

論文審査の要旨

愛知学院大学

報告番号	甲 第 3 号	論文提出者名	久綱 僚
論文審査 担当者	主査 佐藤 雅彦 副査 古野 忠秀 河村 好章		
論文題名	<i>Clostridiaceae</i> 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		

インターネットの利用による公表用

本研究は、発症メカニズムが明らかとなっていない潰瘍性大腸炎（UC）について、発症／悪化への関与が示唆された細菌種の UC モデルマウス病態への影響を検討し、さらに当該菌の分類学的精査を実施したものである。

先行研究として実施したMetagenome解析の結果、健常マウスに比してデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発性UCモデルマウスの糞便における*Clostridium* sp. ID4の有意な増加が見出されたため、当該菌種のマウス病態への関与が示唆された。そこで*Clostridium* sp. ID4をカナダより入手（PAGU 1678として本研究に保存）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および以前にUCモデルマウス病態軽減報告のある*Lactobacillus plantarum* PAGU 1415^Tを比較対照として検討を行った。C57BL/6JマウスをDSS非処理（Normal cont.）群、DSS単独処理（DSS cont.）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）群に分けた。DSS処理群には、1% DSS溶液を自由飲水させることで大腸炎を誘発させ、DSS + 1678群、DSS + 1417群およびDSS + 1415群は、同時に各菌液を経口投与した（ 2×10^9 CFU/mouse/day）。DSS処理開始日をday 0として各菌液投与をday 21まで継続し、1週間おきに各種病態評価ならびに炎症応答等の各種解析を実施した。

DSS + 1415群およびDSS + 1417群では、Normal cont.群に似た体重推移を示した一方、DSS + 1678群では、day 21においてDSS cont.群よりも有意な体重減少が確認された。病態評価の結果、DSS + 1678群は他の群に比して有意な病態評価スコアの上昇がみ

られた。また、DSS cont.群およびDSS + 1678群において実験期間を通じて顕著な大腸の萎縮が観察された。マウス糞便の抽出DNAを用いた変性剤濃度勾配ゲル電気泳動を実施したところ、day 21のDSS + 1678群における構成細菌種数の減少が顕著であった。大腸切片の組織学的解析により、陰窩構造の乱れ、腸細胞の脱落など、DSS + 1678群マウスでの大腸炎の重症化が確認された。大腸内炎症関連因子および炎症性サイトカインmRNAレベルは、DSS + 1678群において上昇傾向がみられ、同時に炎症を負に制御するFoxp3およびSOCS3 mRNAレベルの有意な減少が認められた。これらのことより、マウス腸管恒常性の破綻が示唆された。糞便中の短鎖脂肪酸濃度は、DSS + 1678群において減少傾向を示し、腸管バリア機能の低下が示唆された。大腸内MPOについては、DSS + 1678群において有意に高い濃度が示された。

上述の結果より、DSS + 1678群におけるマウス病態の悪化は明らかであり、*Clostridium* sp. PAGU 1678がUCモデルマウス病態増悪能を有していることが確認された。一般に生体の健康維持に資するとされる*Clostridiaceae*科の中から病態悪化に作用する細菌種が見出されたことから、当該菌種の正確な分類学的位置を確認する目的で精査解析を実施した。

Clostridium sp. PAGU 1678の16S rRNA遺伝子配列に基づく系統解析により、近年*Clostridium*属から*Paraclostridium*属に再分類された*Paraclostridium bifermentans* JCM 1386^T (= PAGU 2008^T)と系統学的に密接に関連していることを見出した (“*P. bifermentans*” PAGU 1678)。そこでさらに、*P. bifermentans* PAGU 2008^Tならび

に系統学的類縁菌種の *P. benzoelyticum* PAGU 2068^Tを比較対照とし精査を行った。

“*P. bifermentans*” PAGU 1678はH₂S産生能、valine利用能、rifampicin、gentamicinおよびchloramphenicolに対する感受性によって、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には2つの基準株にはない極性の異なる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のダブルスポットが、“*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による全菌体タンパク質分析の結果、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。さらに、MALDI-TOF MS解析では、“*P. bifermentans*” PAGU 1678は、他の2つの基準株とは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。“*P. bifermentans*” PAGU 1678および *P. bifermentans* PAGU 2008^T間のDNA-DNA交雑（DDH）相同値は、同じ種としての基準（> 70%）未満である60.03%を示し、この値は同じ種（*P. bifermentans*）に属する“亜種”として定義されている。さらに、各種生化学性状の結果を踏まえ、“*P. bifermentans*” PAGU 1678を *P. bifermentans* の新規亜種として分類すべきであると結論づけ、*P. bifermentans* subsp. *muricolitidis* subsp. nov. を正式に提唱した。

以上の結果より、*Clostridiaceae*科の中からUC病態悪化に作用する単独菌株を見出し、新規亜種として明確に分類することができた。単独菌株であることの利点は、UC病態悪化のトリガーとなる菌体分子の特定が容易になることであり、*P. bifermentans* subsp. *muricolitidis* PAGU 1678^Tによるモデルマウス病態増悪メカニズムを明らかにすることで、UC病態解明に向けて研究を発展させることができると期待され、十分意義があると思われる。

本研究は微生物学及び関連諸学科に寄与するところが大きい。よって本論文は博士(薬学)の学位授与に値するものと判定した。