

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：32428

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23240061

研究課題名(和文) ヨーネ菌菌体成分による宿主免疫修飾と炎症性腸疾患発病機序の解明

研究課題名(英文) Role of Mycobacterium avium paratuberculosis antigen in the host immune modification and pathogenesis of IBD

研究代表者

百溪 英一 (Momotani, Eiichi)

東都医療大学・公立大学の部局等・教授

研究者番号：50355145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヨーネ菌抗原の免疫修飾作用と自己免疫難病クローン病(CD)との関連を皮下、経腸接種の組み合わせで免疫病理学的に評価した。ヨーネ菌脂質抗原(EV抗原)、EV抗原分画を合成したlipopeptide 11s、全菌体抗原、可溶性抗原、菌総DNA、マウス腸陰窩細胞抗原の順にCD様病変誘導作用が強かった。EV抗原と牛乳の繰り返し経口感作はアレルギー症状も惹起した。抗原の繰り返し経腸接種は免疫寛容を誘導した。非IBDの成人の7%がヨーネ菌特異的IgE抗体を保有していた。ヨーネ菌細胞壁の脂溶性抗原が全層性腸炎惹起作用やアレルギーなど免疫修飾作用を有す事、その責任分子の構造を明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：Role of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (Map) antigen in the host immune modification and pathogenesis of IBD was evaluated immune-pathologically. Various Map antigens were inoculated by various combination of subcutaneous and/or enteral route. Intensity of inflammation were lipophilic surface antigen (EV antigen) was highest and whole and whole-water-soluble antigen, total DNA were followed. Continuous oral administration of milk and EV antigen caused allergic symptoms in 3 weeks.

研究分野：免疫病理学

キーワード：クローン病 ヨーネ菌 炎症性腸炎 マウスモデル 自己免疫病

1. 研究開始当初の背景

(1) 1932年にクローン医師が慢性の全層性腸炎のカテゴリーを発表した。当時、原因は不明であるが、肉眼的病変が家畜の慢性下痢性伝染病のヨーネ病に類似していると報告された。クローン病(CD)の特徴は皺襞状の粘膜肥厚、糜爛や縦走潰瘍である。ヨーネ病の粘膜病変の特徴も皺襞状の粘膜肥厚であるが通常、糜爛や潰瘍は認められない。さらに、ヨーネ病腸炎の特徴は粘膜層における類上皮細胞肉芽腫の粘膜層の著しい増殖と、肉芽腫を構成する類上皮細胞内での著しいヨーネ菌の増殖を特徴とするが、クローン病の肥厚病変にも類上皮細胞肉芽腫が散見されることから肉芽腫性腸炎のカテゴリーに含まれる。

(2) 慢性経過と腸病変の肉眼的類似と肉芽腫の存在からクローン病の原因がヨーネ菌であると疑われ、クローン病病変内のヨーネ菌やヨーネ菌増殖の探索が続けられた。しかし、抗酸菌染色や免疫組織化学的染色を用いてもクローン病の病変内にはヨーネ病に見られるような抗酸菌は証明されなかった。一方で、ヨーネ菌特異的 DNA (IS900 挿入配列) は PCR 法によって数多くの論文で報告された。牛のヨーネ病においては感染後腸粘膜病変内で増殖したヨーネ菌は腸の絨毛から糞便内に排菌されるが、同時期に牛乳中にも排菌されることが知られている。そのため感染牛の牛乳中にはヨーネ菌が検出され、それは子牛への感染源になると同時に生菌や死菌の人への媒介物となる。日本以外の酪農国のヨーネ病汚染は著しく、ヨーネ菌による乳製品や肉の汚染は多数の論文で報告されている。

(3) ヨーネ菌の存在を示唆する DNA は PCR 法により CD 病変部などで証明されるものの、菌体は認めがたいことから担当者らはヨーネ病汚染国から輸入される乳製品を介して人が摂取しているヨーネ菌抗原が宿主の免疫を修飾して持続的な炎症などを起こしている可能性を仮説として立てた。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的はヨーネ菌の有する抗原成分がマウスやラットにクローン病様の全層性腸炎を惹起する条件の評価をして、病変誘導活性の有る抗原を明らかにする。

(2) 抗原の接種ルートや接種回数など、病変が起こりやすい条件の評価を行うこと。

(3) 病変の免疫病理学的特徴付けを行う。

(4) 病変部で生じている免疫学的変化を分子生物学的に明らかにすること。

(5) 病変を起こす抗原の化学的構造を明らか

にし、合成して再現性を明らかにする。

(6) 本実験の如く、人が汚染された乳製品を接種したことによる実際の曝露の免疫学的証拠を明らかにすることなどである。

3. 研究の方法

(1) 抗原: ヨーネ菌細胞壁脂質抗原 (以下 EV 抗原) および同死菌の全菌体抗原 (FM 抗原)、同可溶性抗原 (SM 抗原)、ヨーネ菌総 DNA、合成脂質抗原 lipopeptide IIs の作用を評価した。CD が自己免疫病マウスの腸陰窩細胞から分離精製した腸上皮細胞可溶性抗原の作用も評価した。

(2) 感作法: 感作法については皮下接種+直腸内接種、皮下接種+直腸内接種 2 回、皮下接種+直腸内接種 3 回、皮下接種+腹腔接種+直腸内接種、皮下接種+EV 抗原腹腔接種+直腸内接種など。また、EV 抗原と牛乳の経口感作も行った。

(3) 解析法: 感作 7-10 日後に直腸内感作し、最終感作後 5 日目に剖検を実施して後消化管および腸間膜リンパ節の炎症反応、細胞性応答、液性応答の解析をマウス及びラットを用いて実施した。ホルマリン固定、凍結組織、血液塗抹、病変部とリンパ組織から総 RNA を凍結保存した。病理組織学的、免疫病理学的解析とともに、定量 PCR 法による分子生物学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) もっとも強い炎症を起こしたのはヨーネ菌細胞壁の粗精製 EV 抗原で、合成抗原の作用はやや弱かった。

結腸の肉眼病変は暗赤色な腸壁の発赤肥厚 (図 1) や腫大であった (図 2)。腸炎が認められた場合には腸間膜リンパ節が腫大して認めやすくなっていた。ラットでは粘膜肥厚がより顕著に観察された (図 3)。

図 1



図 2



図 3



(2)組織病変は固有層の好中球～リンパ球浸潤(図4)から糜爛潰瘍(図5)まで様々であった。ラットにも同様な所見が得られた。

図 4

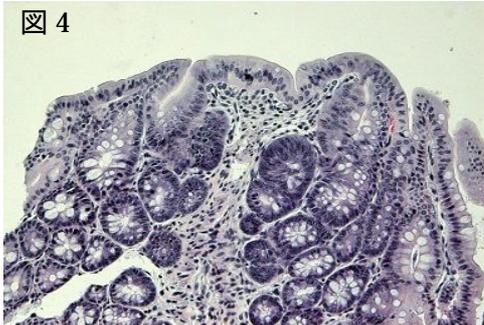
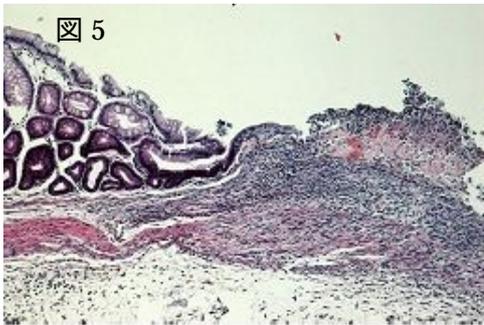
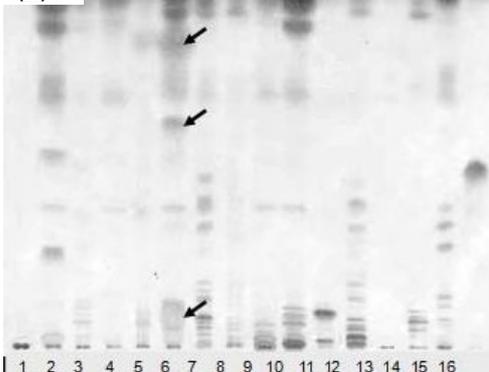


図 5

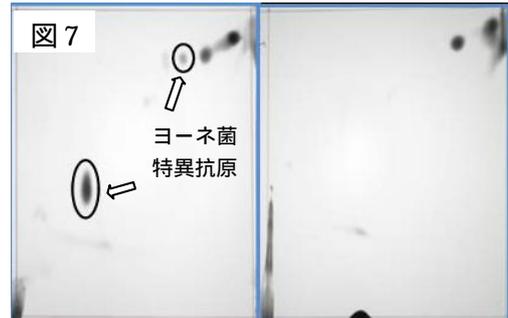


(3)また、EV 抗原を薄層クロマトグラフィーで分画してヨーネ菌と近縁の鳥型結核菌の脂質抗原には存在しない特異的な抗原を抽出して構造を決定し合成を行った。図6は各種抗酸菌から抽出した EV 抗原を薄層クロマトグラフィーで展開した所見。レーン 5,6 がヨーネ菌 EV 抗原で、7-8 の鳥型結核菌、9 の BCG と異なった特異的なスポットが認められ(図6)この脂質がヨーネ病感染牛で抗体産生を早期に誘導することがわかっている。

図 6



二次元薄層クロマトグラフィーでヨーネ菌と鳥型結核菌の EV 抗原を展開して比較したところ、ヨーネ菌には明らかに他の抗酸菌と異なる脂質抗原が有ることが明らかになった。この画分を異なったスポットが明らかになった(図7)。

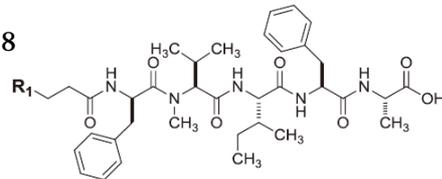


(4)ヨーネ菌の特異的脂溶性抗原の活性は脂肪酸にペプチドがついたりリポポリペプチドにあることが明らかにされた(図8)。

(arachidyld-Phe-N-Me-L-Val-L-Ile-L-Phe-L-Ala-OH)

リポペプチド II s が抗体誘導活性が最も高く、

図 8



Lipopeptide II α (2): R₁ = C₁₅H₃₂

Lipopeptide II β (3): R₂ = C₁₇H₃₆

Lipopeptide II γ (4): R₃ = C₁₉H₄₀

実験的炎症性腸疾患誘導においても鍵分子である可能性が示されたことから、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群そしてアレルギーなど免疫病における本分子の関与を明らかにする新たな方向性が示された。クローン病と同じく自己免疫性難病の多発性硬化症について、同じ抗原を用いてマウスに自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を作ることもできた。

(5) 本研究で用いられたヨーネ菌抗原に対する日本人の免疫応答性を約 126 人の日本人健康者の血漿を用いて各クラスの免疫グロブリンを ELISA 法で調べた所、14%に特異抗体(IgG)が存在したことからヨーネ菌抗原を含む食品の継続的摂取により人への曝露が起こっていることが明らかにできた(図9a)。これらの抗体陽性者は杉花粉など呼吸器アレルギーの既往症もあった。抗体のクラスは IgG4 が多かった(図9b)。

図 9a

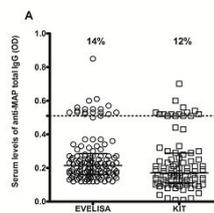
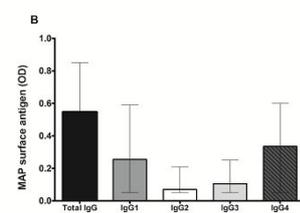


図 9b



マウスのクローン病モデルの分子免疫学敵解析は継続するが、これまでの研究結果より、ヨーネ菌の細胞壁脂のリポペプチド抗原は主に乳製品を通じて生体に取り込まれて消化管を介して生体に様々な免疫修飾作用を与えて、自己免疫病やアレルギーの発症に関与していることが強く示唆された。これら原因不明の免疫病の病理発生機序の解明本研究は従来知られていなかった新たな方向性を明示することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Cossu C, Yokoyama K, Sechi L, Otsubo S, Tomizawa Y, Momotani E, Hattori N. Humoral response against host-mimetic homologous epitopes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Japanese multiple sclerosis patients. Scientific Reports, In Press(Paper #SREP-16-08887A) (2016)

Mitachi K, Gautam NSL, Rice HJ, Eda K, Wadhwa A, Momotani E, Hlopak JP, Eda S, Kurosu M, Structure determination of lipopeptides from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and identification of antigenic lipopeptide probes, Analytical Biochemistry 505 29-35 (2016).

Otsubo S, Cossu D, Eda S, Otsubo Y, Sechi LA, Suzuki T, Iwao Y, Yamamoto S, Kuribayashi T, Momotani E Seroprevalence of IgG1 and IgG4 Class Antibodies Against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Japanese Population. Foodborne Pathog Dis. 2015, 12(10): 851-856(2015):10.1089/fpd.2015.1956.

Martcheva M, Lenhart S, Eda S, Klinkenberg D, Momotani E, Stabel J. An immuno-epidemiological model for Johne's disease in cattle. Vet Res. 46:69 (2015) doi: 0.1186/s13567-015-0190-3.

Kuribayashi T, Seita T, Momotani E, Yamazaki S, Hagimori K, Yamamoto S Elimination Half-Lives of Acute Phase Proteins in Rats and Beagle Dogs During Acute Inflammation. Inflammation. 2015 38(4):1401-5 (2015). doi: 10.1007/s10753-015-0114-4.

* 現在投稿中を含め分子生物学的検討により得られた成果は全て論文発表する。

〔学会発表〕(計12件)

Momotani E, Eda S, Cossu D, Histopathological characteristics in new experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induced by

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* in mice, 13th International Colloquium on Paratuberculosis, 2016/6/20-23, La Cité - Nantes Event Center, Nantes, France.

百溪 英一、Davide Cossu、大坪 茂、山本 静雄、栗林 尚志、江田 栄俊、第88回日本細菌学会国際シンポジウム(招待講演)食品を汚染する微生物に起因するアレルギー、(食物アレルギーの研究と微生物の関連を考えるセッション)、岐阜県長良川国際会議場、3月27日 2015/3/26-28

百溪英一、第10回 Infection Forum Tokyo、家畜の重要疾病と人の病態との関連について(招待講演)東京ドームホテル、2015年3月20日

Kuribayashi T, Seita T, Momotani E, Yamamoto S, Elimination half-lives of typical proteins in rats induced acute inflammation, 第43回日本免疫学会、京都国際会館、2014年12月10-12日

百溪英一、Role of the MAP antigen and/or adjuvant

ADJUVANT IN PATHOGENESIS OF HUMAN DISEASES 12th International Colloquium on Paratuberculosis 2014/6/22-24. Parma Municipality Congress Centre.

百溪英一：食品中の抗酸菌アジュバント物質の免疫への影響 クローン病モデルマウスから示唆されること、(招待講演)大分アレルギー講習会 2014年2月1日(大分県消費生活・男女共同参画プラザ アイネス)

〔図書〕(計2件)

百溪英一、ヨーネ病・クローン病からサルコイドーシスを学ぶ、呼吸器内科、第29巻第4号(4月号) P319-323

森康之ほか 初乳中ヨーネ菌の加熱殺菌試験、臨床獣医 2015年11月号

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

百溪英一(Momotani, Eiichi)

東都医療大学・ヒューマンケア学部・教授
研究者番号：50355145

(2)研究分担者

栗林尚志(Kuribayashi, Tadashi)

麻布大学・環境保健学部・准教授

研究者番号：00385799

山本静男 (Yamamoto, Shizuo)
麻布大学・環境保健学部・教授
研究者番号：40130900
(平成26年度まで。定年退職による。)

(3)連携研究者 なし()

(4)協力研究者

江田栄俊
テネシー大学(ノックスビル)・教授

大坪 茂
大坪会三軒茶屋クリニック・院長

Davide Cossu
順天堂大学・医学部・神経内科・助手

黒須道夫
テネシー大学(メンフィス)・薬学部・
教授

日比紀文
北里大学大学院医療系研究科・特任教授
北里大学炎症性腸疾患先進治療センタ
ーセンター長

小林 拓
北里大学炎症性腸疾患先進治療センタ
ー副センター長

江石 義信
東京医科歯科大学医学部器官システム
制御学系 消化器・代謝病学講座
人体病理学分野教授

池上 雅博
東京慈恵会医科大学・病理学講座・教授

村上覚史
東京農業大学畜産学科家畜衛生学・教授

森康行
農研機構・動物衛生研究所細菌・寄生虫
研究領域

西森 敬
農研機構・動物衛生研究所細菌・寄生虫
研究領域

下地善弘
農研機構・動物衛生研究所細菌・寄生虫
研究領域