

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590511

研究課題名(和文)腸内細菌による病原細菌の病原性発現抑制機構の解明と応用

研究課題名(英文)Inhibitory effect of gut commensals against pathogenic organisms

研究代表者

桑原 知己(Kuwahara, Tomomi)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：60263810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト腸内常在菌であるBacteroides thetaiotaomicron (BT)の培養上清にはClostridium difficile (CD)の細胞毒性を抑制する作用がある。そのBT由来の責任分子を同定するため、Tn4351挿入変異ライブラリーを作製し、CDの細胞毒性抑制効果を消失したクローンを検索した。その結果、菌体外多糖の輸送や莢膜合成遺伝子にトランスポゾンが挿入された変異株ではCDの細胞毒性に対する抑制作用が減弱しており、BTの産生する多糖がCDの病原性を減弱する作用を有していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Human intestinal symbiont, Bacteroides thetaiotaomicron (BT) showed inhibitory effect in its culture supernatant against the cytotoxicity of Clostridium difficile (CD). Screening of Tn4351 insertion mutant library of BT identified the mutants that lost the inhibitory effect on CD cytotoxicity. In these mutants, Tn4351 was inserted into the genes for polysaccharide transport or capsular polysaccharide biosynthesis. These results indicate that the polysaccharides produced by BT play roles in the inhibition of CD cytotoxicity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学(含真菌学)

キーワード：腸内細菌 毒素 多糖 細胞毒性 バクテロイデス 抗菌薬 下痢症

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管内には多種多様な細菌が定着しており、腸内フローラと呼ばれる常在細菌叢を形成している。偏性嫌気性グラム陰性桿菌である *Bacteroides* 属は腸内フローラを構成する最優勢菌群の一つでありヒトや動物の大腸に分布する。*Bacteroides* 属は敗血症や腹腔内膿瘍、虫垂炎など嫌気性菌感染症の原因となる日和見感染菌でもあるが、近年 *Bacteroides* 属と宿主との共生に関する分子メカニズムに大きな関心が寄せられており、*Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*)の産生する莢膜多糖(PSA)が腸管免疫組織における Foxp3 陽性制御性Tリンパ球を誘導することにより炎症反応を抑制すること(Mazmanian SK et al., Nature 2008)、また、*B. thetaiotaomicron* が Paneth 細胞からの抗菌ペプチド(angiotensin-4)の産生を促進すること (Hooper LV et al., Nat. Immunol. 2003)が報告されている。さらに、詳細な分子メカニズムは明らかになっていないが *B. thetaiotaomicron* の培養上清には腸管出血性大腸菌 O157 の志賀毒素遺伝子 Stx2 の発現を抑制する活性があることが報告されている(de Sablet T et al., Infect. Immun. 2009)。以上の背景から、腸管内常在菌である *Bacteroides* 属が病原細菌に対してその病原性の発現を抑制する機構を有すると考えられる。腸内フローラの構成菌群の中には *Clostridium perfringens* や *Clostridium difficile* など毒素産生能を有するものが存在するが、正常な腸内フローラにおいて病原性を示すことはない。しかしながら、広域抗菌薬の投与による腸内フローラの破綻を契機として壊死性腸炎や偽膜性大腸炎を発症することがある。特に *C. difficile* 関連下痢症(偽膜性大腸炎を含む)は世界的に病院内で蔓延しつつある感染性下痢症であり欧米において大きな問題となっている (Kelly CP et al., N Engl J Med. 2008)。*C. difficile* 関連下痢症は抗菌薬の長期投与などにより腸内フローラが破綻し抗菌薬に耐性かつ毒素産生性の *C. difficile* が大腸内で増加することにより起きるとされている。近年、*C. difficile* 関連下痢症の罹患率と死亡率が著しく上昇しており、米国では年間 250,000 件を超える症例が報告され、その医療費は年間約 10 億ドルに達している (Daniel E et al., Clin. Microbiol. Rev. 2005)。また、偽膜性大腸炎を起こす *C. difficile* はエンテロトキシンとサイトトキシン(ToxinA および Toxin B)を産生するが、近年これら毒素を大量に産生する強毒株(toxin type □ NAP₁/027 株)が出現し、院内でのアウトブレイクについても多数報告されている。*C. difficile* は嫌気性菌でありながら、芽胞を形成するため環境中で長期にわたり生存するため院内感染対策が難しく、特に高齢者を主とした医療施設では対策の難しい大きな問題として認識されている。

2. 研究の目的

我々は *B. thetaiotaomicron* の培養上清中に *C. difficile* の細胞毒性を減弱させる作用があることを見出している。本研究では *B. thetaiotaomicron* が有する *C. difficile* に対する毒素産生抑制機構の詳細を解明し、得られた結果を EHEC など他の腸管病原性細菌に対する拮抗作用の解明にも展開し、腸内菌の糖代謝が病原性抑制という腸内恒常性維持に、どのようなメカニズムで関与しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CD 毒素抑制作用の消失したトランスポゾン挿入変異株の解析

BT の野生株に見られた CD の溶菌抑制や毒素産生に対する抑制作用をグラム染色や qPCR, ELISA, Western blotting 法で解析する。また、SusC/D, Glycosyl hydrolase, Glycosyl transferase family のタンパク質に関してはそれらの基質特異性をデータベース上から推定し、対応する基質を用いて検証する。

(2) CD 毒素抑制因子をコードする遺伝子の欠失株の検証

候補遺伝子群の欠失株を作製し、*in vitro* および *in vivo* においてそれら菌株の CD の病原性に対する効果を検証する。

(3) CD 毒素抑制因子の合成系の構築

莢膜多糖は BT において目的の莢膜多糖 1 種のみを発現する変異体から精製する。その他の抑制分子は大腸管内で大量発現させ、当該タンパク質を精製する。

(4) 精製抑制因子の解析と検証

精製した抑制因子を用いて *in vivo* でその効果を検証する。また、目的莢膜多糖の精製が可能な場合は構成糖を分析し、特徴を明らかにする。

4. 研究成果

我々はヒト腸内常在菌である *Bacteroides thetaiotaomicron* (BT)が偽膜性大腸炎の起原菌である *Clostridium difficile* (CD)の毒素産生を抑制することを見出した。CD はエンテロトキシンである Toxin A とサイトトキシンである Toxin B を保有し、それぞれ HT-29 細胞と Vero 細胞特異的に細胞変性効果を示す。CD と BT を混合培養し、得られた混合培養上清を HT-29 細胞または Vero 細胞に接種して細胞毒性を評価した結果、BT は CD の両細胞に対する細胞毒性を減弱させた。したがって BT は CD の Toxin A および Toxin B 両毒素による細胞毒性を抑制する因子を保有することを明らかにした。CD の細胞内で合成された両毒素は、TcdE タンパク質による自己溶菌作用によって細胞外へ放出される。混合培養時における CD のグラム染色像をみると BT との混合培養においてのみ溶菌が抑制されていたことから、BT が CD の溶菌を阻害することで細胞外への毒素の放出を抑制していると考えられた。また BT の培養上清中には溶菌抑制作用だけでなく、CD の毒素合成を

阻害する作用をもつ生理活性物質が存在することも見出している。加熱あるいは分子量に基づき分画した BT の培養上清で CD を培養した結果、BT の Toxin A 抑制因子は耐熱性であり、抑制活性の大部分は 100 kDa 以上の分画に存在していた。

次に、我々が開発した改良形質転換法 (Ichimura, M. *et al.*, *Appl Environ Microbiol*, 2010.) を用いて BT のトランスポゾン挿入変異ライブラリーを作製し、責任遺伝子群を同定することを試みた。このトランスポゾン挿入変異ライブラリーを用いてスクリーニングを行った結果、CD の Toxin A による細胞毒性を抑制できなくなったクローンでは菌体外多糖の結合や取り込みに関与する外膜タンパク質 (SusC/D family) や多糖の分解酵素や糖転移酵素 (Glycosyl hydrolase, Glycosyl transferase family) の遺伝子にトランスポゾンが挿入されていた。BT のゲノム上には PS-T から PS-Z まで 7 種類の莢膜多糖合成領域 (Capsular polysaccharide synthesis: PS) が存在し、細胞内で合成された莢膜多糖は脂質担体 C₅₅ を介して細胞外へと輸送される。特定の莢膜多糖合成領域 (PS-T および PS-U) や C₅₅ 構成分子の遺伝子 *gcpE* にトランスポゾンが挿入されている変異体では、CD の Toxin B による細胞毒性を抑制できなくなっていた。これらの結果から、CD の細胞毒性に対する抑制作用には BT の糖代謝が関与している事が示唆された。一方で、糖代謝におけるどのような中間代謝分子が CD の溶菌を阻害し、毒素の発現を抑制しているのかに関しては十分な結果を得ていないが、腸管感染症の制御に常在菌由来の多糖が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

BT の CD の細胞毒性に対する抑制効果が *in vivo* でも認められるか否かを検討するため、無菌マウスの腸管に BT と CD を同時に定着させ、マウスの死亡率、盲腸内 Toxin B の定量、および盲腸内容物のグラム染色像を比較した。BT は野生株と昨年度のスクリーニングにより得られた莢膜多糖 (PS-4) 欠損株 (CD の細胞毒性抑制効果を消失した変異株) を用いた。その結果、BT の野生株と CD を共感染させた群では 80% が生存したのに対し、PS-4 の欠損株を投与した群の生存率は 20% であり、BT の CD の細胞毒性に対する抑制効果が *in vivo* においても認められた。この結果は、また、莢膜多糖 PS-4 がこの抑制作用に関与していることを示している。これらの群において盲腸内での Toxin B 量を ELISA 法により定量した結果、BT の野生株と CD を共感染させた群の Toxin B 量は PS-4 欠損株と CD を共感染させた群と比較して有意に低かった。盲腸内のグラム染色像を比較すると、BT の野生株と CD を共感染させた場合、CD はグラム陽性に保たれる菌体が多く、PS-4 欠損株と共感染させた場合には CD の多くの菌体がグラム陰性 (赤く染まる) に染色された。このことは、BT の PS-4 が CD の自己融解を

抑制することにより Toxin A や Toxin B の遊離を抑えている可能性が考えられた。

最後に、どのような糖が本細胞毒性抑制効果に関与しているのかを推測するため、13 種類の糖をそれぞれ 0.5% 濃度になるように CD の培養液中に添加し、細胞増殖および毒素産生量を比較した。すると興味深いことに添加する糖により、CD の培養上清中の HT29 細胞毒性に違いが認められた。Glucose, Xylose, Fructose, Mannose に細胞毒性抑制効果を認めた。また、増殖については、Glucose, Xylose, Fructose, Mannose, Glucosamine, Fucose を添加した場合、Fucose は陰性対照と同様に溶菌を示す OD₅₉₀ の低下が認められたが、その他の糖については OD₅₉₀ の低下が認められず、溶菌が抑制されていると考えられた。したがって、BT の産生する PS-4 や PS-6 の構成糖が CD の溶菌を抑制することにより、本菌の細胞障害性毒素の遊離を抑えていることが示唆された。これら莢膜多糖の構造解析により、*C. difficile* 関連下痢症の治療薬の開発につながる知見が得られるものと考えられる。本研究の成果は、*C. difficile* 関連下痢症や EHEC 感染症の新規予防法の開発のみならず、腸管免疫学、臨床栄養学など、幅広い医学分野に対する波及効果を持つと考える。

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 15 件)

Tamai E, Yoshida H, Sekiya H, Nariya H, Miyata S, Okabe A, Kuwahara T, Miaki J, Kamitori S. X-ray structure of a novel endolysin encoded by episomal phage phiSM101 of *Clostridium perfringens*. *Mol. Microbiol.*, 査読有, 92, 326-337, 2014.

Utsunomiya H, Ichinose M, Ikeda K, Uozaki M, Morishita J, Kuwahara T, Koyama AH, Yamasaki H. Inhibition by caffeic acid of the influenza A virus multiplication in vitro. *Int. J. Mol. Med.*, 査読有, 2014, in press.

Yoshikawa K, Shimada M, Kuwahara T, Hirakawa H, Kurita N, Sato H, Utsunomiya T, Iwata T, Miyatani T, Higashijima J, Kashihara H, Takasu C, Matsumoto N, Nakayama-Imaohji H. Effect of Kampo medicine "Dai-kenchu-to" on microbiome in the intestine of the rats with fast stress. *J. Med. Invest.*, 査読有, 60, 221-227, 2013.

Eguchi H, Miyamoto T, Kuwahara T, Mitamura S, Miamura Y. Infectious conjunctivitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a bathroom. *BMC Res Notes*. 査読有, 6, 245, 2013.

Ichimura M, Uchida K, Nakayama-Imaohji H, Hirakawa H, Tada T, Morita H, Yasutomo K, Okazaki K, Kuwahara T. Mariner-based transposon mutagenesis for

Bacteroides species. J Basic Microbiol, 査読有, 2013, in press.

Wakimoto S, Nakayama-Imaohji H, Ichimura M, Morita H, Hirakawa H, Hayashi T, Yasutomo K, Kuwahara T. PhoB regulates the survival of *Bacteroides fragilis* in peritoneal abscesses. PLoS One, 査読有, 8, e53829, 2013.

Takami H, Taniguchi T, Moriya Y, Kuwahara T, Kanehisa M, Goto S. Evaluation method for the potential functionome harbored in the genome and metagenome. BMC Genomics, 査読有, 13, 699, 2012.

Ishibashi H, Kuwahara T, Nakayama-Imaohji H, Ohnishi Y, Mori H, Shimada M. Effect of indole-3-carbinol and phenethyl isothiocyanate on bile and pancreatic juice excretion in rats. J Med Invest, 査読有, 59, 246-252, 2012.

Nemoto H, Kataoka K, Ishikawa H, Ikata K, Arimochi H, Iwasaki T, Ohnishi Y, Kuwahara T, Yasutomo K. Reduced diversity and imbalance of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. Dig Dis Sci, 査読有, 57, 2955-2964, 2012.

Nakayama-Imaohji H, Ichimura M, Iwasa T, Okada N, Ohnishi Y, Kuwahara T. Characterization of a gene cluster for sialoglycoconjugate utilization in *Bacteroides fragilis*. J Med Invest., 査読有, 59, 79-94, 2012.

Nariya H, Miyata S, Kuwahara T, Okabe A. Development and characterization of a xylose-inducible gene expression system for *Clostridium perfringens*. Appl Environ Microbiol, 査読有, 77, 8439-8441, 2011.

Kuwahara T, Ogura Y, Oshima K, Kurokawa K, Ooka T, Hirakawa H, Itoh T, Nakayama-Imaohji H, Ichimura M, Itoh K, Ishifune C, Maekawa Y, Yasutomo K, Hattori M, Hayashi T. The lifestyle of the segmented filamentous bacterium: a non-culturable gut-associated immunostimulating microbe inferred by whole-genome sequencing. DNA Res, 査読有, 18:291-303, 2011.

Jinnouchi O, Kuwahara T, Ishida S, Okano Y, Kasei Y, Kunitomo K, Takeda N*. Anti-microbial and therapeutic effects of modified Burow's solution on refractory otorrhea. Auris Nasus Larynx. 査読有, 39, 374-377, 2011.

Kishi J, Nishioka Y, Kuwahara T, Kakiuchi S, Azuma M, Aono Y, Makino H, Kinoshita K, Kishi M, Batmunkh R, Uehara H, Izumi K, Sone S*. Blockade of Th1 chemokine receptors ameliorates pulmonary granulomatosis in mice. Eur Respir J, 査読有, 38:415-424, 2011.

Nemoto H, Ikata K, Arimochi H, Iwasaki T, Ohnishi Y, Kuwahara T, Kataoka K*. Effects of fermented brown rice on the intestinal environments in healthy adult. J Med Invest, 査読有, 58:235-245, 2011.

〔学会発表〕(計 13 件)

鈴木基生、今大路治之、堀内功典、桑原知己. マウス腸内難培養菌の胞子精製と発芽誘導. 第 87 回日本細菌学会総会、ワークショップ「難培養を如何に克服するか」、東京、2014 年 3 月.

今大路治之、堀内功典、桑原知己. 腸管内常在菌が *Clostridium difficile* の病原性に与える影響. 第 83 回日本感染症学会西日本地方会、大阪、2012 年 11 月.

今大路治之、大岡唯祐、後藤恭宏、成谷宏文、堀内功典、鈴木基生、岡崎勝一郎、林哲也、桑原知己. *Raoultella ornithinolytica* における histamine 産生は酸素ストレス耐性に関与する. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、2014 年 3 月.

田川淳平、井上哲圭、佐藤啓子、内藤真理子、中山真彰、中山浩次、桑原知己、大原直也. *Porphyromonas gingivalis* における電気穿孔法に適した新規プラスミドベクターの構築. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、2014 年 3 月.

成谷宏文、今大路治之、宮田茂、桑原知己. Novel cloning system of large exogenous DNA as artificial chromosome in *Clostridium perfringens*. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、2014 年 3 月.

島本 敏、成谷宏文、桑原知己、島本 整. O1 エルトール型コレラ菌のレトロN-Vc95 内機能未知遺伝子 orf205 の機能解析. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、2014 年 3 月.

堀内功典、今大路治之、鈴木基生、桑原知己. “亜塩素酸水”の殺微生物効果について. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、2014 年 3 月.

桑原知己. 腸管内における宿主微生物間相互作用に関わる分子の検索. 第 86 回日本細菌学会総会、ワークショップ「細菌間および細菌宿主間の相互作用」、千葉、2013 年 3 月.

市村 穰、今大路 治之、内田 景子、安友 康二、桑原 知己. 腸管内常在菌による *Clostridium difficile* の病原性抑制機構. 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月.

内田景子、市村 穰、今大路 治之、岡崎 勝一郎、桑原 知己. *Bacteroides thetaiotaomicron* におけるマリナートランスポゾン挿入変異ライブラリーの開発. 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月.

桑原知己. ゲノムからみたマウス腸内セグメント細菌の生態. ゲノム微生物学

会ワークショップ，仙台，8月20日 - 21日，2011.

Ichimura M, Kuwahara T, Nakayama-Imaohji H, Yasutomo K. Efficient electrotransformation strategies of *Bacteroides fragilis*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, 6-10 September 2011.

Nakayama-Imaohji H, Kuwahara T, Ichimura M, Yasutomo K. Dynamic regulation of the DNA inversions in *susC/susD* genes clusters by a single tyrosine site-specific recombinase in *Bacteroides fragilis*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, 6-10 September 2011.

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

なし

取得状況(計 0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

桑原知己 (KUWAHARA Tomomi)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：60263810

(2)研究分担者

中山治之 (NAKAYAMA Haruyuki)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80294669

(3)連携研究者

市村 穰 (ICHIMURA Minoru)

研究者番号：なし