

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

愛知学院大学

論 文 提 出 者 久 綱 僚

所 属 研 究 室 微 生 物 学

論 文 題 目

*Clostridiaceae*科の細菌による潰瘍性大腸炎モデルマウス

病態増悪能の検証および分類学的精査

【背景および目的】

クローン病とともに炎症性腸疾患に分類される潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis; UC)は、時に下血を伴う下痢および腹痛を主症状とし、寛解と再燃を繰り返して慢性的経過を辿る (Podolsky., *N Engl J Med.* 1991; 325: 928) 。 UC患者の大腸粘膜においては、直腸から連続的に続く潰瘍およびびらんが広がり、種々の炎症関連因子の遊走が観察される (Abraham et al., *N Engl J Med.* 2009; 361: 2066) 。 患者数は世界規模で増加の一途を辿る現在においても、発症メカニズムおよび完全な治療方法は解明されていない (Xavier et al., *Nature.* 2007; 448: 427) 。

そのような中で、UC患者腸内細菌叢では特定細菌群の増減および構成細菌種数の減少 (単純化) を伴う *dysbiosis*が生じており、UC患者への糞便細菌叢移植療法が臨床症状およびQOLの改善に繋がること、IL-10ノックアウトマウスなど自然発症腸炎モデルが無菌環境下で飼育された際には大腸炎を発症しないことなどが明らかとなっている (Manichanh et al., *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012; 9: 599) 。 これらの現象は、本疾患と腸内細菌との強い関係性を示しており、腸内細菌の中でも、いわゆる悪玉菌の存在と、それらの生体への影響について把握することは、UC病態を紐解く鍵となり得ることを示唆している。

しかしながら、ヒト腸内細菌叢には500から1,000種もの細菌が 10^{11} 個/gのオーダーで存在しているだけでなく、生活環境、食文化、既往歴などに基づく構成細菌種数ならびに全体の細菌数は個人によって非常に富んだバラエティーを有している (Eckburg et al., *Science.* 2005; 308: 1635) 。 その中からUC病態に関与している特定菌種の存在を見出すことは至難の業であることから、これまでにUC病態解明を目的とした様々な動物モデルが作製され、さらには無菌、ノトバイオーム技術なども応用して、腸内細菌と病態の関係性

についての研究がされてきた (Chien et al., *Biomed Res Int.* 2014; 2014/675786)。しかし、その報告のほとんどが腸内細菌をプロバイオティクスとしてモデルマウスへ適用するという内容であり、加えて、それらはしばしば複数菌株のカクテルとして用いられてきたことから、個々の細菌株の生体内での挙動、ならびに生体に与える影響について把握することは困難であった (Geier et al., *Int J Food Microbiol.* 2007; 114: 267)。

そこで、UC発症／悪化に関与する細菌種を特定するため、metagenome解析を適用した。そして、デキストラン硫酸ナトリウム (Dextran sulfate sodium; DSS) 誘発性UCモデルマウスの糞便構成細菌の網羅的解析により、健常対照群に比してモデルマウス群における*Clostridium* sp. ID4の有意な増加を見出した (Kawamura et al., *Jpn J Bacteriol.* 2012; 67: 106)。当該*Clostridium* sp. ID4の16S rRNA遺伝子は、近年、*Clostridium*属から*Paraclostridium*属に再分類された*Paraclostridium bifermentans* ATCC 638^T (Sasi et al., *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016; 66: 1268) と最も高い類似性を示した (>99%)。しばしばヒト腸内細菌叢からも見出される*P. bifermentans* は、子宮内膜炎、転移性骨髄炎、壊死性肺炎および蓄膿症などとの関与が示唆されている (Hale et al., *Open Forum Infect Dis.* 2016; 3: ofw095)。

当該菌株がUCモデルマウス病態に大きく関わっていることを予想し、本研究では、UCモデルマウスへの菌液投与ならびに各種評価を実施することで、マウス病態への影響について確認した。さらに、当該菌株の正確な分類学的位置を見極めるため、*P. bifermentans*基準株ならびに16S rRNA遺伝子相同性に基づく類縁菌種と併せて、分類学的手法を用いた比較解析を実施した。

【方法】

Clostridium sp. ID4をDr. M. Kalmokoff (Canada) より譲受 (Gourgue-Jeannot et al., *Can J Microbiol.* 2006; 52: 924) し、*Clostridium* sp. PAGU 1678として当研究室に登録・保存した。プロバイオティクスとして知られる同属の*Clostridium butyricum* PAGU 1417^T、以前にUCモデルマウス病態軽減報告のある*Lactobacillus plantarum* PAGU 1415^Tを比較対照として使用し、各菌株をGAM培地にて嫌氣的に培養した (Hayashi et al., *Cell.* 2013; 13: 711)。使用動物として、C57BL/6Jマウス (5週齢、雌) をDSS非処理 (Normal control) 群、DSS単独処理 (DSS control) 群、DSS処理下PAGU 1678投与 (DSS + 1678) 群、DSS処理下PAGU 1417投与 (DSS + 1417) 群、DSS処理下PAGU 1415投与 (DSS + 1415) 群に無作為に分けた (n=12/群)。1週間の飼育慣らし後、DSS + 1678群、DSS + 1417群およびDSS + 1415群に対して各種菌液 (2×10^9 CFU/mouse/day) を経口投与した。Normal control群およびDSS control群に対しては滅菌PBS溶液を経口投与した。各種菌液または滅菌PBS溶液の1週間の前投与後、Normal control群を除くDSS処理群に対し、1% DSS溶液の自由飲水により大腸炎を誘発させた。DSS処理開始日をday 0とし、各種菌液または滅菌PBS投与は継続してday 21まで実施した。1週間に一度、体重測定およびdisease activity index (DAI)に基づく病態評価、各群3匹ずつ屠殺解剖することにより大腸の状態および伸長率を確認した (Islam et al., *Br J Pharmacol.* 2008; 154: 812)。マウス糞便の細菌構成は、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法を用いて比較した (Hong et al., *J Microbiol Biotechnol.* 2016; 26: 1057)。大腸組織の炎症程度は、大腸組織切片のHE染色後、組織学的指標 (histological score; HIS) に基づくスコアリングによって評価した (Liu et al., *Int Immunopharmacol.* 2011; 11: 2159)。腸管内における炎症性関連因子および炎症性サイトカインmRNA遺伝子発現レベルは、

Real time qPCRを用いて測定した (Ohkusa et al., *J Med Microbiol.* 2009; 58 (Pt 5): 535)。糞便中短鎖脂肪酸濃度は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて解析した (Torii et al., *Ann Clin Biochem.* 2010; 47: 447)。さらに、好中球由来のミエロペルオキシダーゼ (Myeloperoxidase; MPO) について、ELISAを用いて腸管内濃度を測定した。

16S rRNA 遺伝子解析に基づき、*P. bifermentans* である可能性が示唆された本菌株 (“*P. bifermentans*” PAGU 1678) の分類学的精査を実施するため、比較対照として *P. bifermentans* PAGU 2008^T (=JCM 1386^T) および *P. benzoelyticum* PAGU 2068^T (=LMG 28745^T) を、それぞれ微生物系統保存機関 (culture collection; CC) より譲受した。Reinforced clostridial 培地または GAM 培地にて発育後、菌体の形状および大きさを走査型電子顕微鏡を用いて確認し、運動性および Gram 染色像は位相差顕微鏡を用いて観察した (Kawamura et al., *Syst Appl Microbiol.* 2015; 38: 104)。表現型として、各菌株の至適発育温度、至適発育 pH、至適発育 NaCl 濃度、発育における有機基質 (ascorbate, benzoate, butyrate, cellobiose, fructose, fumarate, glucose, glycerol, lactose, malate, mannitol, mannose, ribose, sorbitol, starch, succinate) 要求性、アミノ酸 (arginine, proline, serine, threonine, glutamine, leucine, alanine, histidine, valine, L-tryptophan, L-phenylalanine and threonine) 利用能、抗菌活性物質産生能を確認、さらに各種抗菌薬に対する感受性試験を実施した (Subhash et al., *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013; 63: 2132)。極性脂質分析として二次元 TLC を適用し、脂肪酸メチルエステル分析は、microbial identification system (MIDI) を用いて実施した (Hamada et al., *J Gen Appl Microbiol.* 2010; 56: 427)。各種生化学性状として、デンプン/ゼラチン加水分解、硝酸塩還元、インドール産生、クエン酸利用、リパーゼ活性、オキシダーゼ活性、カタラーゼ活性、リジン脱炭酸、硫化水素産生能の有無を試験した (Cappuccino et al., *A Laboratory Manual.* 1999; 5th edn)。

また、全菌体タンパク質解析として、SDS-PAGE および MALDI-TOF MS に基づくクラスター解析を実施した (Lee et al., *J Microbiol Biotechnol.* 2012; 22: 1107)。さらに、分類学的関係性を確認するため、DNA-DNA hybridization (DDH)法ならびに Average nucleotide identity (ANI)法を適用し、各菌株間における DNA 相同性を比較した (Boom et al., *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 495)。

【結果と考察】

DSS処理または各種菌液投与が及ぼすマウスへの影響について、DSS + 1415群およびDSS + 1417群では、Normal control群にも似た体重増加を示した一方、DSS + 1678群では、day 21においてDSS control群よりも有意な体重減少が確認された。DAIに基づく病態評価では、day 21のDSS + 1678群において、他の群に比して有意なスコアの上昇がみられた。

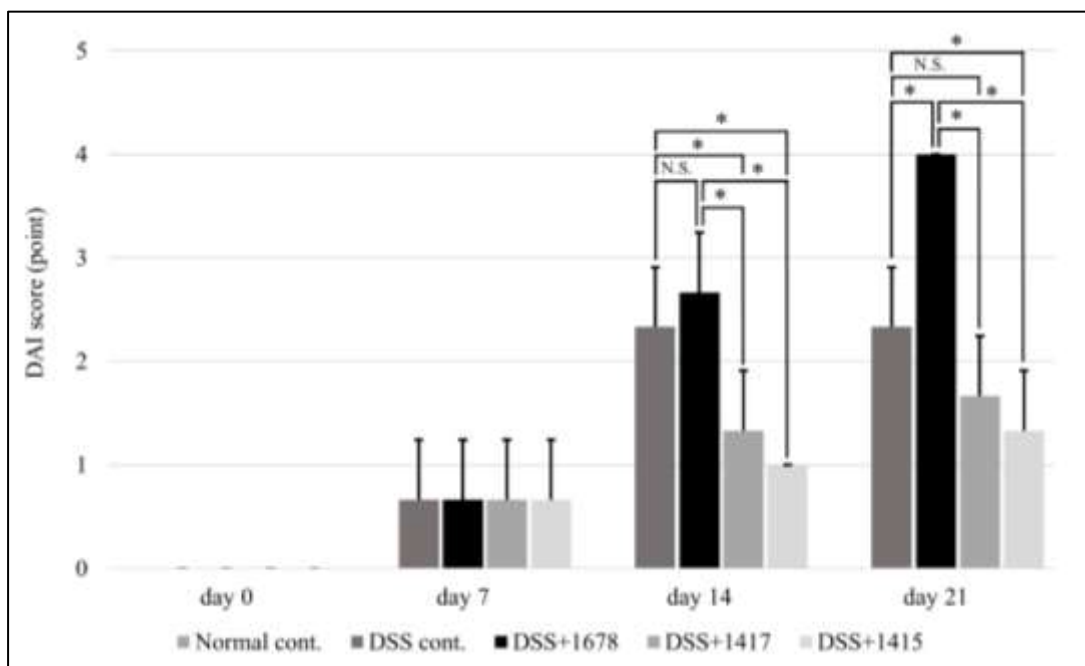


図. DAIに基づく病態評価

屠殺解剖後の大腸の状態について、DSS処理期間に応じてDSS処理群における腸管内容物は液状化を示し、大腸炎の進行が確認された。day 21における大腸伸長率は、DSS control群とDSS + 1678群間で有意差はなかったものの、いずれも他の群より顕著な大腸の萎縮を示した。DGGE解析の結果、各種菌液の前処理後において各群の糞便細菌構成に差はなく、Normal control群に似た豊富な腸内フローラの形成が観察された一方、day 21ではDSS処理群における構成細菌種数の減少がみられ、その中でもDSS + 1678群における減少率は顕著であった。大腸切片の組織学的解析の結果、day 21のDSS + 1678群における有意なHISスコアの上昇がみられ、DSS + 1678群マウスでの腸管炎症の重症化が確認された。腸管内での炎症関連因子および炎症性サイトカインmRNA遺伝子の発現レベルについては、DSS + 1678群における上昇傾向が示された。また、DSS + 1678群では、制御性T細胞のマスター転写因子であるFoxp3 mRNA遺伝子発現レベル、Th17細胞の誘導を制御するSOCS3 mRNA遺伝子発現レベルの有意な減少が認められ、腸管恒常性が破綻していることが示唆された。糞便中の短鎖脂肪酸濃度について、酢酸、プロピオン酸、酪酸はいずれもDSS + 1678群において減少傾向を示し、腸管バリア機能が低下していることが示唆された。腸管内MPOについては、day 21のDSS + 1678群において他の群に比して有意に高いMPO活性が示され、腸管内における高レベルの好中球遊走が示唆された。

これらの結果から、DSS + 1678群におけるマウス病態の悪化は明らかである。つまり、“*P. bifermentans*” PAGU 1678はUCモデルマウス病態増悪能を有しており、一般に生体の健康維持に資するとされる細菌群であるClostridiaceae科の中から、病態悪化に作用する細菌種を見出すことができた。予備実験として実施した、健常マウス（DSS非処理下）への“*P. bifermentans*” PAGU 1678菌液投与ではマウス大腸炎を誘導することができな

かったことから、DSSによるマウス腸管粘膜への損傷と、そこから侵入した“*P. bifermentans*” PAGU 1678による好中球主体の過剰な免疫反応が生じていることが予想される (Daren et al., *Drug Des Devel Ther.* 2013; 7: 1341)。今回、一般には3-5%濃度で使用されるDSS溶液を1%にてマウスへ処理したことで、病態の進行が緩やかとなり、各種炎症の指標を見逃すことなく評価することが可能となった。本研究では、モデルマウスを使用して単独菌株による病態増悪能を実験的に証明した。これは世界で初めてとなる。

これまで、*P. bifermentans*とUC病態との関連を示した報告はないことから、“*P. bifermentans*” PAGU 1678の分類学的精査を実施した。表現型および生化学性状について、*P. bifermentans* JCM 1386^TはH₂Sを産生しないことが報告されている (Sasi et al., *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016; 66: 1268)。しかし、本解析において*P. bifermentans* JCM 1386^T (= PAGU 2008^T)および別のバージョンの*P. bifermentans* ATCC 638^T (= PAGU 2078^T)はH₂S産生を示し、*P. bifermentans*のH₂S産生について、陽性と記載すべきであると結論付けた。一方、“*P. bifermentans*” PAGU 1678はH₂S産生について陰性を示し、また、valine利用能の有無、rifampicin、gentamicinおよびchloramphenicolに対する感受性によっても、他の2つの基準株と明確に区別された。極性脂質について、“*P. bifermentans*” PAGU 1678では*P. bifermentans* PAGU 2008^Tおよび*P. benzoelyticum* PAGU 2068^Tには存在しない極性の異なる2種類のphospholipidが存在すること、さらに、*P. bifermentans* PAGU 2008^Tおよび*P. benzoelyticum* PAGU 2068^Tにおいて現れたglycolipidの2つのスポットが、“*P. bifermentans*” PAGU 1678ではシングルスポットとして現れたことによって特徴付けられた。SDS-PAGEの結果、各菌株に特徴的な泳動バンドの存在が確認され、“*P. bifermentans*” PAGU 1678および*P. bifermentans* PAGU 2008^Tは75%の相同値で異なるクラスターへと分けられた。MALDI-TOF MS解析の結果につい

ても、“*P. bifermentans*” PAGU 1678は、*P. bifermentans* PAGU 2008^Tおよび*P. benzoelyticum* PAGU 2068^Tとは55%の相同値で異なるクラスターへと分けられ、各菌株が異なるタンパク質構成を有することが示された。16S rRNA遺伝子配列に基づく系統発生解析により、“*P. bifermentans*” PAGU 1678は系統的に*P. bifermentans* PAGU 2008^Tと非常に密接に関連していることが確認された (>99%)。系統発生解析における多くの場合、16S rRNA遺伝子のみを用いて2つの細菌種を区別することは困難である (Stackebrandt et al., *Microbiology Today*. 2006; 33: 152)。実際、16S rRNA遺伝子の相同性が>99%であっても、DDH相同値を用いて明確な分類を得ることができる (Kim et al., *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014; 64: 346)。本研究における“*P. bifermentans*” PAGU 1678および*P. bifermentans* PAGU 2008^T間のDDH相同値は、同じ種としての基準 (>70%) を満たさない60.03% (58.31–61.75%) を示し、この値は同じ種 (*P. bifermentans*) に属する“他の亜種”として分類される (Bergey et al., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1984; 1st edn)。

各種解析結果に基づき、“*P. bifermentans*” PAGU 1678は*P. bifermentans*の新規亜種として分類されるべきであると結論づけ、*P. bifermentans* subsp. *muricolitidis* subsp. nov.という名称を提案した。論文の公表および2ヶ国、2ヶ所のCC (NBRC、CCUG) への菌株の寄託により、*Paraclostridium bifermentans* subsp. *muricolitidis* subsp. nov. PAGU 1678^Tは、*P. bifermentans*の新規亜種として正式に認められた。