様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ５ 月 ２４ 日現在

機関番号：１６２０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：２６４６０５３０

研究課題名（和文）腸内恒常性維持における腸管内常在菌の糖代謝の役割

研究課題名（英文）Role of the sugar metabolism of resident microbiota in the gut homeostasis

研究代表者
桑原　知巳（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）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：Clostridium difficile (CD)の病原性に対するBacteroides thetaiotaomicron (BT)の抑制効果を無菌マウスの混合感染モデルで評価した。BTの野生株投与群はPS6莢膜欠損株および多糖輸送能欠損株群と比べ便中Toxin A量が低く、CDの毒素産生抑制因子はBT由来の莢膜等の高分子多糖である可能性が示唆された。糞便懸濁液上清中のToxin A量をHT-29に対する細胞毒性も同様の傾向を示した。野生株を接種した群は他群と比べてグラム陽性に染まるCDの割合が高く、CDの病原性に対するBTの抑制効果はBT由来の多糖がCDの溶菌を阻害することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Inhibitory effect of Bacteroides thetaiotaomicron (BT) on the toxinogenicity of Clostridium difficile was evaluated in the co-infection model using BALB/c germ-free mice. The fecal Toxin A level in the mice infected with wild type BT and CD was lower than those in the mice colonized with CD and PS6- or polysaccharide transport-deficient BT. This result indicates that the BT inhibition on CD toxin production is mediated by BT polysaccharides. Cytotoxicity assay to HT-29 cells with the fecal supernatant showed the similar results as described above. In addition, the number of CD cell stained in Gram-positive was higher in the feces from the mice infected with wild BT and CD than the mice in other groups. These results indicate that the BT inhibition on CD toxin production is due to the suppression of CD autolysis by BT polysaccharides.

研究分野：微生物学

キーワード：腸管内常在菌　Bacteroides　Clostridium difficile　毒素　溶菌　糖代謝

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菌叢を形成している。腸内フローラは、1,000 種以上の真正細菌や古細菌、真核微生物から構成され、総数にして 100 兆個以上の微生物から構成されている。その中でも、Bacteroidetes 門に属す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優勢菌群であり、ヒトや動物の腸管、特に大腸に分布している。*Bacteroides* 属は、敗血症や腹腔内膿瘍、虫垂炎といった嫌気性菌感染症の主要病原菌であるが、薬剤耐性の観点からも臨床的に重要視されている。一方、*Bacteroides* 属のヒトとの共生メカニズムの医学応用に大きな関心が寄せられており、*Bacteroides* 属の特定の菌種が、宿主の炎症反応を抑制すること、抗菌ペプチドの産生を促進すること、肥満と関連すること、また、腸管出血性大腸菌 O157 の志賀毒素産生を阻害することが報告されている。このように、*Bacteroides* 属は病原性と有用性という二面性を有する医学的に重要な菌群である。

Firmicutes 門に属する細菌群もヒト腸内細菌叢を構成する主要な細菌群である。Firmicutes 門は *Clostridium perfringens* や *Clostridium difficile* (CD)のような毒素産生能を有する細菌を含んでおり、腸管内における Firmicutes と Bacteroidetes の相互作用の解析は、常在菌がどのように病原細菌の定着や病原性の発現を制御するのかを知る上で重要である。

CD は、抗菌薬関連下痢症として知られる偽膜性大腸炎の原因菌であり、病院施設内での蔓延が世界的な問題となっている。CD の主要な病原因子はエンテロトキシン（Toxin A）とサイトトキシン（Toxin B）であり、腸管内でのこれらの毒素レベルが CD 関連下痢症の発症と密接に関連する。これらの毒素を持たない CD は病原性を示さない。本菌種は、健常な成人の大腸内にもわずかながら存在しているが、抗菌薬の長期投与などにより正常な腸内フローラが破綻すると、その抗菌薬に耐性かつ毒素産生性の CD が大腸内で選択的に増加し、その結果、偽膜性大腸炎を引き起こす。このようにして引き起こされる CD 関連下痢症は、特に先進国において非常に問題視されており、特に高齢者に対してはその発生率が年々増加している。また、本菌種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し、院内感染対策を難しくしている。CD 関連下痢症は、特に高齢者を主とした医療施設において対策の難しい感染症として認識されている。

２．研究の目的

本来 CD は健常なヒトの腸管内常在菌であり、抗菌薬使用による菌交代症に至らなければ宿主に対してその毒性を示さない。このことは、常在性の腸内細菌が CD の病原性発現抑制作用をもつ可能性示唆するものである。我々はこれまでに、*Bacteroides* 属の中から CD の毒素産生を抑制する菌種を検索してきた。その結果、*Bacteroides thetaiotaomicron* (BT)の培養上清中に、CD の HT-29 および Vero 細胞に対する細胞毒性を抑制する因子が存在することを見出している。また、その抑制因子は熱安定性で分子量が 10 – 100 kDa であることも明らかにしている。さらに、BT の *mariner* トランスポゾン挿入変異ライブラリーを用いて、CD の毒素産生抑制に関与する遺伝子群を探索した結果、BT の莢膜多糖合成やその輸送に関与する遺伝子群が CD の病原性の抑制に関与していると考えられた。これらの結果は、BT の糖代謝における中間代謝分子が CD の病原性を抑制していることを示唆している。また、BT の培養上清を添加した培地で CD を培養すると全ての増殖ステージでグラム陽性となる菌体の割合が増えること、および BT の培養上清を添加した培地では、GAM

培地のみで CD を培養した場合と比較して、培養上清中の Toxin A 量の明らかな減少が認められることが判明している。また、BT 野生株の培養上清は CD に対して明瞭な自己溶菌抑制作用を示したが、莢膜多糖合成やその輸送に関与する遺伝子の欠損株ではこの抑制作用が減弱した。

本研究では CD の病原性に対する BT の抑制効果が *in vivo* でも認められるのかを検証するために、無菌マウスを用いた混合感染モデルを用いて評価した。また、*in vivo* における BT の CD 自己溶菌抑制作用を確認するために、感染マウス糞便懸濁液上清中の Toxin A の毒素量の解析、およびグラム染色による CD の自己溶菌率の算出を行った。

３．研究の方法

C. difficile (CD) 630 株、*B. thetaiotaomicron* (BT) VPI-5482 株、BT 各種変異株および *B. uniformis* (BU) ATCC8492 株は、GAM 培地もしくは GAM 寒天平板培地を用い、37℃で 24 時間嫌気培養を行った。嫌気培養は、アネロパックシステム（三菱ガス化学）あるいは嫌気チャンバー（N_2:80 %, CO_2: 10 %, H_2: 10 %)を使用して行った。

3 週齢の BALB/c 無菌マウスに BT 野生株あるいは CD 毒素産生抑制効果が減弱した株である PS6 変異株（BTΩPS6）および *gcpE* 変異株（BTΩgcpE)、または陰性対照として BU を経肛門的に約 10^9 個接種した後（各群 5 匹)、3 日後に約 10^8 個の CD を経肛門的に感染させた。その後、経時的にマウス生存率を評価するとともに、1 日、3 日、5 日、7 日後に糞便を採取し、10 倍量の 1xPBS で希釈した後、15,000 rpm,5 分,4℃で遠心して上清と沈殿物に分画した。

ニトロセルロースメンブラン（Advantec）に 200 μg/μl の陽性コントロール用 Toxin A（フナコシ）を 1xPBS で 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} に段階希釈したものと、糞便上清サンプルの希釈液（0.25 μg/μl）を 5 μl ずつスポットし、60℃で 20 分間乾燥した。その後、3% skim milk/1xPBS-T にメンブレンを浸し、30℃で 1 時間振とうしながらブロッキングを行った。メンブレンを少量の 1xPBS-T ですすぎ、20-40 ml の 1xPBS-T で 5 分間振とうしながら wash を 3 回行った。抗 Toxin A 抗体（PCG4, Abcam）の 3,000 倍希釈液を 1 xPBS-T で用意し、30℃, 30 分間ハイブリバック内で反応させた。その後 20 - 40 ml の 1×PBS-T で 5 分間振とうしながらメンブランを 3 回洗浄した。次に、1% skim milk/1×PBS-T で 20,000 倍に希釈した goat HRP-mouse IgG (BIO-RAD)で、1 時間、30℃で反応させた。その後、20-40 ml の 1xPBS-T で 5 分間振とうしながらメンブランを 3 回洗浄した。ハイブリバックを用意し、そこにメンブレンを入れ、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE)を加え、5 分、30℃で保温した。その後、LAS-4010 (GE) を用いて撮影を行った。画像解析は Image J（NIH）を用いた。

HT-29 の培養には、DMEM＋10 %FBS 培地を用いた。また細胞の回収は、trypsin 処理にて行った。

HT29 細胞を DMEM＋10 %FBS 培地を用い、24 ウェルプレートで、37℃,5 %CO_2 存在下で 24 時間培した。その後、古い培地を捨て、新しい DMEM+10 %FBS 培地を 1 ml 加えた後、タンパク質濃度を 0.25 mg/ml に合わせた CD 感染 1 日目の糞便上清サンプルと陽性コントロール用 Toxin A および陰性対照として CD 感染前の糞便上清サンプルをそれぞれ 100 μl 加えて、37℃,5 %CO_2 存在下で 24 時間培養した。古い培地を捨て、1 ml の 1xPBS で洗浄し、500 μl の Neutral Red solution（150 μg/ml Neutral red in 1xPBS を作成後 1,500 rpm,5 分間遠心して上清をフィルターろ過し、使用するときに DMEM+10 %FBS 培地で 100 倍希釈した）を加えて 37℃,5 %CO_2 存在下で 2 時間保温した。その後 1 ml の 1xPBS で洗浄を 2 回繰り返し、50 %EtOH に 1 %の酢酸を加えて

調製した抽出溶液を 1 ml ずつ加えて 37℃で 20 分緩やかに浸透しながらインキュベートした。96 ウェルプレートにサンプルを 200 µl ずつ移し、マイクロプレート高度計（コロナ, SH9000Lab）を用いて 540 nm を測定した。

1xPBS で 10 倍量希釈した糞便サンプル 10 µl をスライドグラスに伸ばして、ガスバーナーで火炎固定した。サンプルが十分に乾いた後、グラム染色を行い、溶菌の程度を顕微鏡観察で比較した。

４．研究成果

CD の病原性に対する BT の抑制効果を無菌マウスを用いた混合感染モデルで評価した。その結果、BT 野生株を接種した群では CD 感染後 1 週間後でも 100％が生存したが、BTΩPS6 変異株を接種した群では 50%、BTΩgcpE 変異株を接種した群では 80%のマウスが死亡した。また CD 毒素産生抑制効果が認められない BU を定着させた群では、１日目に全数死亡した。以上より、CD 毒素産生抑制因子は BT 由来の莢膜等の高分子多糖である可能性が動物実験より示唆された。

混合感染モデルで得られた糞便懸濁液上清中のToxinA量を抗ToxinA抗体を用いたDot blot解析で検討した。その結果、１週間通してBT野生株を接種した群はBTΩPS6株、BTΩgcpE株を投与した群に比べて糞便中のToxinAの毒素量は低い傾向であった。特にBTΩgcpE株を投与した群はBTの野生株を投与した群に比べて、ToxinAの毒素量が多い傾向にあった。

糞便懸濁液上清中におけるCD由来ToxinAのHT29細胞に対する細胞毒性をNeutral Red Assayによって検討した。その結果、BT野生株を投与した群はBTΩPS6株やBTΩgcpE株を投与した群に比べて、HT29細胞に対する細胞毒性が低い傾向であった。

以前の結果より、BT による CD 細胞毒性抑制作用は、BT 由来の莢膜多糖が CD の自己溶菌を阻害し、菌体外への毒素の放出を阻害している結果であることが示唆されている。そこで、今回の感染モデルにおいて CD の自己溶菌率を算出するため糞便懸濁液のグラム染色を行った。その結果、１週間通して BT 野生株を接種した群は他の変異株投与群や BU 投与群と比べてグラム陽性の割合が高いことが判明した。以上より、混合感染モデルにおける CD の病原性に対する BT の抑制効果は、BT 由来の莢膜多糖が CD の自己溶菌を阻害した結果であることが示唆された。

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　6 件）

1. Identification of a new virulent clade in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H- sequece type 29. Ishijima N, Lee KI, Kuwahara T, Nakayama-Imaohji H, Yoneda S, Iguchi A, Ogura Y, Hayashi T, Ohnishi M, Iyoda S. Sci Rep. 査読有. 43136, 2017.
2. Counterselection employing mutated *pheS* for markerless genetic deletion in *Bacteroides* species. Kino Yasuhiro, Haruyuki Nakayama-Imaohji, Masashi Fujita, Ayano Tada, Saori Yoneda, Kazuya Murakami, Masahito Hashimoto, Tetsya Hayashi, Katsuichiro Okazaki and Tomomi Kuwahara. Anaerobe. 査読有. 42:81-88, 2016.
3. Nakayama-Imaohji H, Hirota K, Yamasaki H, Yoneda S, Nariya H, Suzuki M, Secher T, Miyake Y, Oswald E, Hayashi T, Kuwahara T. DNA inversion regulates outer membrane vesicle production in *Bacteroides fragilis*. PLoS One. 査読有. 2016, e0148887.
4. Tamai E, Yoshida H, Sekiya H, Nariya H, Miyata S, Okabe A, Kuwahara T, Maki J, Kamitori S. X-ray structure of a novel endolysin encoded by episomal phage phiSM101 of *Clostridium perfringens*. Mol Microbiol 査読有. 92, 326-37, 2014.
5. Tagawa J, Inoue T, Naito M, Sato K, Kuwahara T, Nakayama M, Nakayama K, Yamashiro T, Ohara N. Development of a novel plasmid vector pTIO-1 adapted for electrotransformation of *Porphyromonas gingivalis*. J Microbiol Methods. 査読有. 105, 174-179, 2014.
6. 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. 54, 558-67, 2014.

〔学会発表〕（計　3件）

1. 桑原知巳. 腸内フローラと感染症. 第84回日本感染症学会西日本地方会学術集会、シンポジウム「Host-Pathogen interaction に注目した感染症の病態解明と制御」、2014年10月、岡山県・岡山市.
2. 桑原知巳. 腸管内常在菌による*Clostridium difficle*の病原性抑制機構、第67回日本細菌学会中国四国支部総会、2014年10月、徳島県・徳島市.
3. 桑原知巳、今大路治之. *Bacteroides fragilis*におけるシアリダーゼとエステラーゼは腹腔内膿瘍形成に関与する。第85回日本感染症学会西日本地方会学術集会、2015年10月、奈良県・奈良市.

〔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
　なし。

６．研究組織
(1)研究代表者
桑原　知巳（KUWAHARA, Tomomi）
香川大学・医学部・教授
研究者番号：60263810

(2)研究分担者
今大路　治之（Imaohji, Haruyuki）
香川大学・医学部・助教
研究者番号： 80294669

橋本　雅仁（HASHIMOTO, Masahito）
鹿児島大学・理工学域工学系・教授
研究者番号：30333537

(3)連携研究者
なし（　　）

研究者番号：

(4)研究協力者
なし（　　）