

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590138

研究課題名（和文） 腸内細菌叢の精査解析法の開発と潰瘍性大腸炎原因菌の特定・有効抗菌薬の検索

研究課題名（英文） Development of an accurate analysis method of the intestinal bacterial flora, and detect the causative bacteria of ulcerative colitis, search its effective antibiotics.

研究代表者

河村 好章 (KAWAMURA YOSHIAKI)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：80262757

研究成果の概要（和文）：

UC 発症モデルマウスならびに健常マウスの糞便から DNA を抽出し、DGGE にて解析した。その結果 UC 発症マウスに特異的な複数のバンドを確認することができた。さらに metagenome 法により、各検体より 15,000～40,000 リードの塩基配列を得て、それぞれ菌種名を特定したところ、UC マウスで優位に菌数が増えていた菌群を見出すことができた。これらは *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Clostridium* などの有害菌・日和見菌とされる菌群であった。UC マウスで有意に多数存在していた *Clostridium* sp. ID4 株をマウスに経口投与したところ、腸管壁における炎症像が見られた。

以上のことより、本研究で見出された菌群は、少なからず UC 発症と関係していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Total DNA extracted from the fecal sample of UC model mouse and the healthy mouse were analyzed by DGGE method. As a result, we could find some new bands which were specific for UC model mouse. Furthermore we could obtain 15,000~40,000 sequence read from each specimen by pyrosequencer (Roche 454-FLX-Titanium), and find the certain bacteria whose population was increasing in UC model mouse.

After orally given *Clostridium* sp. ID4 strain -one representative organism which was identified from UC model mouse-, we could find the inflammatory image in the lower portion of the large intestine.

From these data, we concluded that the certain bacteria founding this study were not a little related with the UC onset.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
22 年度	600,000	180,000	780,000
23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：微生物・感染症学

1. 研究開始当初の背景

(1) 潰瘍性大腸炎(UC)の解析の現状

UCは、大腸に限局して浅い潰瘍、びらんが全周性に認められ、直腸から連続的に広がる原因不明の炎症性腸疾患であり、国の特定難治性疾患（難病、公費負担）として指定されている。最近の免疫学の進歩によって、その原因が腸内細菌にあることが明らかにされてきている。すなわち細胞外抗原に対して抗原提示細胞である樹状細胞が反応してサイトカイン(IL-12やIL-4)を介しT細胞を分化させる。活性化したTh1細胞はINF- γ などを分泌し、マクロファージを活性化する。このマクロファージはTNF- α や活性酵素を分泌し、さらに好中球を動員することによって上皮障害を引き起こす。マクロファージと好中球はプロスタグランジンなどをつくり、炎症性腸疾患に特徴的な血管拡張と透過性亢進にも寄与する(J. Clin. Gastroenterol., 22:117, 1996)。この細胞外抗原として合理的に推定されるのは腸内細菌である。特に菌体外膜抗原のリポ多糖(LPS)や細胞壁構成成分のペプチドグリカン多糖体などが腸管に炎症を惹起すること、T細胞受容体 α のノックアウトマウスに自然発生的に腸炎が生じるが、これらの腸炎の多くは無菌環境下では発症しないことなどが判明し、これらのことよりUC等の慢性炎症における腸内細菌の重要性が明らかとなってきた(Int. Rev. Immunol., 19:123, 2000)。しかしながら、大腸には、膨大な量の細菌(糞便1gあたり $10^{11}\sim 10^{12}$ 個)が棲み付いており、腸内細菌叢として1つの生態系を形成している。UCを発症している腸管にあっても、起因微生物は腸内細菌叢の膨大な量に比べれば、その割合は非常に少ない。これまでにUCの原因微生物の特定ができていない最大の問題は、膨大な量の腸内細菌叢が存在しており、様々な

解析方法を駆使しても、大多数を占める常在菌の影響(コンタミネーションデータ)を除去することが不可能であったため、マイナーな菌種の1つである原因微生物を検出できなかった点にある。

(2) 細菌叢の解析方法の現状

細菌叢の構成菌種の解析は、培養による方法が古くから試みられている。しかし多種類の培地や培養条件を組み合わせなければならないことや細菌叢を構成する多くの細菌は培養困難であることから、近年その網羅的な解析方法は、分子生物学的なアプローチが主流となっている。特に16S rDNAのPCR増幅とそれに続くランダムクローニングによる手法が多用されている。しかし16S共通領域プライマーを使ったPCR増幅では競合反応が起こり 10^7 菌液中に混在する約 10^3 の別菌種DNAは増幅されないことを我々は明らかにしている(臨床と微生物, 25:873, 1998)。さらに、このランダムクローニング法で腸内細菌叢を解析したところ、1検体の361クローンを解析しても80%程度のフローラ構成菌を検出したに過ぎないとの報告がある(J. Appl. Microbiol., 95:508, 2003)。通常の研究では1検体から数十~100クローン程度を解析するケースが多く、現実存在している細菌叢の構成メンバーの20~30%程度しか検出していないと考えられる。以上のことから、これまでの細菌叢の解析結果は優勢菌群(大部分を占める常在菌群)のみのデータであると言っても過言ではない。

その他に報告のある細菌叢解析方法として①菌種・菌群特異的なPCR(Microbes Infect., 6:1078, 2004)、②PCR-RFLP(J. Clin. Microbiol., 42:5205, 2004)、③DNA Microarray(J. Clin. Microbiol., 42:4268, 2004)、④T-RFLP(J. Med. Microbiol., 53:563, 2004)、⑤SSCP(Eur. J. Oral. Sci.,

112:516, 2004)、⑥ DGGE (Rheumatol., 41:1395, 2002)、⑦ TGGE (Int. J. Med. Microbiol., 293:309, 2003)などの手法があるが、どれも最初に遺伝子増幅(主としてPCR)を行っており、主として優勢菌群のデータを解析している。

2. 研究の目的

UC 誘発マウスモデルは既に確立しているので、このモデルおよび同系統の健常マウスの腸内細菌叢を使い DNA deduction した後、その構成菌種を比較することにより UC 病態でのみ検出できる/有意に増加している菌種を見出す。それらの菌種を健常マウスに接種し、UC 病態が誘発できるか検討を行い、UC 発症の責任微生物を確定することを目的とする。さらに有効な抗菌薬の検索を行い、治療法確立に役立てる。

前述の如く、膨大な量の腸内細菌叢の中に埋もれ、これまで明らかにすることができなかったマイナーな菌種群を検出する方法論を確立する必要がある。この目的のため、検体からまず 16S 共通領域プライマーにより可変部位を含む DNA 断片を増幅し、これを磁性ビーズと結合、もとの検体と混合して DNA ハイブリッドを形成させ、優勢菌群由来の 16S rDNA を除去 (DNA deduction) し、少数菌群由来 DNA のみを効率的に回収する系を確立する。

3. 研究の方法

【潰瘍性大腸炎モデルマウス特異細菌の検索】

既に確立されている「デキストラン硫酸ナトリウム誘発潰瘍性大腸炎 (UC) マウス」(研究協力者の岐阜薬科大学・森裕志教授より供与をうける)ならびに同系列 (ICR マウス) の健常マウスより、糞便または腸管内容物を回収し細菌 DNA を抽出する。上述の DNA deduction を行ない、優勢菌種由来 DNA を除去後、改めて 16S rRNA を PCR 増幅する。DGGE で、UC マウスと健常マウス由来 PCR 産物を解析し、UC マウスに特異的

に見られるバンド(または UC マウスに有意に多量に存在するバンド)を確認する。

さらに本研究では、DNA deduction 処理を行った検体から得られた PCR 産物を metagenome 法により詳細に解析し、その組成菌種を明らかにする。

【PCR deduction 法の条件設定】

上述の UC 発症モデルマウスと健常マウスの比較において、膨大な量の腸内細菌叢の影響が無視できない可能性があり、そのための方策として DNA deduction 法を確立する。

16S rRNA は周知の如く、可変領域と保存領域に分けられる。菌種特異性を特に反映している Variable area 1 及び 2 領域 (5' 末端側のおよそ 250bp の領域)を中心とし、その両端にある共通領域からプライマー(片側はビオチン化プライマーとする)を設計し PCR 増幅を行う。この増幅産物は全て優勢菌群由来である。PCR 増幅産物をアビジン固定化磁性ビーズと結合させたのち、もとの検体と混合して DNA ハイブリッドを形成させ、優勢菌群由来の 16S rRNA を除去する (DNA deduction)。代表的な腸内細菌を混合した疑似サンプルを用いて、種々の条件を検討 (DNA ハイブリッド形成の主要因子である温度条件あるいはイオン強度を中心に検討) し、効率よく優勢菌群由来 DNA 除去を成しえる条件を設定する。なお、優勢菌群由来 DNA の除去の具合は denature gradient gel 電気泳動システム (DGGE) により評価することが可能である。その後、残った少数菌群由来 DNA を使い、16S rDNA 増幅を行う。

なお、16S rRNA の PCR 産物を使い検体中のリボソーム核酸を除去する方法は既に報告 (Microbiol. Immunol., 48:91-96, 2004.) されているので、核酸除去剤として利用できることは実証されている。

4. 研究成果

まず最初に、腸内細菌叢の中で特にメジャーであるとされている *Bacteroides* spp.,

Clostridium spp., *Lactobacillus* spp., *Propionibacterium* spp. など 26 属 35 菌種の基準株を入手し、それぞれ培養条件の確認を行い、併せて菌体より DNA を抽出し、DGGE 解析をはじめ、種々の解析法のための比較基準として使用する準備を整えた。

さらに、DNA-*deduction* 法についても、その方法論を確立する研究を行い、通常の方法に比べ、約 30% 多様な菌群を検出できる方法論を確立した。

岐阜薬科大学の森教授（研究協力者）より分与を受けた UC 発症マウスおよび健常マウス由来の糞便から全 DNA を抽出し、DGGE 解析を行ったところ、UC 発症マウスに特異的に見出される電気泳動バンドが見られた。その特異バンドを切り出し、塩基配列から菌種名を特定する試みが十分な信頼性をもって実行し得なかった事より、同様のサンプルを使い、*pyrosequence* により網羅的に塩基配列を決定するメタゲノム解析を行った。

その結果、健常マウスにはなく UC マウスに特異的に検出される複数の菌群由来の塩基配列を見出すことに成功した。それらの菌群の中には、文献的に UC と同じ慢性疾患であるクローン病の原因であると推定されているものも含まれており、UC 発症との関連の可能性がひときわ高いものも含まれていた。

そこで当該菌株を米国より輸入し、培養の後、健常マウスに経口投与を行った。経口投与を 4 週間実施したところ、外観上は下痢や軟便あるいは下血といった顕著な症状は示さなかったが、剖検の結果、腸管には炎症細胞の塊と思われる所見が見られ、炎症状態となっていることが確認できた。健常マウスより有意に多数検出された菌種についても同様に経口投与を実施したが、まったく炎症症状は見られなかった。

以上のことより、我々が実施したアプローチで見出すことができた菌群は潰瘍性大腸炎の発症に少なからず関与していると考えられた。

なお、潰瘍性大腸炎モデルマウスから特異的に見出された複数の菌群は、全て “*Eubacterium rectale-Clostridium*

coccoides” グループ (*Clostridium* cluster XIVa) に含まれ、遺伝学的に類縁の菌群であった。これら菌群に共通の flagella 抗原等の免疫刺激と潰瘍性大腸炎発症との関連性は非常に興味深いと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

河村好章、神谷保吉、富田純子、森田雄二、森裕志
メタゲノム法による潰瘍性大腸炎モデルマウスの糞便細菌叢の精査解析
第 85 回日本細菌学会総会、平成 24 年 3 月 27 日、長崎

[図書] (計 0 件)

[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 0 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

河村 好章 (KAWAMURA YOSHIKI)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：80262757