

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18177

研究課題名（和文）膣細菌叢による膣内恒常性維持機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of Vaginal Homeostasis by Vaginal Bacterial Flora

研究代表者

高田 和秀（TAKADA, Kazuhide）

日本大学・医学部・助教

研究者番号：60848711

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：女性生殖器における細菌叢は恒常性維持に重要な役割を担っている。膣由来株を中心にLactobacillus同士の培養上清をお互いに添加したところ、細菌増殖にほぼ有意な変化は認めなかった。このことから膣細菌叢がLactobacillus主体になる機序は、細菌間の競合よりも宿主の選択圧が働いている可能性がある。またGardnerella vaginalisの培養上清は、子宮頸部上皮細胞から抗菌ペプチドであるElafinの分泌を有意に促進した。子宮内細菌叢では、L. crispatusの生菌及び培養上清がトロホプラストの浸潤を有意に促進したため、着床に影響を及ぼす可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膣内細菌叢の乱れは、細菌性膣症など様々な原因となる。治療法の一つとしてプロバイオティクスがあるが、どの菌種がどのような機序で作用しているか、また組織に定着しているかは不明な点が多い。そのため、理想的とされるLactobacillus主体の細菌叢はどのようなメカニズムで維持されるのか、また病原菌はどのような影響を粘膜免疫に及ぼすかの一端を明らかにした本研究は、この分野の理解促進につながる。また子宮内細菌叢は健康人の菌種構成すらコンセンサスに至っておらず、今回の研究成果は子宮内細菌叢の役割の理解および、将来の適切な細菌叢介入手段の検討に寄与する。

研究成果の概要（英文）：Bacterial flora in the female reproductive organs plays an important role in homeostasis. When culture supernatants of Lactobacillus strains, mainly vaginally derived, were added to each other, almost no significant changes in bacterial growth were observed. This suggests that the mechanism by which the vaginal flora becomes Lactobacillus-dominated may be due to host selection pressure rather than competition among the bacteria. Culture supernatants of Gardnerella vaginalis also significantly enhanced the secretion of the antimicrobial peptide Elafin from cervical epithelial cells. In the endometrial flora, viable L. crispatus and culture supernatants significantly promoted trophoblast invasion, which may affect implantation.

研究分野：生殖免疫

キーワード：膣細菌叢 子宮内細菌叢 Lactobacillus

1. 研究開始当初の背景

細菌叢の多様性が健康維持に重要とされる消化管とは異なり、健常女性の腔細菌叢は1、2種類の乳酸桿菌(デーデルライン桿菌)で、その大部分を占められることが多く、多様性が低い方が理想的とされる。腔内の乳酸桿菌が減少すると、細菌性膣症(BV)などディスバイオーシスの状態に移行しやすく、悪臭帯下により患者のQOLを下げるのみならず、HIVやクラミジア等の性感染症や不妊、早産などのリスクが高まる。BVの標準治療としては抗菌薬が投与されるが、薬剤耐性誘導のリスクを伴うため、乳酸桿菌製剤の経膣または経口投与が試みられている。しかし、プロバイオティクス製剤は定着率の低さが問題であり、効果が認められない場合も多い。またそもそも常在菌のどのような特性が腔内恒常性維持に役立っているかも未解明な点が多い。そのため、より効果的な乳酸桿菌プロバイオティクス応用を目指すためには、女性生殖器における細菌叢はどのようなメカニズムで女性生殖器の健康維持に影響しているのか、またなぜ少数の乳酸桿菌種が腔内細菌叢の大半を占められるのかを解明することが求められている。

2. 研究の目的

一つ目の目的として「乳酸桿菌同士がお互いの増殖にいかに関与しているのか」を明らかにする。これまでに、BV関連菌である *Gardnerella vaginalis* や *Prevotella bivia*、他に *Chlamydia trachomatis* 等の性感染症を引き起こす病原体に対して、乳酸桿菌 *Lactobacillus* 属がどのような抗菌作用を持つかは重要な問題であるため、研究が進んでいる。しかし、*Lactobacillus* 属同士が腔内においてどのように影響しあっているかについて、一見病原性と関係ないため注目されてこなかった。しかし近年、腔内細菌叢の構成が明らかになるにつれ、単一種の *Lactobacillus* が細菌叢の大部分を占めるといふ他臓器とは異なった多様性の低さが、女性の健康維持に重要であることが分かってきた。またいかに機能的に優れた菌株を選定しプロバイオティクスとして用いても、腔内に定着しなければ効力を発揮しない。それゆえ乳酸桿菌同士の競合性の解明は、ヒトにおける腔細菌叢の構成に対する理解が深まるだけでなく、腔内に既に存在する *Lactobacillus* 属と競合せずに定着しやすいプロバイオティクス株を選択する新たな基準の確立を考える上で、必要不可欠である。

二つ目の目的として、「腔細菌叢と腔粘膜バリア機能の相互作用」や「子宮内常在菌の生殖における役割」を明らかにする。現在、腔乳酸桿菌のプロバイオティクス評価として用いられている基準は、その多くが消化管の基準を応用したものである。消化管も腔も同じ粘膜上皮であるが、前者の組織形の大半は単層円柱上皮であるのに対し、腔上皮は重層扁平上皮組織である。それゆえ消化管において有効な効果が、腔においても有効であるとは限らない。また近年では生殖医療の領域において子宮内細菌叢に対する注目が高まっているが、健常女性の子宮内細菌叢の構成もまだコンセンサスには至っておらず、その役割も不明であるため、それらの解明は急務である。

3. 研究の方法

腔由来の株を中心に各種 *Lactobacillus* 同士や *G. vaginalis*、GBS や *Escherichia coli* の培養上清をそれぞれ添加し、増殖に対する影響を検討した。

また *G. vaginalis* の培養上清をヒト不死化子宮頸部上皮細胞株に添加し、抗菌ペプチドの産生に与える影響を評価した。

子宮内細菌叢に関しては、各種 *Lactobacillus* や *G. vaginalis* の他に、常在菌として報告のある *Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter cloacae* の培養上清をトロホプラスト細胞株に添加し、**maternal-fetal interface** における免疫寛容機序に対する影響を検討した。

さらに女性生殖器と各臓器との相互作用について文献検索を行い、最新の知見を整理した。

4. 研究成果

(1) 腔内細菌叢常在菌と病原菌の培養上清による相互作用の検討(文献1)

まず各種 *Lactobacillus* 同士の培養上清をお互いに添加し、24時間後の吸光度を計測したところ、腔内の *Lactobacillus* 同士はほぼ有意な影響は見られなかった(表1)。次に *G. vaginalis*、GBS や *E. coli* に各種に各種 *Lactobacillus* の培養上清を添加したところ、有意に増殖を抑制した。一方その逆に各種 *Lactobacillus* に *G. vaginalis*、GBS や *E. coli* の培養上清を添加した場合は、有意な増殖抑制は認めなかった。

このことから腔細菌叢において単一種の *Lactobacillus* が有意になるメカニズムとして、*Lactobacillus* 同士の競合よりも、宿主側の選択圧が重要である可能性が考えられる。一方で、近年の研究から単一種の *Lactobacillus* 主体の腔細菌叢の中にも複数の株が共存していることが示唆されている。具体的には消化管同様に粘液中の抗体や抗菌ペプチドなどの関与が腔細菌叢の構成に重要であると予想されるが、具体的な作用機序についてはさらなる研究が必要である。

	supernatant							
	<i>L. crispatus</i>	<i>L. crispatus</i> [#]	<i>L. jensenii</i> [#]	<i>L. vaginalis</i> [#]	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. paragasseri</i> [#]	<i>L. gasseri</i> [#]	<i>L. rhamnosus</i> [#]
	(GJ-3C, Vagina)	(JCM1185T, Eye)	(JCM15953T, Vagina)	(JCM9505T, Vagina)	(JCM2124, Vagina)	(JCM5343T, Vagina)	(JCM1131T, Intestine)	(JCM1136T, Unknown)
<i>L. crispatus</i>	-	100.91 ± 6.17	101.73 ± 5.50	115.08 ± 1.93*	97.35 ± 6.54	98.33 ± 6.18	102.86 ± 5.19	101.46 ± 5.35
(GJ-3C, Vagina)								
<i>L. crispatus</i> [#]	98.96 ± 4.08	-	88.15 ± 6.67*	111.75 ± 0.66*	94.86 ± 4.19	105.52 ± 4.80*	88.69 ± 4.33*	90.95 ± 3.54
(JCM1185T, Eye)								
<i>L. jensenii</i> [#]	97.15 ± 4.17	99.72 ± 7.49	-	104.99 ± 3.13	94.44 ± 6.26	96.45 ± 4.34	95.94 ± 1.47	102.37 ± 2.90
(JCM15953T, Vagina)								
<i>L. vaginalis</i> [#]	106.9 ± 1.96	106.7 ± 4.50	95.69 ± 2.71	-	99.17 ± 8.48	109.42 ± 3.41	101.44 ± 2.15	98.84 ± 1.78
(JCM9505T, Vagina)								
<i>L. acidophilus</i>	104.52 ± 4.17*	102.24 ± 7.49	97.96 ± 3.19	107.77 ± 3.14*	-	105.82 ± 6.26*	101.73 ± 1.47	104.76 ± 3.41*
(JCM2124, Vagina)								
<i>L. paragasseri</i> [#]	89.65 ± 9.29	90.99 ± 8.5	78.70 ± 16.09	103.38 ± 4.01	86.17 ± 5.5	-	80.96 ± 13.54	89.99 ± 9.9
(JCM5343T, Vagina)								
<i>L. gasseri</i> [#]	103.54 ± 4.71	102.59 ± 3.54	76.98 ± 1.88*	110.37 ± 3.22*	97.77 ± 5.62	100.68 ± 4.28	-	111.91 ± 0.80*
(JCM1131T, Intestine)								
<i>L. rhamnosus</i> [#]	105.94 ± 6.53	113.43 ± 4.98	91.68 ± 3.19	99.74 ± 2.92	102.14 ± 7.64	113.24 ± 6.19*	105.11 ± 1.54	-
(JCM1136T, Unknown)								

*Type strain * p < 0.05.

表 1. *Lactobacillus* 同士の相互作用の結果 (文献 1 より)

(2) *G. vaginalis* の子宮頸部における抗菌ペプチド産生に与える影響の検討 (文献 2)

G. vaginalis の培養上清をヒト不死化子宮頸部上皮細胞 (**EndoCx**) と子宮腔部重層扁平上皮細胞株 (**EctoCx**) に添加したところ、両者において抗菌ペプチドの一種である **Elafin** の産生が促進した。また *G. vaginalis* の培養上清は **EndoCx** からの **IL-8** の産生を促進した。

Elafin は抗菌作用の他に、好中球から放出される好中球エラスターゼ特異的な阻害作用を持つといわれている。**IL-8** は好中球の遊走を促進し抗菌的に作用することが期待されるが、同時に発生する好中球エラスターゼは頸管熟化の過剰亢進につながる可能性があり、好中球エラスターゼを阻害することで、その作用を軽減している可能性がある (図 1)。

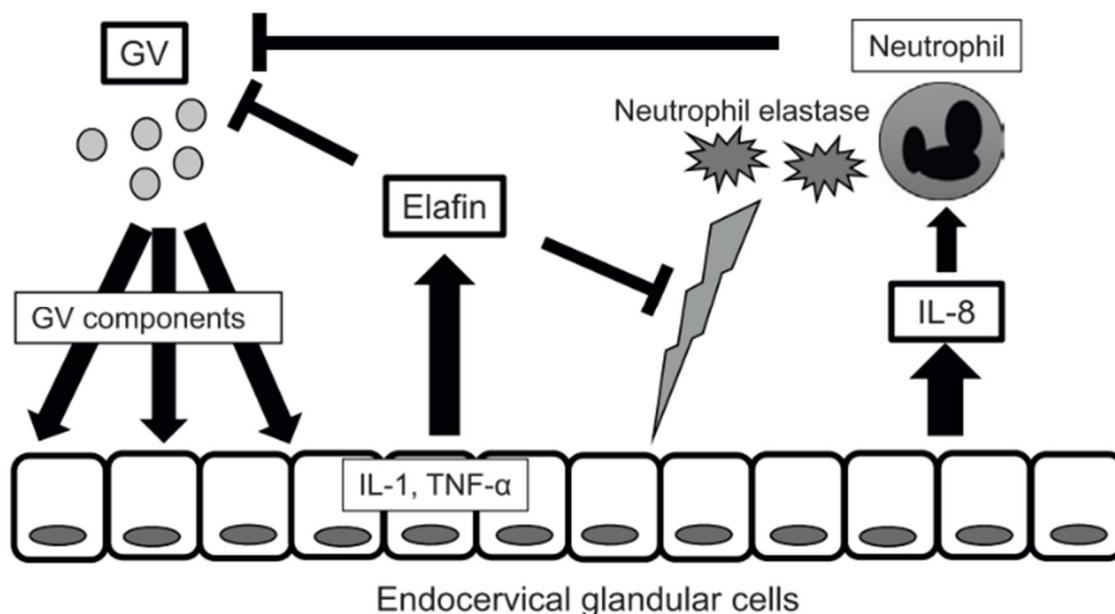


図 1. *G. vaginalis* と子宮頸部上皮細胞の作用機序予想図 (文献 2 より)

(3) 子宮内細菌叢のトロホプラスト浸潤に及ぼす影響の検討 (文献 3)

L. crispatus の生菌及び培養上清を **HTR-8/SVneo** トロホプラスト細胞株に添加し、浸潤能に及ぼす影響を検討した。その結果、*L. crispatus* の生菌及び培養上清はどちらも浸潤能を有意に促進した。一方で遊走能に関しては影響を与えなかった。また浸潤のメカニズムとして重要とされる **MMP-2** の活性が有意に促進した。

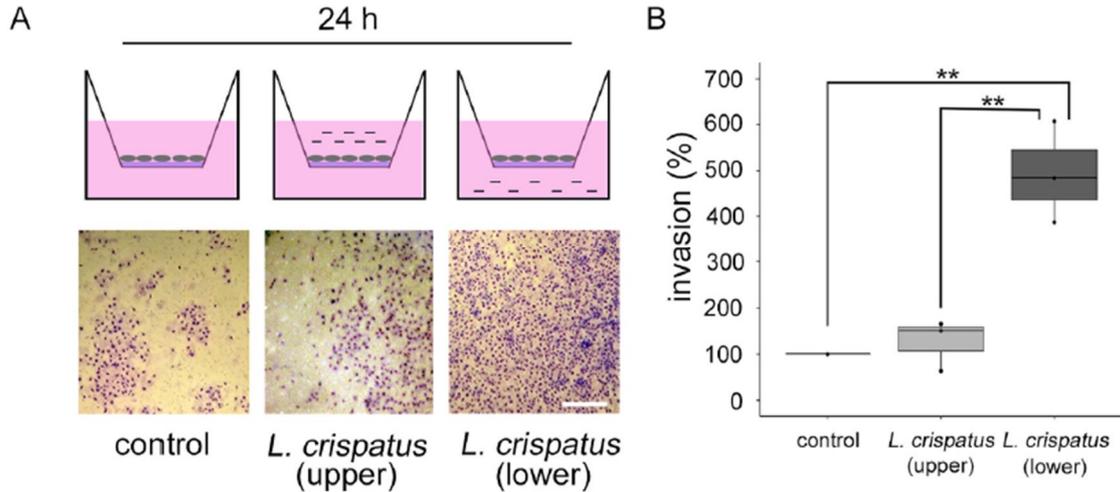


図 2. *L. crispatus* のトロホプラスト浸潤に及ぼす影響 (文献 3 より)

さらに、膈内では細菌性膈症に移行しやすいとされる *L. iners* の培養上清がトロホプラスト浸潤に与える影響を検討したところ、陽性コントロールとして用いた *L. crispatus* (文献 3 で用いたものと別の膈由来株) が有意に促進した一方で、*L. iners* の培養上清は浸潤能を阻害しなかったが、促進も認めなかった (投稿中)。さらに母体の免疫寛容に重要なタンパク質発現を検討したところ、*L. iners* の培養上清は免疫応答抑制に関するタンパク質発現を減少させたことから、着床率の低下に関与している可能性がある (投稿準備中)。

(4) 女性生殖器と各臓器との相互作用 (文献 4)

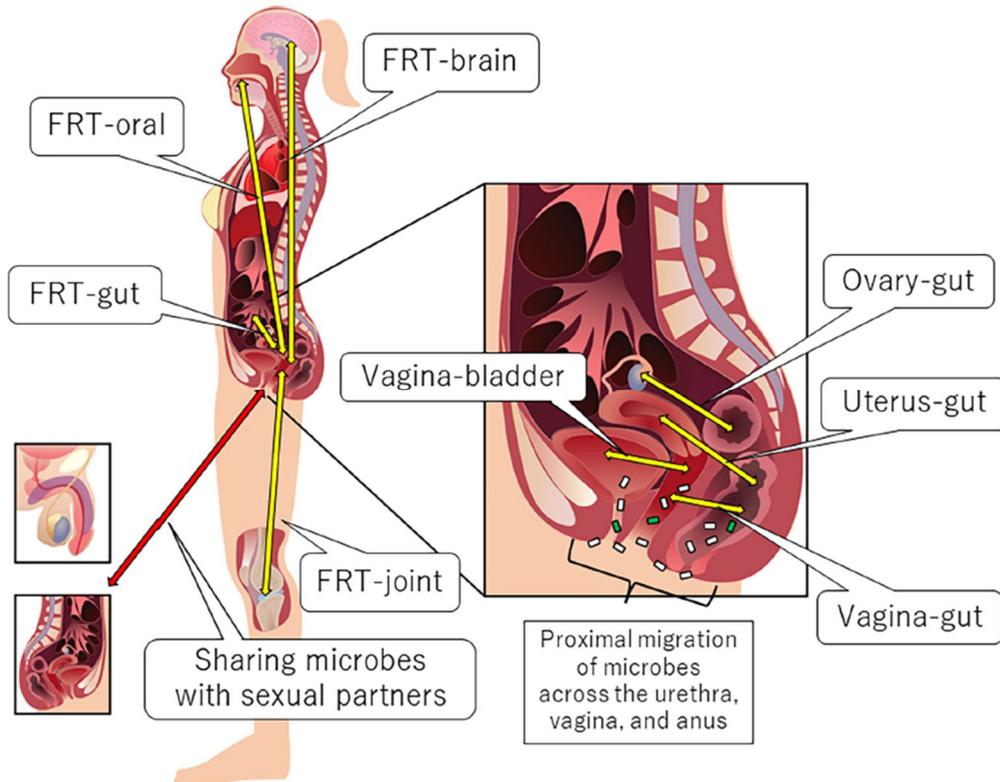


図 3. Female reproductive tract-organ axes の模式図 (文献 4 より)

腸脳相関等が有名であるが、各臓器はそれぞれ様々な機序で遠位的に相互作用を行っている。女性生殖器は以前からホルモンによって遠隔臓器から作用を受けることは知られていたが、近年は細菌叢など新たな機序による相互作用の存在が示唆されるようになった。そこで女性生殖器を中心に最新の知見をまとめ上げ、**Female reproductive tract-organ axes** として提唱した(文献 4)。例として腸腔相関を上げると、その機序は解剖学的に近位である膣と直腸では細菌の直接的な移動、腸内に存在するエストロボームと呼ばれるエストロゲンを代謝する細菌の一群によってエストロゲンの脱抱合が起こり、腸管壁から吸収されやすくなったエストロゲンが膣壁に作用し、*Lactobacillus* の栄養源とされるグリコーゲンの蓄積が増加し、最終的に膣内の *Lactobacillus* が増加する(図 4)。

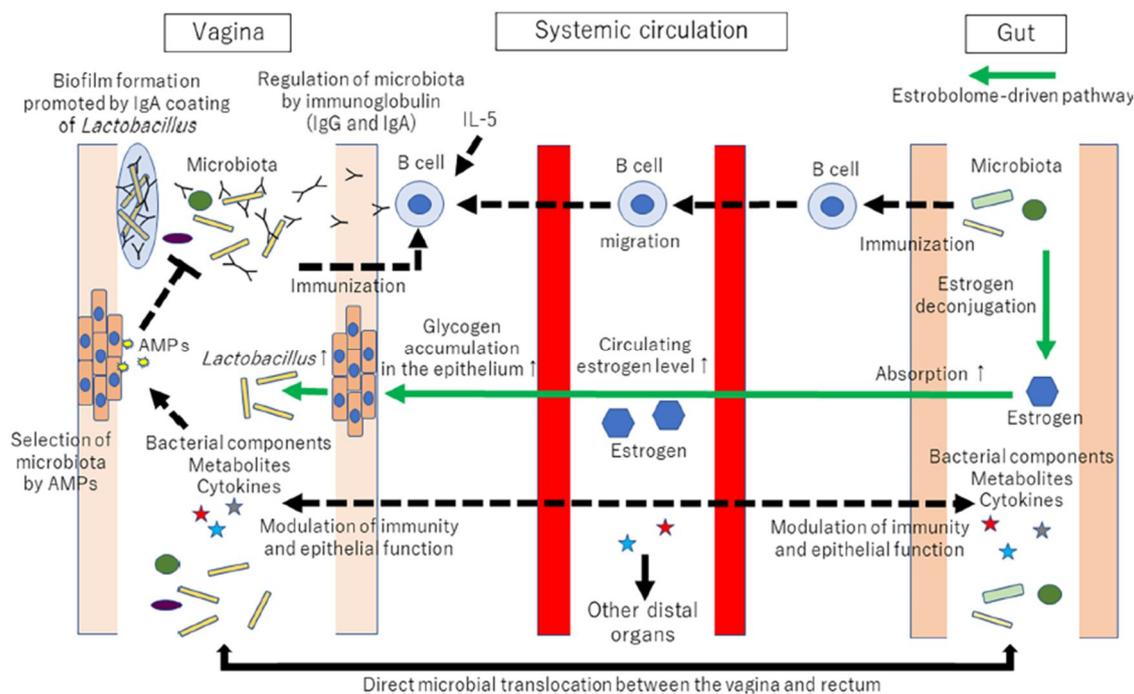


図 4. 腸腔相関の機序予想図(文献 4 より)

引用文献

1. Hayashida S, Takada K, Melnikov VG, Komine-Aizawa S, Tsuji NM, Hayakawa S: How were *Lactobacillus* species selected as single dominant species in the human vaginal microbiota? Coevolution of humans and *Lactobacillus*. *Medical Hypotheses* 2022, 163:110858.
2. Matsuda E, Takada K, Kobayashi O, Nakajima T, Ikeda Y, Asai-Sato M, Kawakami K, Komatsu A, Chishima F, Komine-Aizawa S et al: Pathological roles of antimicrobial peptides and pro-inflammatory factors secreted from the cervical epithelium in *Gardnerella vaginalis*-abundant vaginal flora in pregnancy. *Journal of reproductive immunology* 2023, 156:103797.
3. Yoshida T, Takada K, Komine-Aizawa S, Kamei Y, Ishihara O, Hayakawa S: *Lactobacillus crispatus* promotes invasion of the HTR-8/SVneo trophoblast cell line. *Placenta* 2021, 111:76-81.
4. Takada K, Melnikov VG, Kobayashi R, Komine-Aizawa S, Tsuji NM, Hayakawa S: Female reproductive tract-organ axes. *Frontiers in immunology* 2023, 14:1110001.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hayashida S, Takada K, Melnikov VG, Komine-Aizawa S, Tsuji NM, Hayakawa S.	4. 巻 163
2. 論文標題 How were Lactobacillus species selected as single dominant species in the human vaginal microbiota? Coevolution of humans and Lactobacillus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Hypotheses	6. 最初と最後の頁 110858
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mehy.2022.110858	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 該当する

1. 著者名 Matsuda E, Takada K, Kobayashi O, Nakajima T, Ikeda Y, Asai-Sato M, Kawakami K, Komatsu A, Chishima F, Komine-Aizawa S, Hayakawa S, Kawana K.	4. 巻 156
2. 論文標題 Pathological roles of antimicrobial peptides and pro-inflammatory factors secreted from the cervical epithelium in Gardnerella vaginalis-abundant vaginal flora in pregnancy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 103797
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jri.2023.103797.	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 Takada K, Melnikov VG, Kobayashi R, Komine-Aizawa S, Tsuji NM, Hayakawa S.	4. 巻 14
2. 論文標題 Female reproductive tract-organ axes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1110001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1110001.	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 Yoshida T, Takada K, Komine-Aizawa S, Kamei Y, Ishihara O, Hayakawa S.	4. 巻 111
2. 論文標題 Lactobacillus crispatus promotes invasion of the HTR-8/SVneo trophoblast cell line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 76-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.placenta.2021.06.006	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田恵里那, 高田和秀, 相澤（小峯）志保子, 川名敬, 早川智
2. 発表標題 細菌性膣症原因菌と膣常在菌が子宮頸管上皮細胞の抗菌ペプチド産生に及ぼす影響
3. 学会等名 第37回日本産婦人科感染症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林田慎吾, 高田和秀, 相澤（小峯）志保子, 早川智
2. 発表標題 Lactobacillus crispatusは他の乳酸桿菌種からの増殖抑制を受けにくい
3. 学会等名 第37回日本産婦人科感染症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田和秀
2. 発表標題 腸-膣相関 ~世代を超える細菌叢~
3. 学会等名 第24回日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 並木貴宏, 高田和秀, 高野智圭, 相澤（小峯）志保子, 早川智
2. 発表標題 Lactobacillus acidophilusはretinoic acid存在下でTHP-1細胞からのIL-10産生を促進する
3. 学会等名 第49回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田和秀, 吉田智昭, 相澤(小峯)志保子, 亀井良政, 石原理, 早川智
2. 発表標題 Lactobacillus crispatusは不死化絨毛細胞株HTR/SVneoの浸潤を促進するがGardnerella vaginalisは抑制する
3. 学会等名 第36回日本生殖免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田恵理那, 高田和秀, 相澤(小峯)志保子, 早川智, 川名敬
2. 発表標題 細菌性膣症原因菌と膣常在菌が子宮頸管上皮細胞の抗菌ペプチド産生に及ぼす影響
3. 学会等名 第36回日本生殖免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田和秀, 相澤(小峯)志保子, Trinh Duy Quang, 早川智
2. 発表標題 ヒト不死化膣上皮細胞におけるIL-33とthymic stromal lymphopoietin (TSLP) 産生の検討
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田恵理那, 高田和秀, 相澤志保子, 川名敬, 早川智
2. 発表標題 細菌性膣症原因菌と膣常在菌が子宮頸管上皮細胞の抗菌ペプチド産生に及ぼす影響
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 早川智, 高田和秀, 高野智圭, 相澤志保子
2. 発表標題 腸管と女性生殖器のマイクロピオータ: 隣どうしの誼
3. 学会等名 ヤクルト・バイオサイエンス研究財団 第29回腸内フローラシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 早川智, 高田和秀, 林田真吾, 高野智圭, 相澤志保子
2. 発表標題 女性生殖器のマイクロバイオータ
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Takada K, Komine-Aizawa S, Tsuji NM, Hayakawa S. (Mor G 編)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 460
3. 書名 Reproductive Immunology Basic Concepts 1st Edition, Chapter 20: Interactions between the epithelial barrier and the microbiota in the reproductive tract	

1. 著者名 高田和秀, 早川智. (落合邦康 監修)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 325
3. 書名 ヒト常在菌叢と生理機能・全身疾患, 第六章女性生殖器常在菌・感染微生物と周産期疾患	

〔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
---------	---------