

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590494

研究課題名（和文）原発性胆汁性肝硬変の原因微生物とそのエピトープの特定

研究課題名（英文）Epitope of causative microorganism of primary biliary cirrhosis

研究代表者

菊池 賢（Kikuchi Ken）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60214748

研究成果の概要（和文）：我々が確立したマウス原発性胆汁性肝硬変（PBC）モデルを用い、PBC 抗原エピトープの 1 つは *Streptococcus intermedius*（SI）のヒストン様タンパクであること、PBC 進展に寄与する抗 gp210 抗体のエピトープがその実体であることを明らかにした。PBC 患者と健常者の歯周における SI の分布を調べると、PBC 患者では高率に SI が陽性になったが、それぞれの SI の病原因子などの保有状況や遺伝的背景に有意の差は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：The epitope of the anti-gp210 antibody, which contributes to the progression of primary biliary cirrhosis (PBC), was conserved in histone-like protein of *Streptococcus intermedius* (SI) in mouse PBC model. SI was more frequently isolated from gingivitis lesions of PBC patients than those in controls. However, there were no significant differences of virulence factors and genetic backgrounds between strains from patients with PBC and control.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：原発性胆汁性肝硬変、抗原エピトープ、ヒストン様タンパク、*Streptococcus intermedius*、比較ゲノム解析、分子模倣

1. 研究開始当初の背景

多くの自己免疫疾患は molecular mimic（分子模倣）と称される細菌などの微生物交叉抗原が発症の引き金となると考えられているが、実際に原因微生物が特定された例は極めて少ない。自己免疫疾患の原因微生物が特定されれば、その疾患特異的な診断・治療・予防への道が切り開かれ、21 世紀医療の大きな進歩になる。原発性胆汁性肝硬変（PBC）は主

に中年以降の女性に発症する肝臓の小葉間胆管周囲の慢性非化膿性炎症を主体とする原因不明の自己免疫疾患で、進行すると肝硬変に至り、肝移植しか治療手段がない難病である。我が国には 4000 名程の患者がおり、毎年、300 名程の新規患者が発症している。これまでに大腸菌、レトロウイルスなどがその原因微生物として候補に挙げたが、確定には至っていなかった。研究代表者は PBC 患

者の胆管周囲の慢性非化膿性炎症部位にレンサ球菌由来のリポペプチド酸が証明されること、患者の血清中の抗リポペプチド酸抗体が高値を示すことから、何らかのレンサ球菌の関与を疑い、スクリーニングをしたところ、*Streptococcus intermedius* (SI) に対する抗体が最も高いことを見いだした。SI をマウスに投与すると PBC 同様の病変が再現できることも示した。更に患者血清では対照患者 (HCV) 血清に比べ、有意に SI 特異ヒストン様タンパク (HLP) 抗体が高く、PBC 病変部位に抗 HLP 抗体で検出されるタンパクが認められることから、これまで原因が不明であった PBC の分子模倣の原因微生物として SI が強く疑われた。

2. 研究の目的

本研究では研究代表者が実施した SI ゲノム解析から得られた情報を元に分子模倣 epitope の特定、PBC を引き起こす特定の遺伝背景を持った SI クローンが存在するかどうか、を明らかにする。

3. 研究の方法

SI NCD0 2227 の全ゲノム解析データから、抗 HLP 抗体の認識エピトープを明らかにすると同時に、抗 HLP 抗体が PBC 患者の何の自己抗体なのか、標的エピトープが何であるのかを調査した。また、PBC の診断に用いられ、PBC 患者で最も高率に陽性となる抗ミトコンドリア抗体のエピトープはピルビン酸脱水素酵素 E2-component (PDC-E2) の EIETDK であることがわかっているが、そのモチーフが SI ゲノム上に保存されているかどうか検証を行った。SI はレンサ球菌の中では嫌気好性を示し、酸素に触れにくい歯周などの環境に生息していると考えられている。このため、健常者 (他に全身疾患のない患者) と PBC 患者の歯周部位検体から SI の分離を行い、SI 保菌率に違いがあるかどうか、得られた SI 株及び深部膿瘍などの感染症病巣から分離された SI 株との間で病原因子、遺伝的背景に差があるかどうか検証した。

4. 研究成果

マウス PBC 実験モデルで高値を示した抗 HLP 抗体の認識する SI-HLP エピトープは ARKGRNPQTGKEITI であり、PBC 自己抗体の中で、病態の進行に大きく寄与すると考えられている抗 gp210 抗体の認識エピトープである ARKXXXP が保存されていた。実際、マウス PBC モデル血清はマウス gp210 と交叉反応を示し、ヒト PBC 患者血清は SI-HLP エピトープを認識していた。驚いたことに SI ゲノム上にはすべてのピルビン酸脱水素酵素コンポーネントが欠落していたが、EIETDK モチーフは lactose specific PTS system IIBC component, two

component sensor histidine kinase, DNA polymerase II gamma/tau unit, arginyl-tRNA synthetase の 4 タンパクに保存されており、これらの配列は調べた様々な由来の SI51 株すべてが保有していた。

PBC 患者 5 名、他の疾患のない対照者 19 名などの歯周部位の SI 検出率を調べたところ、PBC 患者では 5 名中 4 名 (80%) から SI が分離されたのに対し、コントロールでは 3/19 (16%)、自己免疫性膵炎 0/4、シェーグレン 0/2、その他の自己免疫疾患、慢性炎症疾患では 4/11 (36%) と陽性率が低かった。これらの SI 株と深部膿瘍、感染性心内膜炎、敗血症など臨床的に明らかな感染症を起こした株でゲノム解析から病原因子・定着因子と想定されるタンパクをコードする 100 遺伝子を選び、特異 PCR を設計し、その分布状況を調査したが、PBC 患者由来株、健常者由来株、各感染症病巣由来株に特有の病原・定着因子のパターンは得られなかった。また、それぞれの SI 株について *sodA*, *hlp*, *rpoB*, *ddl*, *srtA*, *dnaJ*, *groEL*, *eno*, *gyrB*, *recN*, *tuf* の 11 house keeping gene について、全塩基配列解析を行い、遺伝的背景を調べたが、PBC やそれぞれの感染症に特有のクローンは証明できなかった。これらのことから、SI の持続感染あるいは保菌による慢性の SI 代謝産物、抗原供給が PBC 発症・進行の一因となっている可能性は示唆されたが、PBC 発症にかかわる特有の SI クローンは存在する訳ではなく、むしろ慢性炎症を許容する宿主側の因子が PBC 発症には重要であると思われた。SI は口腔、腸管、皮膚、外陰部などの他の常在菌叢からはほとんど検出されない一方で、SI は歯周病の原因菌の一つとしてよく知られている。今回の検討でも歯周部位からは比較的高頻度に検出されていることから、SI の持続感染・定着の場として、歯周病は SI のヒトでの主要な存在部位ではないかと考えられた。本研究の成果は、PBC 患者の歯周病を治療・コントロールすることで PBC 発症や PBC の病期進行を防ぐことができるのではないかと期待される。

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 7 件)

1. Haruta I, Kikuchi K, Nakamura M, Miyakawa H, Hirota K, Kato H, Miyakawa H, Shibata N, Miyake Y, Hashimoto E, Shiratori K, Yagi J. Involvement of commensal bacteria may lead to dysregulated inflammatory and autoimmune responses in a mouse model for chronic nonsuppurative destructive cholangitis. J.

- Clin. Immunol. 査読あり 2012, e-published.
2. 菊池 賢：感染症四方山話（3）：感染症研究との出会い. The Chemical Times 査読なし 224, 2012, 8-14.
 3. 菊池 賢：口腔内細菌と自己免疫疾患. 化学療法の領域 査読なし 27: 2011, 71-78.
 4. Yanagisawa N, Haruta I, Kikuchi K, Shibata N, Yagi J. Are dysregulated inflammatory responses to commensal bacteria involved in the pathogenesis of hepato-biliary-pancreatic autoimmune disease? An analysis using mice models of primary biliary cirrhosis and autoimmune pancreatitis. ISRN Gastroenterol. 査読有り 2011, e-published.
 5. Haruta I, Kikuchi K, Hashimoto E, Nakamura M, Miyakawa H, Hirota K, Shibata N, Kato H, Arimura Y, Kato Y, Uchiyama T, Nagamune H, Kobayashi M, Miyake Y, Shiratori K, Yagi J. Long-term bacterial exposure can trigger nonsuppurative destructive cholangitis associated with multifocal epithelial inflammation. Lab. Invest. 査読有り 90: 2010, 577-588.
 6. Tomoyasu T, Tabata A, Hiroshima R, Imaki H, Masuda S, Woley RA, Aduse-Opoku J, Kikuchi K, Hiramatsu K, Nagamune H. Role of catabolite control protein A in the regulation of intemedilysin production by *Streptococcus intermedius*. Infect. Immun. 査読有り 78: 2010, 4012-4021.
 7. 菊池 賢：常在菌感染を誘因とする全身疾患 —*Streptococcus intermedius*と原発性胆汁性肝硬変. 無菌生物 査読有り 40: 2010, 39.
- [学会発表] (計 10 件)
1. 菊池 賢、松田真理、水谷友紀、馬場理、崔 龍洙、平松啓一、第 21 回 Lancefield レンサ球菌研究会、*Streptococcus intermedius* ゲノムにみられる特有の microcompartment を含む genomic island、2012 年 6 月 8 日、大阪大学歯学部（大阪）発表予定
 2. 菊池 賢、第 23 回日本臨床微生物学会総会、微生物検査における MALDI-TOF MS の可能性、2012 年 1 月 21 日、パシフィコ横浜（横浜）
 3. 菊池 賢、松田真理、馬場 理、崔 龍洙、平松啓一、第 85 回日本細菌学会総会 Genes encoding bacterial microcompartments and relationship to anaerophilic /carbon dioxide dependency、2012 年 3 月 27 日、長崎ブリックホール（長崎）
 4. Kikuchi K, Matsuda M, Baba T, Cui L, Hiramatsu K, Genes containing LPXTG motif in *Streptococcus intermedius* identified from whole genome sequences. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress、2011 年 9 月 7 日、札幌コンベンションセンター（札幌）
 5. 菊池 賢、松田真理、馬場 理、崔 龍洙、平松啓一、第 58 回毒素シンポジウム、ゲノム解析からみ *Streptococcus intermedius* の病原因子、2011 年 7 月 7 日、順天堂大学（東京）
 6. 菊池 賢、松田直人、松田真理、野竹重幸、玉井清子、市川香織、柳沢英二、平松啓一、第 20 回 Lancefield レンサ球菌研究会、MALDI-TOF MS による *Streptococcus anginosus* group の同定、2011 年 6 月 17 日、愛知学院大学薬学部（名古屋）

7. 菊池 賢、松田直人、松田真理、野竹重幸、玉井清子、柳沢英二、平松啓一、第 85 回日本感染症学会総会
MALDI-TOF MS による *Streptococcus* 属の同定、2011 年 4 月 22 日、ザ・プリンス パークタワー東京（東京）
8. 紺 泰枝、菊池 賢、*Streptococcus intermedius* による化膿性膝関節炎の 1 例、2011 年 4 月 22 日、ザ・プリンス パークタワー東京（東京）
9. 菊池 賢、第 43 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会、*Streptococcus intermedius* と原発性胆汁性肝硬変、2011 年 1 月 21 日、日本大学歯学部（東京）
10. 友安 俊文、田端 厚之、菊池 賢、佐々木崇、馬場 理、平松啓一、長宗 秀明、第 56 回毒素シンポジウム、*Streptococcus intermedius* が産生するヒト特異的細胞溶解毒素インターメディリシンの 発現調節機構の解析、2009 年 8 月 28 日、アルモニーテラッセ(岐阜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 賢 (KIKUCHI KEN)

順天堂大学・医学部・感染制御科学・准教授

研究者番号：60214748