

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16639

研究課題名（和文）宿主細胞に対して炎症抑制するプロバイオティクス候補大腸菌の炎症機序解明と応用

研究課題名（英文）Elucidation and Application of Inflammatory Mechanisms of Candidate Probiotic Escherichia coli that Suppresses Inflammation against Host Cells

研究代表者

谷本 佳彦 (Tanimoto, Yoshihiko)

大阪市立大学・大学院生活科学研究科・客員研究員

研究者番号：10780984

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：宿主に対して炎症反応を抑制する大腸菌を発見し、プロバイオティクス大腸菌としての応用を見据えて、その作用機序解明を目的として取り組んだ。マウスモデルを使用して、腸炎が改善される傾向を見出した。また、当該菌株の遺伝子ノックアウトを実施し、炎症抑制に関する遺伝子を複数同定することができた。本研究は、大腸菌がヒトに対して有益な作用を与える機序を発見した画期的な研究である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸菌研究は主にその病原性に注目され、病原機構に対する研究は大きく進んでいる。我々は、大腸菌がヒトに対して有益な作用をもたらすことを過去に発見し、その作用機序に着目してきた。本研究期間内に、マウスモデルを用いた腸炎改善、および菌株の遺伝子ノックアウトによって炎症抑制に関する遺伝子を同定した。これらのことは、当該大腸菌株がプロバイオティクスとして応用できる可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：We discovered an E. coli strain that suppresses inflammatory responses to the host, and worked to elucidate its mechanism of action with a view to applying it as a probiotic E. coli. Using a mouse model, we found a tendency for improvement of intestinal inflammation. In addition, we performed gene knockout of the strain and were able to identify several genes related to inflammation suppression. This is a new approach to research that discovered the mechanism by which E. coli exerts beneficial effects on humans.

研究分野：細菌学

キーワード：大腸菌 プロバイオティクス 炎症応答抑制 サイトカイン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

分散接着性大腸菌(DAEC)は、下痢原性大腸菌の候補として長年論議されながら未だ結論が出ておらず、下痢原性の有る菌と無い菌が混在しているヘテロな集団である可能性が高い。申請者らは、DAECの患者由来株と健康者由来株を比較し、下痢原性を探索していく中で、上皮細胞に対して炎症性サイトカインIL-8およびIL-6を抑制するユニークな表現型を持つ健康者由来の大腸菌SK1144株を発見した。本研究では、SK1144株の宿主に対する炎症応答抑制の詳細なメカニズム解明を目的とした。抑制に関わるSK1144株の責任遺伝子の同定、その宿主細胞の標的分子の同定、マウスモデルを用いた *in vivo* での腸管免疫に与える影響等を評価し、SK1144株の炎症抑制のメカニズムを明らかにするとともに、下痢予防や腸疾患に対する治療方法としての可能性を見出す。腸管内での炎症応答を抑制し得るプロバイオティクス大腸菌としての応用を見据えた基礎的知見を得る極めて画期的なアプローチである。

### 2. 研究の目的

本研究では、宿主細胞の炎症応答を抑制する健康者由来大腸菌の詳細なメカニズム解明を目的とした。すなわち、SK1144株のIL-8抑制に関わっている遺伝子を同定し、抑制機序を分子レベルで明らかにすることを目指した。さらに、マウスモデルを用いた *in vivo* での抗炎症効果の検討を行った。以上のことは、大腸菌の炎症抑制という独自の視点であり、ヒト由来のDAECがヒトの腸内で共生し、下痢の予防や炎症性腸疾患の治療のためのプロバイオティクスとして使用できる可能性を見据えた極めて新しいアプローチである。さらに、SK1144株以外にも炎症抑制候補大腸菌株を保有しており、解明できた機序が当該菌株に特有の現象であるのか、もしくは広く保有する可能性があるのかを検証することができる。また、SK1144株や他の炎症抑制候補大腸菌株はヒト健康者から分離しており、ヒトに対する安全性も高いことが推察されることから、将来へのヒトへの応用を考えた際にも有用であると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### 1) 宿主細胞のIL-8抑制を起こすSK1144株の遺伝子は何か

Tn5トランスポゾンを用いたランダム遺伝子変異法を用いて、SK1144株の遺伝子変異株を作製し、IL-8を抑制しないSK1144変異株を探索した。変異株は作製のスループットが低く取れた変異体の数が少なかったため、培養条件や形質転換の際の電圧などの条件を検討して効率を高め、より多くの変異体作製を目指した。

#### 2) 宿主細胞内のIL-8抑制の分子は何か

上記解析によって同定した遺伝子に対して、トランスフェクションによりその遺伝子を培養細胞内で直接発現させ、炎症抑制機能を検証した。既にVI型分泌装置のエフェクタータンパクであるhcp遺伝子がIL-8抑制に関わっていることが分かっているため、この遺伝子から取り組んだ。またヒト腸管内を想定し、上皮系細胞の他にモノサイト・マクロファージ系の培養細胞を用いて、SK1144株が炎症性サイトカイン抑制を起こすかどうか検討した。

#### 3) 他の炎症抑制菌株にも共通する遺伝子は何か

これまで申請者はSK1144株以外にもIL-8抑制能を持つDAEC株を健康者から複数見つけている。上記により遺伝子を同定できた際は、他の菌株にも共通のものを探索し、炎症応答を抑制する菌株の特徴について検討した。このことは、下痢原性を持たないDAEC株を見分ける方法にもなり、ひるがえって下痢原性DAECを同定する要素になると考えた。

#### 4) *in vivo* においてもSK1144株が炎症抑制を示すか

*in vitro* 実験系において、腸内で炎症抑制効果を発揮することが期待できるので、炎症性腸疾患モデルでの治療効果について検討した。デキストラン硫酸ナトリウムをマウスに経口投与し、炎症性腸疾患を誘発させた後に、SK1144株を経口投与し、大腸の長さ(炎症の指標)や血中・糞便中のサイトカインを測定することで評価した。

### 4. 研究成果

#### 1) 炎症抑制に関する遺伝子同定

トランスポゾンを用いたランダム遺伝子変異株の作製を行った。変異株の作製方法の改良を試み、効率よく作製することができたため、これまで約1,000株しか取得できていなかったが、合計で約9,000株を作製することができた。その変異株のうち約3,000株について培養細胞を用いたサイトカイン誘導のスクリーニングを行い、サイトカイン抑制機能を喪失した株を約20株取得できた。変異した遺伝子特定には、これまではレスキュークローニングを用いていたが、時間や手間が大きくかかることから、NGSを用いた系に切り替え、効率的にトランスポゾン挿入部位を特定することができた。また、特定した中から数遺伝子をピックアップし、トランスポゾン挿入変異でなく、遺伝子を完全に欠損させる株を別途作製し、同様にサイトカイン誘導

抑制が喪失することを確認した。さらにこの遺伝子欠損株に対して、遺伝子補完をすることにより、野生株と同様に機能がレスキューされることを確認した。このことは、同定した遺伝子が炎症抑制に関わっていることを強く示唆するものである。

## 2) 宿主内の IL-8 抑制分子の探索

以前、炎症応答抑制に関わっていることを報告した VI 型分泌装置のエフェクタータンパクである hep 遺伝子について、培養細胞に遺伝子を発現させて評価した。遺伝子を培養細胞内に導入することは成功したものの、単に本遺伝子を培養細胞に遺伝子導入しただけではサイトカイン抑制を起こすことはできなかった。炎症抑制は、単独のタンパク質が働くのではなく、複数のメカニズムによって引き起こされることが示唆された。

一方で、宿主側の遺伝子転写についても評価した。抑制グループの代表株を様々な条件で感染させた培養細胞から RNA 抽出し RNASeq を行った。結果の詳細は現在解析中であるが、宿主機能の抑制メカニズムの解明の可能性を見出した。

また、上皮細胞以外の細胞として、ヒトモノサイト由来である THP-1 細胞を用いた検討を行った。しかしながら、細胞への炎症惹起がうまくいかず、この検討については課題が残った。

## 3) 他の炎症抑制菌株にも共通する遺伝子

SK1144 株と他の DAEC 株について比較ゲノム解析を行い、その情報からサイトカイン誘導抑制に関わる遺伝子を探索した。ヒト健康者由来の分散接着性大腸菌 (DAEC) 合計 17 株について、その表現型と遺伝子型を比較した。まず、表現型確認として、ヒト培養細胞に対する炎症性サイトカインの抑制能力について評価し、炎症抑制能力を持つ株 (抑制グループ) と持たない株 (非抑制グループ) に分類した。さらに 17 株の全ゲノムデータから、両グループに共通しない遺伝子を探索したところ、抑制グループのみに共通して持つ遺伝子と非抑制グループのみに共通して持つ遺伝子を同定した。これらの遺伝子と、データベースに登録されている他の大腸菌のゲノム情報、および SK1144 株のトランスポゾン変異によって炎症抑制能を持つ遺伝子を探索した結果、と併せてその特徴について精査を行っている。これらの解析によって、炎症抑制機能が SK1144 株に特有の特徴であるのか、また他の大腸菌にも広く存在するのかが明らかになることを期待している。

## 4) マウスモデルを用いた SK1144 株の腸炎抑制について

マウス腸炎モデルを用いた SK1144 株の腸炎改善効果について予備検討を行った。その結果、SK1144 株接種グループにおいて、大腸の長さが改善し、糞便中のサイトカインが低い傾向にあった。これらの結果は SK1144 株がマウスの腸炎を改善することを示唆している。しかしながら、デキストラン硫酸ナトリウムでの腸炎誘導は試薬のロット差等に左右されることが多く、結果が安定しなかったため、改善の余地が残った。また、別の方法として、細菌を用いた腸炎誘導を試みたが、同じく安定的に腸炎を誘導することが難しく、in vivo 実験については今後の検討課題としたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanimoto Yoshihiko, Inoue Miyoko, Komatsu Kana, Odani Atsuyuki, Wada Takayuki, Kage-Nakadai Eriko, Nishikawa Yoshikazu	4. 巻 150
2. 論文標題 Seroepidemiological survey on pigs and cattle for novel K88 (F4)-like colonisation factor detected in human enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Epidemiology and Infection	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/s0950268821002697	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 Tanimoto Yoshihiko, Mori Ai, Miyamoto Sonoko, Ito Erika, Arikawa Kentaro, Iwamoto Tomotada	4. 巻 -
2. 論文標題 Comparison of RT-PCR, RT-LAMP, and antigen quantification assays for the detection of SARS-CoV-2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.jjid.2021.476	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 Katayama R., Matsumoto Y., Higashi Y., Sun S., Sasao H., Tanimoto Y., Nishikawa Y., Kage Nakadai E.	4. 巻 131
2. 論文標題 <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>natto</i> increases the resistance of <i>Caenorhabditis elegans</i> to gram positive bacteria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 3032-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jam.15156	査読の有無 有
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 Kuwabara Soichiro, Tanimoto Yoshihiko, Okutani Mie, Jie Meng, Haseda Yasunari, Kinugasa-Katayama Yumi, Aoshi Taiki	4. 巻 16
2. 論文標題 Microfluidics sorting enables the isolation of an intact cellular pair complex of CD8+ T cells and antigen-presenting cells in a cognate antigen recognition-dependent manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0252666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0252666	査読の有無 有
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 Ito Ai, Zhao Quichi, Tanaka Yoichiro, Yasui Masumi, Katayama Rina, Sun Simo, Tanimoto Yoshihiko, Nishikawa Yoshikazu, Kage-Nakadai Eriko	4. 巻 22
2. 論文標題 Metolazone upregulates mitochondrial chaperones and extends lifespan in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biogerontology	6. 最初と最後の頁 119 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10522-020-09907-6	査読の有無 有
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16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 鈴木優希, 谷本佳彦, 陳彦霖, 中村寛海, 大屋憲司, 西川禎一, 和田崇之
2. 発表標題 Detection of F4 Homologous Adhesin Factor in <i>Escherichia coli</i> Carrying astA
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎康祐, 谷本佳彦, 陳彦霖, 西川禎一, 中台(鹿毛)枝里子, 和田崇之
2. 発表標題 Whole-genome analysis of diffusely adherent <i>Escherichia coli</i> without typical adhesins
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鬼丸祐二, 谷本佳彦, 平林達也, 今中壮一
2. 発表標題 バクテリオファージQ を用いたウイルスの浄水処理特性の推定
3. 学会等名 令和3年度全国会議 (水道研究発表会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷本佳彦, 森愛, 宮本園子, 伊藤絵里香, 有川健太郎, 岩本朋志
2. 発表標題 SARS-CoV-2 検出検査のRT-PCR 法と抗原定量法・LAMP 法の比較
3. 学会等名 令和3年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部 ウイルス部会研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎康祐, 谷本佳彦, 陳彦霖, 西川禎一, 中台(鹿毛)枝里子, 和田崇之
2. 発表標題 定型接着因子不明な分散接着性大腸菌の全ゲノム解析
3. 学会等名 第42回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木優希, 谷本佳彦, 陳彦霖, 西川禎一, 和田崇之
2. 発表標題 astA保有大腸菌におけるF4相同性接着因子の検出
3. 学会等名 第42回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片山莉那, 松本優美, 東幸奈, 笹尾穂乃佳, 谷本佳彦, 孫思墨, 西川禎一, 中台(鹿毛)枝里子.
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> を代替モデル宿主とした納豆菌給餌による黄色ブドウ球菌抵抗性付与の分子メカニズム.
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 片山莉那, 松本優美, 東幸奈, 笹尾穂乃佳, 谷本佳彦, 孫思墨, 西川禎一, 中台(鹿毛)枝里子.
2. 発表標題 Molecular mechanisms underlying resistance to Gram-positive bacteria conferred by <i>Bacillus subtilis</i> var. natto in the <i>Caenorhabditis elegans</i> alternative model host.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小谷篤幸, 谷本佳彦, 高浦彩那, 小村智美, 中台(鹿毛)枝里子, 西川禎一.
2. 発表標題 Functional analysis of Hcp gene that constitutes type VI secretion systems and comprehensive screening of inflammatory suppression genes of diffusely adherent <i>Escherichia coli</i> isolated from healthy carrier.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片山莉那, 松本優美, 東幸奈, 笹尾穂乃佳, 谷本佳彦, 孫思墨, 西川禎一, 中台(鹿毛)枝里子.
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> を代替モデル宿主とした納豆菌給餌によるグラム陽性菌抵抗性付与の分子メカニズムの解明.
3. 学会等名 第59回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小谷篤幸, 谷本佳彦, 高浦彩那, 小村智美, 和田崇之, 中台(鹿毛)枝里子, 西川禎一.
2. 発表標題 健康者由来分散接着性大腸菌株のVI型分泌装置を構成するHcp遺伝子の機能解析と炎症抑制遺伝子の網羅的探索
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新家早絵, 高浦彩那, 谷本佳彦, 小谷篤幸, 高山夏行, 神谷知恵, 大谷直子, 中台(鹿毛)枝里子, 西川禎一.
2. 発表標題 DSS腸炎誘導マウスにおける健康者由来DAEC株SK1144の腸炎抑制効果.
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takaura A, Tanimoto Y, Odani A, Shinya S, Kamiya T, Ohtani N, Yamaguchi Y, Komura T, Kage-Nakadai E, Nishikawa Y
2. 発表標題 Genes implicated in the suppression of IL-8 secretion by diffusely adherent Escherichia coli
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 高浦彩那, 谷本佳彦, 小谷篤幸, 新家早絵, 高山夏行, 山口良弘, 小村智美, 中台(鹿毛)枝里子, 西川禎一.
2. 発表標題 トランスポゾン挿入により上皮細胞に対する炎症性サイトカイン分泌抑制機能を喪失した分散接着性大腸菌
3. 学会等名 第72回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Odani A, Takaura A, Shinya S, Takayama N, Tanimoto Y, Kage-Nakadai E, Nishikawa Y.
2. 発表標題 Effect of diffusely adherent Escherichia coli (DAEC) strain SK1144 isolated from healthy carrier on DSS-induced colitis of mice.
3. 学会等名 International Workshop on Quantum Sensing and Biophotonics 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Takaura A, Takeuchi N, Tanimoto Y, Kage-Nakadai E, Nishikawa Y.
2. 発表標題 A search for genes suppressing inflammatory response of epithelial cells in diffusely adherent Escherichia coli: trial by transposon insertion mutants.
3. 学会等名 International Workshop on Quantum Sensing and Biophotonics 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------