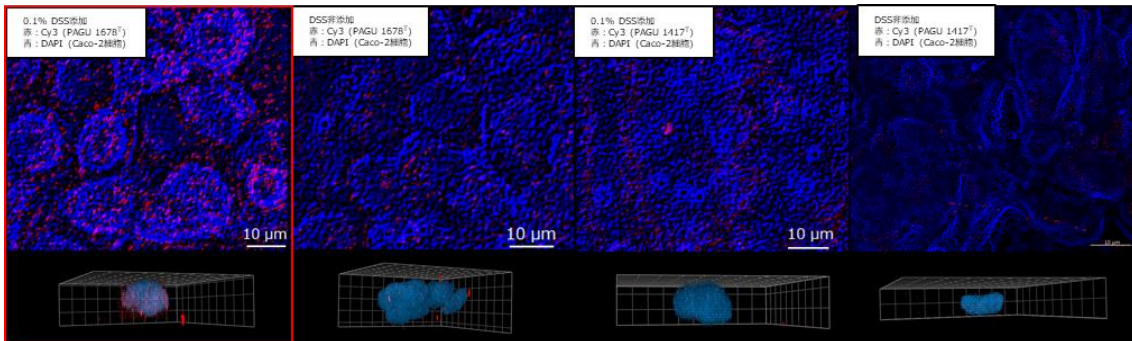


Fig. 4 細胞内侵入の様子

(2) 培養細胞への感染実験に基づき、PAGU 1678<sup>T</sup>株によるモデルマウスへの一連の炎症活性には菌体成分が関与しているという予想をもとに、PAGU 1678<sup>T</sup>株およびPAGU 1417<sup>T</sup>株からビーズ破砕法により全タンパク質を抽出後、SDS-PAGEを実施した (Fig. 5)。PAGU 1678<sup>T</sup>株に特徴的な泳動バンドがいくつか認められたことから、複数バンドを切り出してゲル内消化を行い、LC/MSを実施後、CometおよびMascot Serverを用いて成分を同定した (Table 1)。

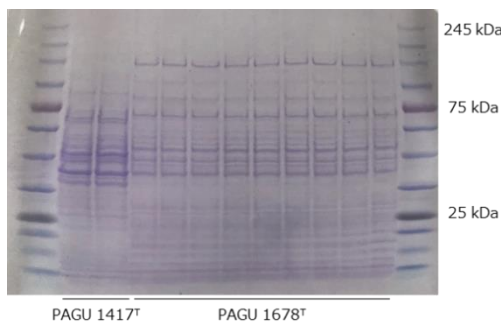


Fig. 5 菌体タンパク質のSDS-PAGE

Table 1 バンド由来の菌体タンパク質

membrane protein
cold-shock protein
carboxysome shell protein
fibronectin-binding protein
ubiquinone biosynthesis protein
damage inducible protein
bacterial microcompartment protein
basal-body rod modification protein
glycyl-radical enzyme activating protein
peptidoglycan-binding protein
nucleotide phosphoesterase protein
microcompartment protein
glycine reductase complex protein
penicillin-binding protein

PAGU 1678<sup>T</sup>株に特徴的なバンドから14種の菌体タンパク質が同定されたものの、いずれも炎症に関連する報告はなかった。そこで、PAGU 1678<sup>T</sup>株に特異的な遺伝子およびその機能を見出す目的で全ゲノム解析を実施した。Nextera XT Library Kitを用いてライブラリー調製を行い、Illumina HiSeq X Ten sequencerにて全ゲノムを決定後、RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology)を用いてPAGU 1678<sup>T</sup>株およびPAGU 1417<sup>T</sup>株の保有遺伝子を比較した (Fig. 6)。

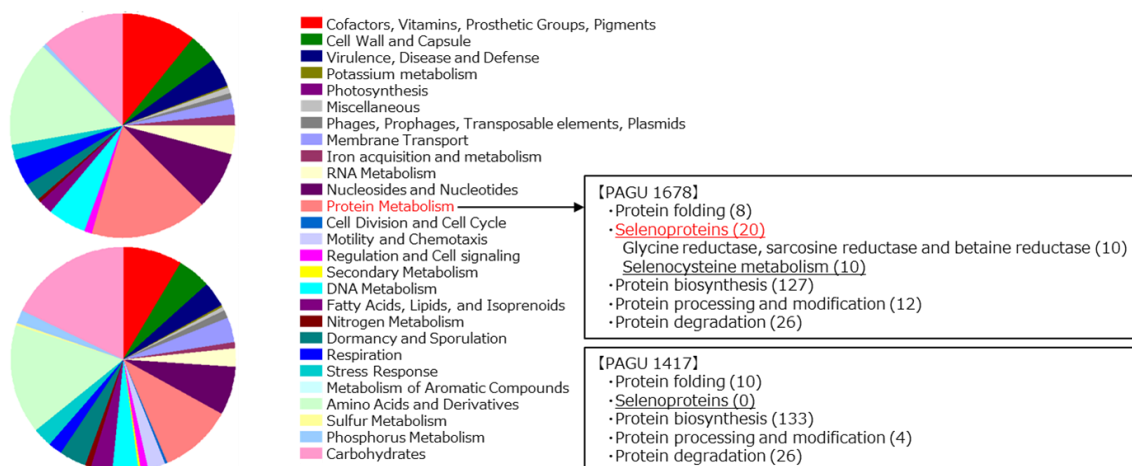


Fig. 6 保有遺伝子割合 (上: PAGU 1678<sup>T</sup>株, 下: PAGU 1417<sup>T</sup>株)

PAGU 1678<sup>T</sup>株は、PAGU 1417<sup>T</sup>株にはない、セレンプロテイン代謝に関連する遺伝子を保有することが明らかとなった。セレンプロテインは機能発現に必要な要素としてセレンを持つタンパク質であり、その前駆体のセレン含有アミノ酸として、セレンシステイン (SeC) およびセレンメチオニン (SeMet) が知られている [7]。そして、ヒトや動物は SeC や SeMet を食餌から摂取し、腸管吸収によってセレンを獲得しており、セレン欠乏は免疫能低下を引き起こすことで様々な疾患との関与が報告されている [8, 9]。これらを踏まえ、腸管内で増殖した PAGU 1678<sup>T</sup>株による過剰な代謝によって必須微量元素であるセレンの欠乏が生じ、マウス病態の増悪に寄与していることを予想した。

(3) PAGU 1678<sup>T</sup>株が有すると予想したセレンの過剰な代謝について検証するため、腸管吸収率が高く、栄養有効性も高いとされている SeMet を用いて評価した。SeMet 処理した培養細胞にて PAGU 1678<sup>T</sup>株を共培養し、セレンプロテイン発現に関与する遺伝子の転写量を比較した (Fig. 7)。

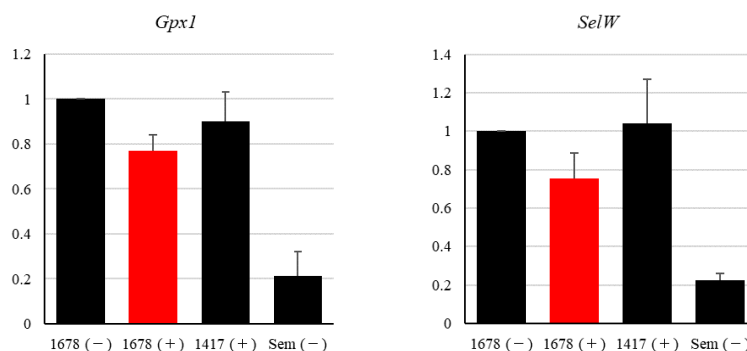


Fig. 7 各遺伝子相対転写量の比較

グルタチオンペルオキシダーゼ (Gpx) は、過酸化物を効果的に還元することで粘膜炎症を緩和することが知られており、Gpx1 遺伝子はほぼ全ての腸管細胞にて発現が確認されている。SelW (Selenoprotein W) は、様々な組織に広く分布し Se レベルに依存して発現することが知られている。これらの遺伝子は、Sem 添加細胞と PAGU 1678<sup>T</sup>株を共培養した際に転写レベルの低下が認められ、PAGU 1678<sup>T</sup>株による SeMet 代謝によって生じたことを予想した。

*in vitro*系において PAGU 1678<sup>T</sup>株に SeMet が何らかの影響を及ぼしていることが示唆されたことから、SeMet 補充によるモデルマウス病態への影響を検討した。DSS 処理によって大腸炎を誘発し、SeMet および/または PAGU 1678<sup>T</sup>株処理後、軟便・血便程度、体重減少率に基づく DAI スコアによる病態評価を行った。また、マウス屠殺解剖後の大腸長さの比較、腸管の組織学的評価を実施した。DSS 処理 21 日目において体重変化率に最も差が認められ、SeMet 処理した 2 群

においては、SeMet 非処理群よりも低い病態スコアを示した (Fig. 8)。屠殺解剖によって、Normal cont. 群に比べ、DSS 処理した 4 群における腸管の萎縮が認められ、中でも DSS+1678 処理群では顕著であった。一方、DSS+1678+SeMet 処理群では健常コントロール群に次ぐ腸管長さを維持していることが明らかとなった (Fig. 9)。炎症の指標として、腸管組織中炎症性サイトカインの mRNA 遺伝子の転写量を qPCR にて比較したところ、DSS+1678 処理群における有意に高いレベルと、SeMet 処理群における低下が確認された (Fig. 10)。組織学的評価について、重症例では好中球の増加や腸細胞の脱落、偽ポリープの形成が観察された (Fig. 11)。これらの組織学的評価によって、SeMet 非処理群に比べ SeMet 処理した 2 群において炎症スコアの低下が認められた (Fig. 12)。

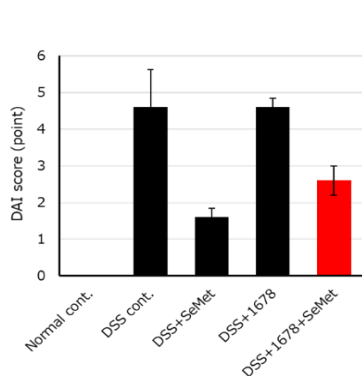


Fig. 8 マウス病態評価

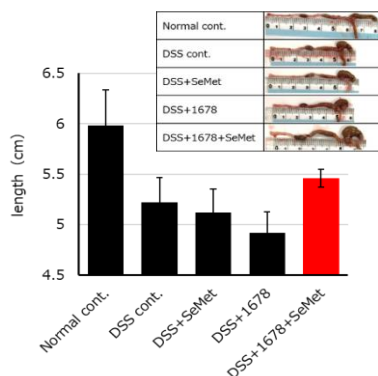


Fig. 9 大腸長さの比較

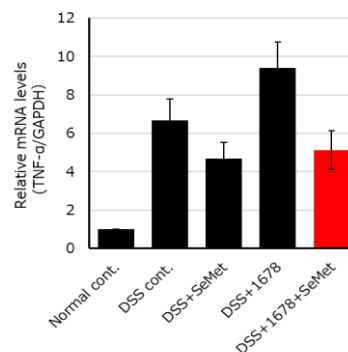


Fig. 10 腸管内 mRNA 遺伝子

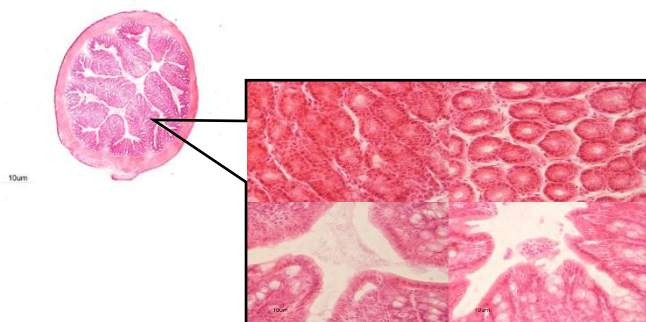


Fig. 11 腸管組織 HE 染色像

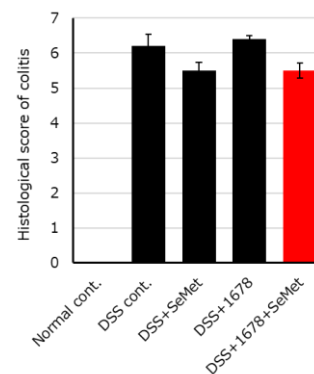


Fig. 12 腸管組織学的評価

DSS 処理により大腸炎を誘発させた群への SeMet 処理、そこに PAGU 1678<sup>T</sup> 株の経口投与によってより重症化した群への SeMet 処理は、体重減少の程度や病態スコアを改善し、腸管長さの維持、炎症性サイトカインレベルの低下、腸管組織炎症の低下に寄与することが確認された。中でも、DSS+1678+SeMet 群における体重、病態スコア、大腸長さは DSS+SeMet 群に比べて同程度、もしくはそれ以上の改善傾向を示しており、SeMet 補充が PAGU 1678<sup>T</sup> 株によるセレン欠乏の緩和に寄与している可能性を示している。

今後、PAGU 1678<sup>T</sup> 株のセレノプロテイン代謝に関与する遺伝子の欠損株を構築することによって、本研究にて得られた結果が PAGU 1678<sup>T</sup> 株による SeMet 代謝によって生じているのかを明らかにし、*P. bifera* subsp. *muricolitidis* PAGU 1678<sup>T</sup> の UC 病態増悪機構の解明へと繋げていきたい。これらを明らかにすることで、現在対症療法のみが適応とされている UC の根治的な治療方法や治療薬開発の進歩に大きく貢献できると考えている。

#### <引用文献>

- [1] Podolsky, N Engl J Med. 1991; 325: 928
- [2] Xavier et al., Nature. 2007; 448: 427
- [3] Lupp et al., Cell Host Microbe. 2007; 2: 119
- [4] Manichanh et al., Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2012; 9: 599
- [5] Kutusna et al., PLoS ONE. 2018; e0197668
- [6] Kutusna et al., Microbiol Immunol. 2019; 63: 1
- [7] Kurokawa et al. Biomed Res Trace Elements. 2008; 19: 84
- [8] Hiller et al. Nutrients. 2015; 7: 2687
- [9] Kuroki et al. Dig Dis. 2003; 21: 266

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久綱 僚、吉川捺美、富田純子、河村好章
2. 発表標題 Paraclostridium bifermentans subsp. muricolitidis病原性への関与が示唆された微量元素
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久綱 僚、吉川捺美、富田純子、河村好章
2. 発表標題 Bacterial component analysis of Paraclostridium bifermentans subsp. muricolitidis
3. 学会等名 第95回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久綱 僚、岩橋 柚奈、永田 浩一郎、富田 純子、河村 好章
2. 発表標題 単独で潰瘍性大腸炎モデルを重症化させる細菌種の菌体成分解析
3. 学会等名 第94回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久綱 僚、富田 純子、河村 好章
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎モデルに対するP. bifermentans subsp. muricolitidisの病原因子の探索
3. 学会等名 第93回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田雅治、杉浦 蒼、久網 僚、富田純子、河村好章
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎モデルマウスの病態へ影響を及ぼす微量元素
3. 学会等名 第68回 日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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