

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：基板研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18300138
 研究課題名 (和文) 病態モデル動物の病態発現を指標とした SPF マウス基本腸内細菌叢の作出
 研究課題名 (英文) Production of basic intestinal microflora for SPF mice using development of lesions of human disease model mice as an indicator.
 研究代表者
 伊藤 喜久治 (ITO KIKUJI)
 東京大学・大学院能楽生命科学研究所・准教授
 研究者番号：50100045

研究成果の概要 (和文)： Δra (リュウマチモデル)、AID (IgA 産生不全マウス)、IL-10 KO マウス (IBD モデル) の病態発現に関与する菌群の特定と FISH 法を用いた SPF マウスの腸内フローラモニタリングシステムの構築

研究成果の概要 (英文)：Identification of intestinal bacteria related to the development of lesions in Δra (rheumatoid model), AID (IgA production failure model) and IL-10 KO (IBD model) mice, and development of monitoring system for mouse intestinal flora using FISH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2007 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：腸内フローラ、病態モデル、SPF マウス、モニタリング

1. 研究開始当初の背景

多くの遺伝子改変動物がヒト病態も出る
 として作出されているが、多くのモデルで無
 菌化することによりその病態が消失してし
 まうとの報告がなされ、病態発現には腸内フ
 ローラの関与が不可欠であることが明らか
 にされている。しかし、どのような菌群が病
 態発現に関与しているかは明らかでなく、飼
 育されている SPF 環境により病態発現が異
 なることがあり、SPF 環境の基準化が要求さ

れている。

2. 研究の目的

無菌化することで病態発現が消失する病
 態モデルマウスである Δra (リュウマチモデ
 ル)、AID (IgA 産生不全マウス)、IL-10 KO
 マウス (IBD モデル) の病態発現に関与する
 菌群の特定することと、それらに関与する菌
 群をモニタリングするための簡便法として
 fish 法によるモニタリングシステムを構築す
 ることを目的とした。

3. 研究の方法

病態発現に関与する菌群の特定には正常なマウスの腸内から各種の菌または菌群を分離し、無菌化した病態モデルマウスに投与してノトバイオートマウスを作出し、病変の形成を比較した。これらの結果を含めて SPF コロニーの腸内フローラのモニタリングシステムを FISH 法を用いて容易に行えるシステムを確立を試みた。

4. 研究成果

AID では IgA 産生細胞と B 細胞のバランスからこれまでの報告で *Segmental-filamentous-bacteria*(SFB)がその病態発現の結果と考えられていたが SFB 同様に *Escherichia coli*, fusiform-shaped bacteria でも同様の病態発現がみられ、*Lactobacillus*, *Bacteroides* ではその病態発現がみられなかった。Δra でも同様に無菌マウス、通常マウス、各種ノトバイオートマウスを比較し、病態を比較しているが現在のところ無菌マウスでは通常マウスに比べて足関節の肥厚が弱く、免疫賦活作用の強い *Lactobacillus* や *Clostridium perfringens* ではその中間に位置するが、*C. perfringens* は *Lactobacillus* に比べて強い反応であった。以上途中経過ではあるが、定着する腸内菌により病態発現が強く影響をうけることが明らかになってきた。IL-10 KO マウスを無菌化し各種ノトバイオートマウスを作出して、通常化したマウスでの腸炎と発症の程度を比較した。その結果、通常化マウスでは結腸部での飛行が顕著で、クリプトノ伸長、杯細胞の減少、粘膜固有層および粘膜下織への著しい炎症細胞の浸潤が見られた。一方無菌マウスではこのような変化は見られなかった。ノトバイオートでは fusiform-shaped bacteria を含む *Clostridium* 群で結腸部での肥厚が見られ、炎症細胞浸潤は認められたが著しい浸潤は

限局性であった。他のノトバイオートでは無菌マウスに近いものであった。これらの結果は、IL-10 KO マウスでの腸炎発症には *Clostridium* が強く関与し、さらにプラスアルファの菌種が必要とされた。

FISH 法を用いたマウス腸内フローラの解析法については、新たに作成した *Clostridium* 関係の 5 つのプロープ、*Bacteroides* 用 2 種、*Lactobacillus* 用 1 種、*Bacteria* 全体用 1 種の合計 9 種類のプロープをセットとして開発した。これを用いてブリーディングコロニーごと、系統ごと、飼育環境ごとの違いを検討した。その結果、*Bacteroides* と *Clostridium* に違いがみられた。また、*Bacteroides* の菌種レベルでのプロープを 8 種類作成し、ブリーディングコロニーでの違いを比較したところ、*B. acidifaciens* と *fragilis* グループの構成比が著しく異なっていた。マウスの *Bacteroides* では *B. acidifaciens* が主構成菌種で、*fragilis* グループでは *B. vulgatus* が再優勢であった。これまでの成果によりマウス腸内フローラ全体のモニタリング、*Bacteroides*, *Lactobacillus* 菌種ごとの、*Clostridium* クラスターごとのモニタリングが行えるシステムが出来たものと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件、査読有)

1. Tsuda, M., Hosono, A., Yanagibashi, T., Hachimura, S., Hirayama, K., Itoh, K., Takahashi, K. and Kaminogawa, S. Prior stimulation of antigen-presenting cells with *Lactobacillus* regulates excessive antigen-specific cytokine responses in vitro when compared with *Bacteroides*. *Cytotechnology* 55: 89-101 (2007)
2. Momose Y., Hirayama K. and Itoh, K.

- Effect of organic acids on inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 colonization in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota. **Antonie van Leeuwenhoek** 93: 141-149 (2008)
3. Momose, Y., Hirayama, K. and Itoh, K. Competition for ploline between indigenous *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota and its contribution to the colonization resistance against *E. coli* O157:H7. **Antonie van Leeuwenhoek** 94: 165-171 (2008)
 4. Tsuji, M., Suzuki, K., Kitamura, H., Maruya, M., Kinoshita, K., Ivanov, I.I., Itoh, K., Littman, D. R. and Fagarasan, S. Requirement for Lymphoid Tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. **Immunity** 29: 261-271 (2008)
 5. Hase, K., Takahashi, D., Ebisawa, M., Kawano, S., Itoh, K. and Ohno, H. Activation- induced cytidine deaminase deficiency causes organ-specific autoimmune disease. **PLoS ONE** 3: e3033 1-10 (2008)
 6. Yanagibashi, T., Hosono, A., Oyama, A., Tsuda, M., Hachimura, S., Takahashi, Y., Itoh, K., Hirayama, K., Takahashi, K. and Kaminogawa, S. *Bacteroides* induce higher IgA production than *Lactobacillus* by increasing activation-induced cytidine deaminase expression in B cells in murine peyer's patches. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 73: 372-377 (2009)
 7. Tsuda, M., Hosono, A., Yanagibashi, T., Hachimura, S., Hirayama, K., Umesaki, Y., Itoh, K., Takahashi, K. and Kaminogawa, S. Intestinal *Bifidobacterium* association in germ-free T cell receptor transgenic mice down-regulates dietary antigen-specific immune responses of the small intestine but enhances those of large intestine. **Immunobiology** 214: 279-289 (2009)
 8. Inanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C. Santee, C.A., Lynch, S.V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K. and Littman, D.R. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell** 139: 485-498 (2009)
 9. Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, GS, Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Yabashi, A., Waguri, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Iimura, M., Hamura, K., Fukuoka, S., Lowe, AW, Itoh, K. Kiyono, H. and Ohno, H. Uptake through glycoprotein 2 of FimH⁺ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. **Nature** 462: 226-230 (2009)
 10. Momose, Y., Maruyama, A., Iwasaki, T., Miyamoto, Y. and Itoh, K. 16S rRNA gene sequence-based analysis of clostridia related to conversion of germfree mice to the normal state. **J. Appl. Microbiol.** 107: 2088-2097 (2009)
- [学会発表] (計 2 件)
1. 伊藤喜久治、腸内フローラと腸内病原菌、第 12 回腸内細菌学会、2008 年 6 月 13 日、東京大学弥生講堂
 2. Momose, Y., Itoh, K. 他、Design of group-specific oligonucleotide probes for the detection of mouse

clostridial groups and their application to the analysis of mouse fecal microbiota by fluorescence in situ hybridization. 2nd TNO Beneficial Microbes Conference、2010年3月16日、NH Conference Centre、The Netherlands

〔図書〕(計3件)

1. 伊藤喜久治：腸内フローラとプロバイオティクス乳酸菌 乳酸菌の保健機能と応用、上野川修一監修 p 24- 34 シーエムシー出版、東京 (2007)
2. 伊藤喜久治：胃腸管の微生物とプロバイオティクス、食品機能性の科学、西川研次郎監修 p 426-432 産業技術サービスセンター、東京 (2008)
3. 伊藤喜久治：腸管における細菌増殖、微生物増殖学の現在・未来 福井作蔵・秦野琢之編・監修 p 297-306 地人書館、東京 (2008)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤喜久治 (ITOH KIKUJI)
東京大学・大学院能楽生命科学研究科・准教授
研究者番号：50100045

(2) 研究分担者

平山和宏 (HIRAYAMA KAZUHIRO)
東京大学・大学院能楽生命科学研究科・助教
研究者番号：60208858

(3) 研究分担者

浦野 徹 (URANO TOURU)
熊本大学・生命科学研究科・教授
研究者番号：90101899

(4) 研究分担者 (H18-H19)

高倉 彰 (TAKAKURA AKIRA)
(財) 実験動物中央研究所・室長 (研究職)
研究者番号：60167484