

平成 27 年度
医療生命薬学助成研究概要

細菌二次代謝産物と炎症性疾患の関係性を探る萌芽的研究

研究代表者：中島健一（医療生命薬学ユニット）

研究分担者：富田純子（医療生命薬学ユニット）、鈴木裕可（医療生命薬学ユニット）

近年、ヒトの腸内細菌叢のメタゲノム解析により、炎症性腸疾患患者は健康人に比べ細菌叢の多様性が乏しく、構成細菌に偏りが見られることが明らかとなってきた。さらに、Bacteroidetes、Proteobacteriaなど、特定のグループに属する菌に有意な増減が認められているが、その詳細については未だ解明されていない部分が多い。*Clostridium*属についても、*C. leptum*および*C. coccooides*は、炎症性腸疾患患者において減少することが報告されており、これらの菌が産生する酪酸は、制御性T細胞の誘導に関与し、炎症に対して抑制的な働きをする可能性が示唆されている。一方で*Clostridium*属には、現在209菌種が分類されており、破傷風菌*C. tetani*、偽膜性大腸炎の原因菌である*C. difficile*など、病原菌も多数属している。そこで、本学部微生物学講座では、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発性炎症性腸疾患モデルマウスのメタゲノム解析を行い、その結果、腸内細菌叢において、グラム陽性菌株*Clostridium* sp. ID4株（以下ID4、図1）など数種の菌が健康マウスに比べ有意に増加していることを明らかとしている。そこで我々は、ヒト結腸癌由来細胞株Caco-2細胞にID4を添加し、種々の炎症性サイトカインのmRNA量を比較したところ、ID4は他の細菌よりも高いmRNAレベルを示したため、本菌種が病態発症の一因となることが予想された。特に、IL-8については、コントロールに比べ1000倍近いmRNA発現量の上昇を示し、これは2 ng/mL IL-1βと比較しても10倍以上強いものであった。

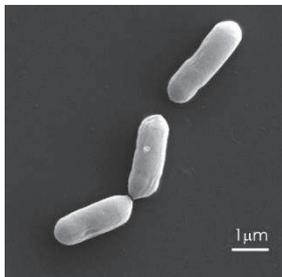


図1. ID4の電子顕微鏡像

1. 炎症誘発物質の探索

菌体において、何が炎症を惹起するか探るため、菌体の培養上清および死菌（UVにより殺菌した菌体）をCaco-2細胞に添加6時間後のIL-8 mRNA量の測定を行った。その結果、顕著なIL-8 mRNA量の増加は認められず、菌体が産生し培養上清中に分泌する二次代謝産物ならびに菌体細胞壁の構成成分は炎症に関与しないと推察された。また、菌体の細胞壁を加水分解後、超遠心分離器により膜画分とサイトゾル画分に分離し、同様の実験を行ったが、IL-8 mRNA量の顕著な増加は認められなかったため、菌体成分の炎症への関与もないと推測された。以上より、炎症の惹起には生きた菌体の存在が不可欠であると考えられた。そこで、ID4が通過しないことを確認したポアサイズ0.4 μmのセルカルチャーインサートを用いた共培養実験を行ったところ、生菌添加時の20%程度のIL-8 mRNA量の増加が認められた（図2）。従って、細胞と生菌の共培養により、初めて菌体が起炎物質を産生し、炎症の発生には菌体との直接の接触は必要ないことが示唆された。そのメカニズムについて、さらなる検証は行っていないが、ID4は細胞（生体）が産生する何らかの信号を受け取ることで起炎物質を産生する可能性が考えられる。（実施者：中島・鈴木）

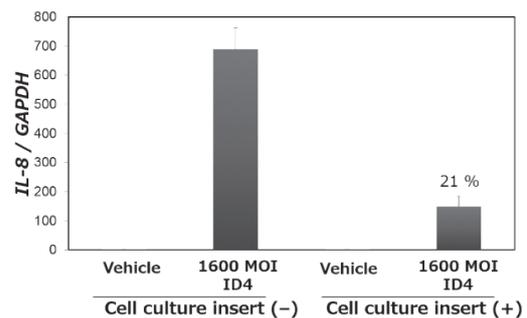


図2. ID4とCaco-2細胞の共培養によるIL-8 mRNA量

2. シグナル伝達経路の探索

炎症惹起における細胞側でのシグナル伝達経路を探るため、NF- κ B阻害剤であるammonium pyroldinedithiocarbamate (PDTC) をID4と共にCaco-2細胞へ添加した。その結果、PDTC処理によりIL-8 mRNA量の増加が抑制された(図3)。

このことから、ID4による炎症惹起にはNF- κ B経路が関与していると推察した。(実施者：鈴木)

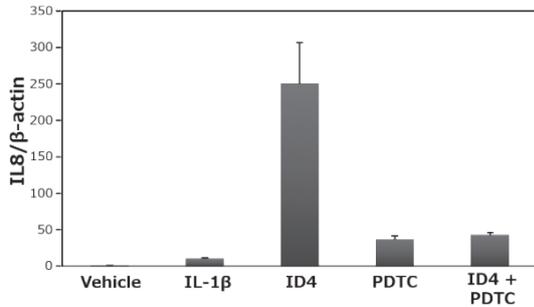


図3. NF- κ B阻害剤によるIL-8 mRNA量の変化

3. 付着性および侵入性の検討

腸管病原性細菌は腸管上皮に接着・侵入する能力を保持しているため、ID4の腸管細胞に対する付着・侵入性を、細胞付着細菌培養法ならびにFISH法による蛍光観察、電子顕微鏡観察にて検証した。比較対象として*Escherichia coli* JCM1649_Tおよび炎症性腸疾患への関与が報告されている*Fusobacterium varium* JCM6320_Tを用いた。

細胞への付着試験では、培養法および電子顕微鏡観察の両方において、ID4は*E. coli*および*F. varium*よりも高い付着性を示すことが観察された(図4、5)。また、FISH法による侵入性試験の結果、細胞に対するID4の高い侵入性が視覚的に確認された。(実施者：富田)

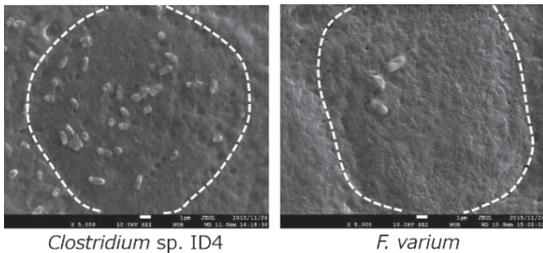


図4. 電子顕微鏡による付着性の観察 JXA-8530F (JEOL)

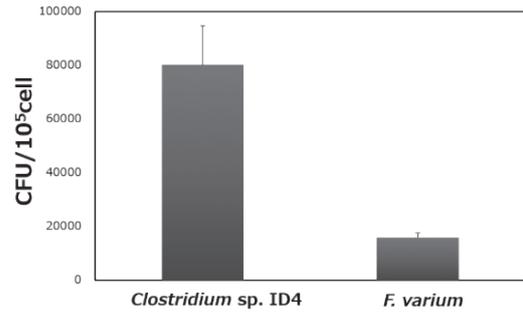


図5. Caco-2細胞に付着した菌量

以上のことから、図6に示すように、ID4は、細胞への高い付着性・侵入性を有し、何らかの起炎物質を産生し、NF- κ B経路を活性化することで炎症が惹起されると予想された。今後、起炎物質の同定と更に詳細なメカニズムの解明が望まれる。

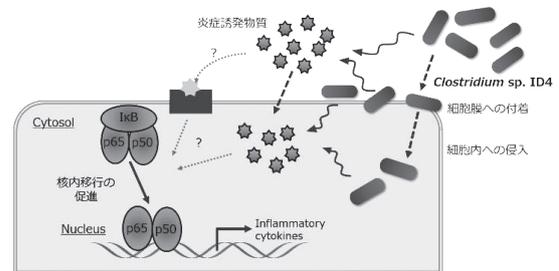


図6. 本研究より推察されたID4による炎症誘発経路

謝辞

愛知学院大学医療生命薬学研究所 医療生命薬学研究助成により、本研究を実施できましたことに深く感謝申し上げます。

研究成果

学会発表

富田純子、中島健一、鈴木裕可、森田雄二、波多野紀行、井上誠、河村好章

腸炎モデルマウス腸内細菌叢に優位に存在する

Clostridium sp. ID4による炎症誘発機構の検討

日本薬学会第136年会、横浜、平成28年3月