

# 学位論文内容の要約

愛知学院大学

甲 第 3号	論文提出者 久綱 僚
論文題目  <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	

## 第1章 緒言

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 (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。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糜爛が広がり、種々の炎症関連因子の発現が観察される。患者数は世界規模で増加の一途を辿る現在においても、未だ発症メカニズムは明らかにされておらず、完全な治療方法は確立されていない。

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の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。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、病原性を示す細菌種の存在と、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、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おり、生活環境、食文化、既往歴などに基づく構成細菌種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。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、これまで様々な動物モデルが作製され、腸内細菌と病態との関係性についての研究がされてきた。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。

そこで、UC発症／悪化に関与する細菌種を特定するための先行研究としてMetagenome解析を適用し、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構成細菌の網羅的解析を実施した。そして、健常対照群に比してモデルマウス群における*Clostridium* sp. ID4の有意な増加が見出され、当該菌種がUCモデルマウス病態に大きく関わっていることが予想された。本研究では、UCモデルマウスへ菌液を投与し、各種病態評価ならびに炎症応答に関する各種解析を実施した。さらに、当該菌種の正確な分類学的位置を見極めるため、分類学的手法を用いた精査解析を実施した。

## 第2章 候補菌種による潰瘍性大腸炎モデルマウス病態への影響評価

*Clostridium* sp. ID4をカナダより入手し、*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<sup>T</sup>、以前にUCモデルマウス病態軽減報告のある *Lactobacillus plantarum* PAGU 1415<sup>T</sup>を比較対照として、嫌気的条件下にて培養した。近交系マウスC57BL/6J（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。1週間の飼育慣らし後、DSS + 1678群、DSS + 1417群およびDSS + 1415群に対して各菌液（ $2 \times 10^9$  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、体重測定および病態評価を行い、各群3匹ずつ屠殺解剖によって大腸の長さを確認後、大腸炎の免疫学的解析ならびに組織学的解析を実施した。

DSS + 1415群およびDSS + 1417群では、Normal control群に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。病態評価により、day 21のDSS + 1678群において他の群に比して有意な病態スコアの上昇がみられた。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における大腸の長さは、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。マウス糞便のDGGE解析の結果、各菌液/DSS処理前において各群の糞便細菌構成に差はなく、Normal control群と同様の豊富な腸内フローラが観察された一方、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群における有意な組織学的スコアの上昇がみられ、大腸炎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レベル、Th17細胞の誘導を制御するSOCS3 mRNAレベルの有意な減少が認められ、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、腸管バリア機能の低下が示唆された。大腸内MPOについて、day 21のDSS + 1678群における他の群に比して有意に高いMPO濃度を示し、高レベルの好中球遊走が示唆された。

DSS + 1417群およびDSS + 1415群において、各種解析はDSS control群に比した大腸炎の軽減を示し、*C. butyricum* PAGU 1417<sup>T</sup>および*L. plantarum* PAGU 1415<sup>T</sup>ともに既存の報告と同様のプロバイオティック効果が認められた。一方、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の有するUCモデルマウス病態増悪能が実験的に証明された。

### 第3章 *Clostridium* sp. ID4の分類学的精査

第2章より、UCモデルマウスを含む生体の健康維持に資する細菌群として知られる*Clostridiaceae*科の中から、病態悪化に作用する*Clostridium* sp. ID4の存在が見出された。当該菌種の16S rRNA遺伝子に基づく系統解析の結果、近年*Clostridium*属から*Paraclostridium*属に再分類された*Paraclostridium bifermentans* ATCC 638<sup>T</sup>と系統学的に密接に関連していることが確認された。临床上重要となる当該“*P. bifermentans*” PAGU 1678の正確な分類学的位置を確認することを目的として、*P. bifermentans* PAGU 2008<sup>T</sup> (=JCM 1386<sup>T</sup>) および*P. benzoelyticum* PAGU 2068<sup>T</sup> (=LMG 28745<sup>T</sup>) と併せて表現型、生化学性状、全菌体タンパク質、遺伝学的特性に基づく分類学的精査を実施した。

“*P. bifermentans*” PAGU 1678はH<sub>2</sub>S産生能、valine利用能、rifampicin、gentamicinおよびchloramphenicolに対する感受性によって他の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<sup>T</sup>および*P. benzoelyticum* PAGU 2068<sup>T</sup>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<sup>T</sup>および*P. benzoelyticum* PAGU 2068<sup>T</sup>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<sup>T</sup>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<sup>T</sup>および*P. benzoelyticum* PAGU 2068<sup>T</sup>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。

さらに“*P. bifermentans*” PAGU 1678および*P. bifermentans* PAGU 2008<sup>T</sup>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%を示し、この値は同じ種 (*P. bifermentans*) に属する“亜種”として明確に定義されている。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. PAGU 1678<sup>T</sup> (= CCUG 72489<sup>T</sup> = NBRC 113386<sup>T</sup>)を正式に提唱した。

## 第4章 結論

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* subsp. *muricolitidis* PAGU 1678<sup>T</sup>菌液投与では明確な炎症反応を確認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* subsp. *muricolitidis* PAGU 1678<sup>T</sup>による過剰な免疫反応が生じていることが予想される。

本研究により、*Clostridiaceae*科の中からUC病態悪化に作用する単独菌種を見出し、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る。*P. bifermentans* subsp. *muricolitidis* PAGU 1678<sup>T</sup>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進展させていきたいと考えている。

### 【研究結果の掲載誌】

1. Kutsuna R, Tomida J, Morita Y, Kawamura Y. *Paraclostridium bifermentans* exacerbates pathosis in a mouse model of ulcerative colitis. *PLoS ONE*, 2018; **13**: e0198668
2. Kutsuna R, Akiyama T, Mori K, Hayashi M, Tomida J, Morita Y, Tanaka K, Kawamura Y. Description of *Paraclostridium bifermentans* subsp. *muricolitidis* subsp. nov., emended description of *Paraclostridium bifermentans* (Sasi Jyothsna et al., 2016), and creation of *Paraclostridium bifermentans* subsp. *bifermentans* subsp. nov. *Microbiology and Immunology*, 2019; **63**: 1–10