

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850206

研究課題名(和文)炎症性腸疾患の病態形成を惹起する腸内共生細菌の同定

研究課題名(英文)Identify the commensal bacteria that development of colitis

研究代表者

中西 祐輔(Nakanishi, Yusuke)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：20579411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、IBDの病態形成を誘導する腸内細菌の同定とその免疫学的メカニズムの解析を試みた。その結果、選択的にグラム陽性細菌を除去する抗生物質バンコマイシンを前投与すると、IBDモデルにおける炎症性単球・マクロファージの大腸組織への浸潤が抑制され、IBDの指標である体重減少、腸組織像などが改善した。更に、16S rRNA解析より、バンコマイシン処置によって減少するグラム陽性細菌の主体はLachnospiraceaeであることが明らかとなり、同菌が大腸上皮細胞に作用することによって、炎症性の単球・マクロファージを大腸炎症局所へ浸潤させるケモカインの産生が誘導されことを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Using a mouse dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis model, we found that commensal Gram-positive bacteria trigger the mobilization of inflammatory monocyte and macrophage. TNF is a representative inflammatory cytokine that aggravates colitis and a target for therapy, predominantly produced by monocyte and macrophage. Interestingly, pretreating mice with vancomycin, which eliminated Gram-positive bacteria significantly reduced the severity of colitis, evaluated by the colon length, cytokine level, histological analysis etc. In addition, 16S rRNA analysis showed that vancomycin treatment dramatically reduced Lachnospiraceae, the most abundant order of Clostridiales in untreated control mice. We also suggested that this strain stimulated the local production of chemokine by colonic epithelial cells, which induce the mobilization of monocyte/macrophage into the inflamed colon.

研究分野：免疫学

キーワード：炎症性腸疾患 マクロファージ 共生細菌

1. 研究開始当初の背景

生体内最大の臓器である消化管には、多種多様な免疫細胞と数百種類かつ 10^{9-12} とも言われている腸内細菌とが共生関係を構築しており、宿主の消化吸収・代謝・腸の蠕動運動といった生理作用に寄与している。

近年、粘膜免疫細胞の精製方法が確立したこと、および細菌叢メタゲノム解析の進歩などの恩恵により、定常状態における腸内共生細菌と腸管免疫細胞（特にヘルパーT細胞の分化）との関係が明らかとなり、本邦の研究者もこの領域の第一線で成果を挙げている。

一方、腸内共生細菌は宿主に対して正の作用だけを持っているわけではない。定常状態では、腸内共生細菌と粘膜免疫細胞は上皮細胞のバリア機能によって隔てられているが、何らかの理由（遺伝的リスク・感染症など）で上皮バリア機能が破綻した場合、腸内共生細菌の存在は一気に非自己となる。例えば、自発性腸炎を発症するような遺伝子欠損マウスを無菌的に飼育あるいは抗生物質を投与することによってその発症を抑制することが知られている。更には、デキストラン硫酸塩（DSS）をマウスに摂取させ、上皮バリア機能を破綻させて腸炎を誘導するモデルにおいても、抗生物質の投与によって病態の形成が抑えられることが知られている。これらの報告は、上皮バリア機能の破綻により生体内に侵入した共生細菌に対し、免疫細胞が過剰に応答することによって、炎症性腸疾患の病態が形成されることを示している。しかし、実際に炎症性腸疾患を惹起する腸内細菌は同定されていない。

DSS誘導性腸炎モデルは、上皮細胞バリア機能を壊す潰瘍性大腸炎のモデルとして知られ、腸内共生細菌（感染性微生物でない）に対する腸管免疫細胞の応答を観察する上で最適のモデルと考えられている。申請者のこれまでの成果から、このモデルにおいて、大腸炎症部位に多量に $CD11b^+CD11c^{int}$ の細胞が浸潤していること、更には、これらの細胞がマクロファージ、単球、好酸球および好中球の4つの細胞群から構成されていることが明らかとなった。次に、これらの浸潤細胞の炎症性サイトカイン産生パターンを検討

したところ、単球/マクロファージが $TNF-\alpha$ を産生する主な炎症細胞集団であることが明らかになった。これらの結果は、単球およびマクロファージの大腸炎症部位への浸潤がIBDの病態形成において重要なプロセスであることを示している。

2. 研究の目的

我々は、特定の腸内細菌がIBDの病態形成に重要な役割を果たして単球およびマクロファージの浸潤を統御しているかどうかについて検討するため、あらかじめ異なる抗菌スペクトルを持つ抗生物質で処理をしたマウスにDSS腸炎の誘導を試みた。その結果、グラム陰性細菌に対して抗菌性を持つコリスチンで処理しても病態形成に影響は与えなかったが、グラム陽性細菌に対して抗菌性をもつバンコマイシンで処理しておくこと、DSSによる病態形成が顕著に抑制されていた。驚くことに、この時の細胞浸潤を解析すると、炎症性単球/マクロファージのみが有意に低下していた。これらの結果から、バンコマイシン感受性のグラム陽性細菌が、炎症性単球/マクロファージの浸潤を統御することによって、IBDの病態形成が起こることが強く示唆された。

よって、本課題では次世代シーケンサーを用いた16S rRNAメタゲノム解析などの手法により更なる詳細な解析を行ない、より特異的な属菌さらには菌種まで同定する。原因共生細菌が炎症性単球/マクロファージの浸潤を誘導する免疫学的メカニズムを解明することを目的とし、IBDのリスク要因およびその治療法開発を目指す。

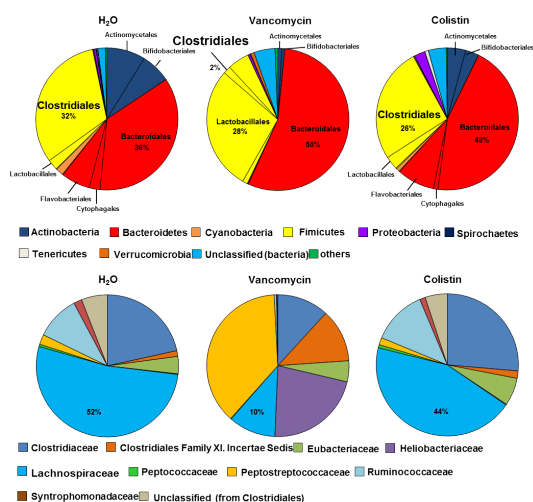
3. 研究の方法

バンコマイシン感受性のIBD惹起性腸内細菌を同定するため、それぞれの抗生物質を投与したマウスの糞便を回収し、微生物由来のDNAを精製した。その後、次世代シーケンス用にライブラリーを作製して、シーケンスをかけた。その後、データ解析は、無料ソフトであるMG-RASTを用い、RDP解析によって菌種の同定を行った。

次に、免疫学的なメカニズムを解析する目的で、それぞれの抗生物質処理をしておいたマウスにDSS腸炎を誘導し、5日目に大腸上皮細胞を精製して、ケモカインの遺伝子発現量を定量した。

4. 研究成果

メタゲノム解析の結果、マウス糞便中細菌叢の79%はFirmicutesとBacteroidesで占められていた。目レベルの検討では、Firmicutes門の中で最も優勢菌であったClostridialesであり、これらの細菌群がバンコマイシンの処理によって消失していた。一方、Lactobacillatesはバンコマイシンに耐性を示していた。科レベルでの解析は、LachnospiraceaeがClostridialesの中で最も優勢な菌種であることが明らかとなった。即ち、炎症性腸疾患を惹起する可能性のある細菌群としてLachnospiraceaeが有力な候補として挙げられた。

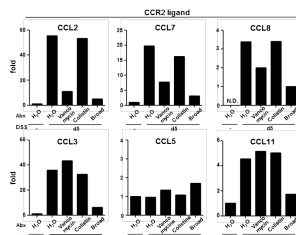
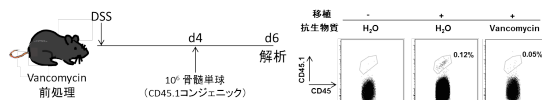


実際、種レベルの解析において最も優勢な細菌であったLachnospiraceae bacterium A4はクローン病患者の血清からこの細菌の遺伝子が検出されている。しかし、この細菌は現時点で難培養細菌であることから、直接的な証明は困難であった。

次に、バンコマシ感受性細菌の単球およびマクロファージの浸潤誘導メカニズムを更に詳細に解析する為、骨髓由来単球を精製して、DSSで腸炎を誘導したマウスに移入した。その結果、あらかじめレシipientのマウスをバンコマシで処理しておく、単球の浸潤は抑制されていた。次に、単球の浸潤に重要なケモカインの産生を評価する為、大

腸上皮細胞を精製して定量PCRにより発現量を測定した。その結果、CCL2、CCL7、CCL8といった、ケモカイン遊走因子の発現パターンがDSS誘導性腸炎によって増加し、それらの増加はバンコマイシンの処理によって抑制されていた。

一方、単球の遊走に関連していないケモカインの産生は変動していなかった。これらの



結果から、バンコマシ感受性のグラム陽性細菌が、上皮細胞からのケモカインの産生を過剰に促すことにより、炎症性の単球およびマクロファージの浸潤が促進されることによってIBDの病態形成メカニズムであることが明らかとなった。

既述の様に、IBDの患者には様々な治療戦略がとられているが、これらの治療法では改善しない患者も未だに存在する。恐らく、IBDの発症メカニズムは我々が想像しているよりもはるかに複雑なのかもしれない。従って、治療戦略の選択肢を増やしていくことは、IBDの患者にとっても有益なことだと考えている。

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 1 件)

Commensal Gram-positive bacteria initiates colitis by inducing monocyte/macrophage mobilization.

Y. Nakanishi, T. Sata, T. Ohteki. *Mucosal Immunology*. 2015 (8) 152-160. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

Dynamics of colonic macrophages during the development of colitis.

Y. Nakanishi, T. Ohteki. 日本免疫学会, 2015,11月, 札幌.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

中西 祐輔 (NAKANISHI Yusuke)
東京医科歯科大学 難治疾患研究所 助教
研究者番号：20579411

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：