

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06019

研究課題名(和文) 粘膜バリア障害誘導による有鞭毛菌を主体とした潰瘍性大腸炎発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of ulcerative colitis focusing on mucosal barrier disorder caused by bacteria possessed flagella

研究代表者

山中 仁木 (Yamanaka, Hitoki)

信州大学・学術研究院総合人間科学系・准教授

研究者番号：30533921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウス下部消化管に生息し鞭毛をもつ*Helicobacter japonicus* (Hj)は、機能的B、T細胞を欠くSCIDマウスの盲結腸粘膜において重度の炎症を誘導する。免疫正常BALB/cマウスでは、粘膜における各種サイトカイン発現を亢進させ軽度の炎症を誘導しながら、粘液MUC2やLYPD8発現を低下させ生息し易い環境を自ら作り出していた。一方でReg3 やReg3 など抗菌ペプチド発現を上昇させ、この現象は感染後長期に渡り維持されており、バクテロイデス属が増加しクロストリジウム属XIVaやIVに属する菌の減少が見られた。Hj感染により腸内細菌叢の変調を持続的に誘導することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*Helicobacter*属菌は、ピロリ菌以外では病原性やそのメカニズムが明らかではなく、また、人獣共通感染症と認識される菌も多い。本研究では、我々が実験用マウスから分離した*Helicobacter japonicus*に着目し、その病原性と共に一部ではあるがそのメカニズムについて明らかにすることができた。一方で、この細菌の感染による炎症誘導等の負の影響の他に、宿主粘膜バリアシステムの向上への貢献についても考えられ、この菌による宿主への影響で新たな視点が得られた。更に、本研究では、抗菌ペプチド発現評価系であるオルガノイドの作出法についても目途が立ち、今後の研究に応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：*Helicobacter japonicus* (Hj), which colonizes in lower intestinal tract of mice and has flagella, induces severe inflammation in the intestinal mucosa of SCID mice lacking functional B and T cells. In BALB/c mice, Hj infection enhances the expression of various cytokines and inducing mild inflammation in mucosa. In addition, Hj controls the expression of antimicrobial factors such as MUC2 and LYPD8 to create the environment in which they could colonize in intestine of mice. Hj infection also enhances the expression of Reg3, Reg3 and defensin14 resulting in the dysbiosis such as an increase in *Bacteroides* and a decrease in *Clostridium* XIVa and IV. Increased expression of these antimicrobial peptides maintained for a long period after infection. Our study shows that Hj infection induces dysbiosis resulting in causing mild inflammation persistently in intestinal mucosa

研究分野：実験動物学、感染症、感染(生体)防御

キーワード：ヘリコバクター属菌 盲結腸粘膜 腸内細菌叢 粘膜バリア 抗菌ペプチド マウス

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎の発症は、粘膜バリア機能障害が起こることがきっかけとなり、そこには腸内細菌が関与していると考えられている。粘膜バリアの1つとして、粘液と抗菌ペプチドで構成される粘液層形成が挙げられる。粘液や抗菌ペプチドの産生は、杯細胞やパネート細胞が細菌成分やサイトカイン刺激を受けて促進される。潰瘍性大腸炎患者の大腸では、粘液産生量の低下、抗菌ペプチド産生異常が見られる。その中には、有鞭毛菌の粘膜上皮への侵入防御に働くLYPD8も同様に、患者の大腸粘膜では発現の低下が認められている。このLYPD8の発現調節機構、また、潰瘍性大腸炎との因果関係について明らかではない。

多くの哺乳類動物から分離されるヘリコバクター属菌は有鞭毛菌で、多くの菌種で病原性やそのメカニズムが明らかではない。我々が実験用マウスから分離した *H. japonicus* 分離株は、免疫不全である SCID マウスに感染すると、盲結腸粘膜において炎症を誘導する。また、感染させた免疫正常の BALB/c マウスでは、軽度ながら盲腸粘膜において炎症を認め抗菌ペプチド発現にも影響があることが認められた。

そこで、我々は有鞭毛菌であるヘリコバクター属菌に対するバリア形成不全の誘導が潰瘍性大腸炎発症の原因となるとの仮説を立て、本研究を計画した。

2. 研究の目的

「有鞭毛菌に対するバリア形成不全の誘導が潰瘍性大腸炎発症の原因となる」との仮説から、本研究では我々独自に実験用マウスから分離した腸肝型ヘリコバクター属菌を用いて粘膜バリア形成不全誘導能について明らかにし、有鞭毛菌を主体とする潰瘍性大腸炎発症メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *H. japonicus* 感染マウスの盲結腸粘膜における病態と免疫防御反応

我々が分離した *H. japonicus* Mu-ngs1 株をスキロー変法培地で培養した後、ブルセラ液体培地に浮遊させた菌液を6-7週齢のBALB/c雄マウスに複数回経口投与した。感染の確認は、糞便からDNA抽出し菌属特異的プライマーを用いてPCRおよびPCR産物のシークエンス解析によって行った。感染後3週および24週後の感染マウスを安楽死させ、腸粘膜上皮細胞およびリンパ球は、EDTAあるいはコラゲナーゼ処理して得た分画からPercol密度勾配分離により回収した。回収した細胞からRNA抽出しcDNAを作製、リアルタイムPCRにより各種抗菌ペプチドあるいはサイトカイン mRNA 発現を相対定量した。血清および糞便中抗体価はELISAにより測定した。

組織学的解析のため、各組織を10%ホルマリン固定し、パラフィン包埋後に薄切した組織をヘマトキシリン・エオジン染色の他、必要に応じて各種免疫細胞を免疫染色により検出観察した。

(2) *H. japonicus* 感染マウスの腸内細菌叢と腸内代謝産物解析

上記(1)と同様に感染させ3か月経過したBALB/cマウスにおいて、約1週間午前と午後の1日2回新鮮糞便を回収し、解析までは冷凍保存した。冷凍した糞便はテクノスルガラボ社に解析を依頼した。腸内細菌叢解析は、糞便中から検出される16S rRNA 遺伝子を次世代型シークエンサーMiSeq (Illumina) により実施され、糞便中の代謝産物である有機酸の検出はpH緩衝化ポストカラム電気伝導度検出法により行われた。

(3) *H. mastomyrinus* の分離と性状解析

H. japonicus Mu-ngs1 分離株に加え、*H. mastomyrinus* が実験用マウスにおいて検出されたため、分離培養を試みた。感染マウス糞便懸濁液を試料として、0.6μmメンブレンフィルターを用いてスキロー変法培地および馬溶血液添加トリプチケースソイ寒天培地で3-4日間好気培養した。分離株の生化学的性状は、主にシスメックス・ピオメリューのAPI campy キットを用いて調べた。形態学的性状については、酢酸ウラニウムによるネガティブ染色により透過型顕微鏡にて観察を行った。また、16S rRNA 遺伝子配列を明らかにするため、ユニバーサルプライマーを用いてPCRにより増幅し、1500bp以上の塩基配列解析を行った。

(4) *H. mastomyrinus* 分離株のマウスにおける病原性解析

分離した *H. mastomyrinus* をスキロー変法培地で培養した後、トリプチケースソイ

液体培地に浮遊させた菌液を 6-7 週齢の SCID あるいは BALB/c 雄マウスに 5-6 回経口投与した。感染の確認は、糞便から DNA 抽出し菌属特異的プライマーを用いて PCR および PCR 産物のシーケンス解析によって行った。感染後 6 か月後の感染マウスを安楽死させ、腸粘膜上皮細胞およびリンパ球は、EDTA あるいはコラゲナーゼ処理して得た分画から Percoll 密度勾配分離により回収した。また、SCID マウスにおいて明らかな病態が見られた組織について 10%中性ホルマリンにて固定し組織学的解析のために保存した。

(5) 腸上皮オルガノイド作製

これまでの報告されてきた腸上皮オルガノイド作製方法を参考にプロトコルを作成し、腸上皮オルガノイド作製を試みた。オルガノイド培養、維持に必要な Wnt3A、R-spondin1 および noggin は、それぞれを産生するように作成された L-WRN 細胞を ATCC より購入し、conditioned 培地として用いた。マウスを安楽死後、腸管を採取し EDTA 処理し腸管組織から crypt を含む上皮細胞分画を採取した。マトリゲルに浮遊させた crypt を含む上皮細胞をプレートに接種し、上層に上記の WRN 細胞培養培地の他サプリメントを添加した培地を乗せ 2 日毎に上層の培地を交換し培養を行った。

4. 研究成果

(1) *H. japonicus* 感染マウスの盲結腸粘膜における病態と免疫防御反応

機能的 B および T 細胞が欠損した SCID マウスでは、感染した 20%の雄マウスで脱肛を認め、雄雌ともに 35%程度で肝臓に巣状壊死が観察された。一見大腸に異常を認めなかった雌においても脾臓や盲結腸粘膜細胞で炎症性サイトカイン発現が亢進していた。次に、免疫正常の BALB/c マウスに感染させたところ、感染後 3 週では、非感染マウスと比較して盲結腸粘膜細胞において Th1、Th2、Th17、および Treg 系サイトカインの発現が亢進していたが、感染後 6 か月経過した持続感染期ではそれらの反応が収束していた。血清中および糞便中の IgA 価は、非感染群と比較して有意に高く、感染 3 週と比べて 24 週で有意に上昇していた。組織学的解析においては、感染後 3 週および 24 週で軽度の炎症像を認めた。更に、粘膜上皮バリア機能について調べたところ、感染後 3 週では非感染群と比較して MUC2 および LYPD8 発現が有意に減少し、感染 24 週後ではその差は認められなかった (図 1)。一方、 β defensin14、Reg3 β および Reg3 γ の発現は、感染後 3 週および 24 週において非感染群と比較して有意に高かった (図 2)。

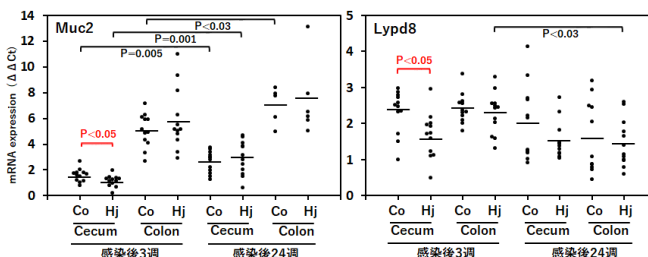


図1. *H. japonicus* Mu-ngs1感染BALB/cマウスの盲結腸粘膜における MUC2およびLYPD8 mRNA発現 (Co:非感染群, Hj:感染群)

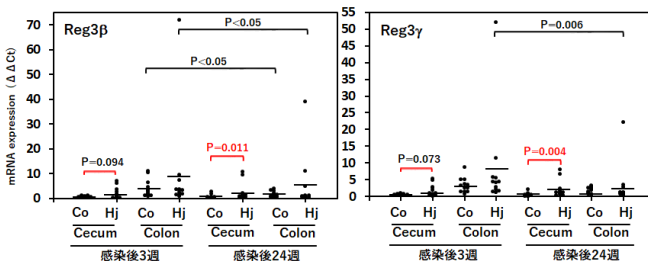


図2. *H. japonicus* Mu-ngs1感染BALB/cマウスの盲結腸粘膜における REG3 β およびREG3 γ mRNA発現 (Co:非感染群, Hj:感染群)

以上の結果から、*H. japonicus* は、免疫不全状態では重度の大腸粘膜炎症を誘導し、腸管から逸脱して肝臓に壊死を起こすことが分かった。また、免疫正常の個体では感染初期において粘液や LYPD8 発現を抑制し自ら定着生息し易い環境を作りだし、その際には宿主の各種免疫反応が誘導され、同時に産生された IL-10 により過剰な免疫反応は抑制されたと考えられた。また、一度定着すると特異的粘膜 IgA 産生によりその増殖は制御され、その間 β defensin14 などの抗菌ペプチド発現が誘導され、宿主腸内細菌叢に変調を誘導する可能性が考えられた。

(2) *H. japonicus* 感染マウスの腸内細菌叢と腸内代謝産物解析

感染群において主に変化が見られた細菌として、*Lactobacillus* 属、*Parabacteroides* 属、*Bacteroides* 属に属する菌が有意に増加し、*Clostridium* 属 XIVa および IV サブクラスターに属する菌が有意に減少していた。糞便中の代謝産物としての有機酸含有量については、非感染群と酪酸などでは差は認められなかったが、感染群においてコハク酸が有意に高く検出された。

Clostridium 属 XIVa および IV に属する菌には、調節性 T 細胞を増加させることが報告されている。一方で、*Bacteroides* 属に属する菌にも同様の効果を示すことが報告されている。各菌の生体への影響について考察することは困難ではあるが、*H.*

japonicus 感染により、腸内細菌叢に変調を誘導し、その結果、代謝産物としてコハク酸の蓄積が起き、大腸粘膜において炎症が誘導されたと考えられた。

(3) *H. mastomyrinus* の分離と性状解析

実験用マウスから 3 株分離することができ、増殖したコロニーからグラム染色によりグラム陰性のらせん状桿菌が多数観察できた。また、透過型電子顕微鏡により、両極に 1 本ずつの有鞘の鞭毛を持ち periplasmic fiber の無いらせん状の桿菌が観察され、菌体の長さは 1.5-3.5 μm 、太さ 2.3-3.1 μm であった(図3)。生化学的性状では、カタラーゼ、オキシダーゼ、ウレアーゼ等の産生を認め、アルカリフォスファターゼ産生等一部の性状は type strain MIT97-5574 とは異なっていた。

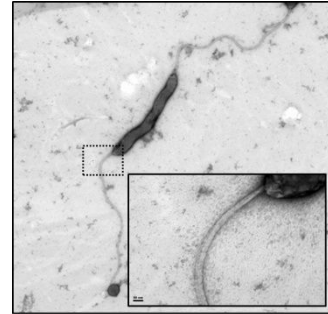


図3. *H. mastomyrinus* 分離菌 (透過電子顕微鏡像)

(4) *H. mastomyrinus* 分離株のマウスにおける病原性解析

実験用マウスから分離した *H. mastomyrinus* 分離菌について、機能的 B および T 細胞を欠く SCID マウスにおける病原性について調べた。その結果、感染後 24 週において非感染群と比較して感染マウスでは体重および盲結腸の長さが有意に減少していた。これらの SCID マウスの肝臓では菌遺伝子が検出され、腸管腔より逸脱して血流にのって肝臓に到達したと考えられた。また、盲結腸内容物が乏しく管壁が重度に肥厚した重度の症状を示す個体も見られた(図4)。

本菌は、*H. japonicus* Mu-ngs1 株と比較してマウスに強い病原性を示す可能性が考えられた。現在、組織学的および免疫学的解析を進めている。また、免疫正常 BALB/c マウスにおける病原性についても解析を進めているところである。

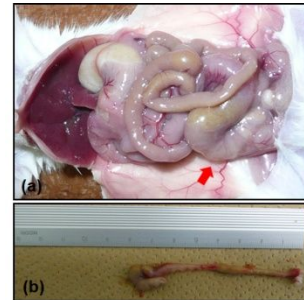


図4. *H. mastomyrinus* 感染 SCID マウス (a) 管壁が肥厚し内容物の乏しい盲腸 (赤色矢印) (b) 管壁が肥厚し短縮した結腸

(5) 腸上皮オルガノイド作製

研究分担者 増山律子の協力を得て、GCaMP 導入マウスの消化管を用いて消化管上皮オルガノイドの作製を試みた。Crypt を採取後、Wnt3A、R-spondin、noggin の 3 因子が含まれる L-WRN 細胞培養培地を用いて、定期的に交換することにより 3 次的に増殖するオルガノイドを作製することに成功した(図5)。

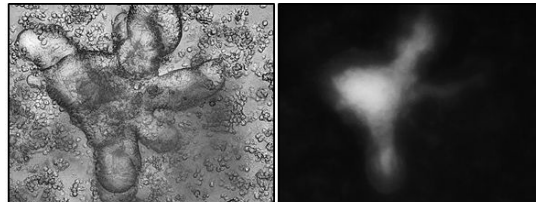


図5. GCaMP 導入マウス腸上皮から作製したオルガノイドと蛍光観察像(研究分担者 増山律子)

今後、2 次元培養をすることで、粘膜バリア反応評価系として使用することを考えている。また、GCaMP 導入マウスを使用することで、他の死細胞と区別が可能となり、今後その他の細胞機能研究のツールとなり得ることが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 山中仁木	4. 巻 67
2. 論文標題 実験動物におけるピロリ菌以外のヘリコバクター属菌	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 信州医学雑誌	6. 最初と最後の頁 81-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uekawa A#, Yamanaka H#, Lieben L, Kimira Y, Uehara M, Yamamoto Y, Kato S, Ito K, Carmeliet G, Masuyama R# (#equally contribution)	4. 巻 32
2. 論文標題 Phosphate-dependent luminal ATP metabolism regulates transcellular calcium transport in intestinal epithelial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1903-1915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201700631R.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamanaka H, Kadomatsu R, Takagi T, Ohsawa M, Yamamoto N, Kubo N, Takemoto T, Ohsawa K	4. 巻 20
2. 論文標題 Antimicrobial resistance profiles of vancomycin-resistant Enterococcus species isolated from laboratory mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 e13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4142/jvs.2019.20.e13.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shimada S, Yoshizawa T, Takahashi Y, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Nomura Y, Yamanaka H, Kosho T, Matsumoto K.	4. 巻 69
2. 論文標題 Backcrossing to an appropriate genetic background improves the birth rate of carbohydrate sulfotransferase 14 gene-deleted mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 407-413
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.19-0150.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 山中仁木	4. 巻 69
2. 論文標題 実験動物マウスおよびラットにおける薬剤耐性菌	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験動物ニュース	6. 最初と最後の頁 130-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山中仁木、増山律子、大沢一貴
2. 発表標題 Helicobacter japonicus infection contributes the development of potent mucosal barrier systems
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中仁木
2. 発表標題 ピロリ菌以外のヘリコバクター属菌－これまでの知見－
3. 学会等名 第8回実験動物科学シンポジウム「動物モデルを用いた感染症研究」(主催 日本実験動物学会)(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中仁木
2. 発表標題 ヘリコバクター属菌感染による生体への影響とは
3. 学会等名 日本実験動物医学会シンポジウム(第65回日本実験動物学会総会)(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中 仁木, 増山 律子
2. 発表標題 細胞外液リン量に応答するATP依存性カルシウム吸収機構の検討
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中 仁木, 増山 律子
2. 発表標題 ビタミンD応答性ATP代謝による腸上皮粘膜免疫制御
3. 学会等名 第4回Neo Vitamin D Workshop学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉沢隆浩、嶋田新、高橋有希、水本秀二、山田修平、山中仁木、古庄知己、松本清司
2. 発表標題 筋拘縮型エーラスダンロス症候群の疾患モデル動物としてのChst14 遺伝子欠損マウスの解析
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 増山律子、山中仁木	4. 発行年 2020年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 12-17 (担当)
3. 書名 糖尿病・内分泌代謝科「ビタミンDの内分生物学」(担当:「ビタミンDの組織特異的作用」)	

〔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
研究 分 担 者	増山 律子 (Masuyama Ritsuko) (60297596)	立命館大学・食マネジメント学部・教授 (34315)	
研究 分 担 者	大沢 一貴 (Ohsawa Kazutaka) (90244756)	長崎大学・先導生命科学研究支援センター・教授 (17301)	

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			
ベルギー	KU Leuven			