

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：32676

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07253

研究課題名（和文）大腸アクアポリンの機能解析を基軸とした下痢に対するプロバイオティクスの効果の検証

研究課題名（英文）Effect of probiotics on diarrhea focusing on aquaporin in the colon

研究代表者

今 理紗子（Risako, Kon）

星薬科大学・先端生命科学研究所・特任助教

研究者番号：90779943

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、大腸における水チャネル「アクアポリン（AQP）」に着目し、プロバイオティクスの有効性や特徴について科学的に検証することを目的とした。ラットに抗生物質を投与すると、糞中水分量の増加に伴って大腸AQP3の発現量が低下し、これは腸内細菌量が低下したことに起因することがわかった。さらに、抗生物質関連下痢症モデルラットに対するプロバイオティクスの効果を調べたところ、*Bifidobacterium infantis*には下痢改善作用は認められなかったのに対して、*Bifidobacterium longum*は抗生物質による下痢およびAQP3の発現低下を回復させることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、腸内細菌は大腸AQP3の発現量を制御しており、プロバイオティクスの特徴を説明する上で、大腸AQP3の発現や機能がバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。今後、詳細な解析を行うことにより、プロバイオティクスの特徴や有効かつ安全な使用方法について社会に明示できるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to clarify the effectiveness and characteristics of probiotics, focused on the water channel “aquaporin (AQP)” in the colon. When the antibiotic was administered to rats, it was found the expression level of AQP3 decreased with increasing fecal water content. This action was not influenced by the antibiotic itself but occurs with a decrease in the amount of intestinal microbiota. Furthermore, the effect of probiotics on antibiotic-associated diarrhea was examined. As a result, *Bifidobacterium infantis* had not effect, whereas *Bifidobacterium longum* improved diarrhea and decreasing AQP3 by antibiotics administration.

研究分野：消化管

キーワード：プロバイオティクス 腸内細菌 アクアポリン 下痢

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸内には **1000** 種を超える細菌が存在し、腸内細菌叢を構成している。近年、腸内細菌叢は宿主(ヒト)の生理機能と密接に関与していることが明らかになりつつあり、腸内細菌叢の恒常性を保持することは、ヒトの健康を維持する上で非常に重要であるものと考えられている。

プロバイオティクスは、腸内細菌叢のバランスを維持するための手段として利用される生細菌の一種である。現在、プロバイオティクスはヨーグルトなどの食品や健康食品、医薬品等として多く上市されており、その効果は臨床試験により高く評価されている。しかしながら、プロバイオティクスがどのようにして腸内環境を整えるのか、そのメカニズム解析は十分ではない。特に、プロバイオティクスの菌種の違いによる効果の違いや特徴、選択方法などに関する情報はほとんどみられない。そのため、プロバイオティクスは話題性や経験則に基づいて選択されることが多く、健康効果が得られないこともしばしば報告されていた。

申請者はこれまでに、腸内細菌が最も多く存在する大腸において、水チャンネル『アควアポリン(AQP)』が存在しており、AQPの発現量や機能が便の水分量を規定する重要な因子であることを明らかにした。腸内細菌叢のバランスが乱れた場合には、下痢や便秘が認められることから、申請者は、腸内細菌と大腸AQPには密接な関係があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

上述した背景のなか、申請者は腸内細菌叢の変動と大腸AQPとの関係が明確になれば、AQPの発現量や機能をバイオマーカーとして、プロバイオティクスの有効性や特徴について科学的に言及できるのではないかと考えた。そこで本研究では、大腸に存在する水チャンネルAQPと腸内細菌との相互作用を解析するなかで、AQPを指標として、プロバイオティクスの作用メカニズムについて明らかにすることにより、プロバイオティクスの有効かつ安全な使用法を医療従事者や消費者に提示することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腸内細菌叢の変動に伴う下痢発症時における大腸AQPの役割の検討

腸内細菌叢の変動に伴う下痢症モデルを作製し、下痢の発症における大腸AQPの役割を解析した。具体的には、抗菌スペクトルが異なる種々の抗生物質(シプロフロキサシン、バンコマイシン、クラリスロマイシン)をラットに6日間連続投与し、糞中水分量をはじめとした排便スコアを算出することで下痢の程度を評価した。また、このときの大

腸を摘出し、AQPのmRNAおよびタンパク質発現量を解析した。

(2) 腸内細菌による大腸AQPの発現変動メカニズムの解析

抗生物質を投与したラットの大腸におけるAQPの発現変動パターンと符合する腸内細菌群の選定を試みた。具体的には、腸内細菌叢の変動パターンについて次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を行った。また、抗生物質関連下痢症の発症に関わる遺伝子を抽出する目的で、DNAマイクロアレイにより遺伝子発現を網羅的に解析した。

(3) 抗生物質関連下痢症に対するプロバイオティクスの効果

抗生物質関連下痢症に対するプロバイオティクスの効果を調べるとともに、そのメカニズムについてAQPに焦点をあて解析した。具体的には、シプロフロキサシン誘発下痢モデルラットに、プロバイオティクス *Bifidobacterium infantis* あるいは *Bifidobacterium longum* を投与し、下痢の程度を評価した。また、これらラットの大腸におけるAQPの発現量を解析した。

4. 研究成果

(1) 腸内細菌叢の変動に伴う下痢発症時における大腸AQPの役割の検討

ラットにシプロフロキサシン、バンコマイシンあるいはクラリスロマイシンを投与すると、いずれの抗生物質によっても糞中水分量が増加し、このとき大腸におけるAQP3の発現量は有意に低下することがわかった。また、抗生物質の種類によって糞中水分量および大腸AQP3の発現変化に差異が認められた。最も変化が著しかったシプロフロキサシン投与群を用いて以後解析したところ、糞中水分量およびAQP3の変化は、シプロフロキサシン投与1日目から生じ、投与期間中は持続していることがわかった(図1)。この糞中水分量の増加とAQP3の発現低下にはよい相関がみられた。以上のことから、抗生物質に

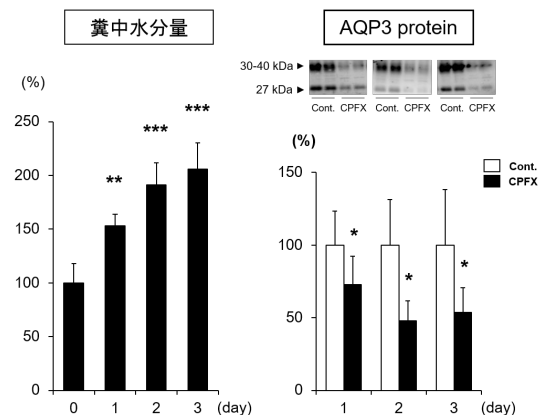


図1. シプロフロキサシン投与時の糞中水分量および大腸AQP3の発現量の変化

より下痢が発症した際には、大腸 **AQP3** の発現量が低下することがわかった。

(2) 腸内細菌による大腸 **AQP** の発現変動メカニズムの解析

抗生物質関連下痢症における大腸 **AQPs** の発現変化が腸内細菌によるものかどうかを調べるために、まず、シプロフロキサシン投与時の腸内細菌量を解析した。その結果、シプロフロキサシン投与 1 日目からビフィズス菌量などが著明に低下し、総細菌量も有意に低下していることがわかった。なお、**HT-29** 細胞にシプロフロキサシンを添加し、3 日間培養しても **AQP3** の発現量に変化は認められなかった(図 2)。これらのことから、抗生物質投与時の大腸 **AQP** の変化は腸内細菌の変化によって生じているものと考えられた。そこで、**AQP** と関わりの深い腸内細菌を同定するために、腸内細菌叢パターンを次世代シーケンサーにより解析した結果、抗生物質の種類により腸内細菌叢の変動パターンが異なることがわかった。また、大腸の遺伝子発現について **DNA** マイクロアレイにより調べたところ、抗生物質の処置により遺伝子発現も大きく変化していることがわかった。しかしながら、これらモデルラットの情報のみでは、**AQP** と関わりが深い腸内細菌を同定することはできなかった。

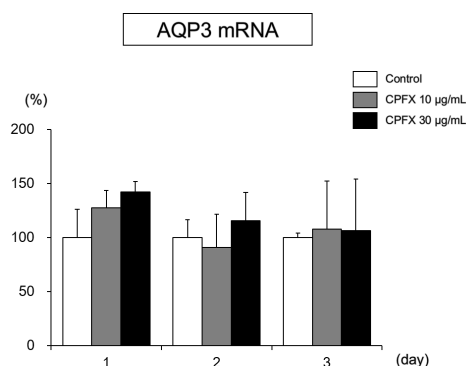


図2. HT-29細胞にシプロフロキサシンを添加した際の **AQP3** の発現量の変化

(3) 抗生物質関連下痢症に対するプロバイオティクスの効果

抗生物質関連下痢症に対するプロバイオティクス *Bifidobacterium longum* および *Bifidobacterium infantis* の効果を調べた。シプロフロキサシン誘発下痢モデルラットに *Bifidobacterium infantis* を投与しても、下痢および大腸 **AQP3** の発現低下はほとんど改善されなかった。これに対して、*Bifidobacterium longum* を投与した場合には、シプロフロキサシンによる下痢が改善するとともに、**AQP3** の発現低下も回復することがわかった。以上のことから、腸内細菌の低下による下痢に対して、有効なプロバイオティクスが異なることがわかった。また、下痢の改善効果と大腸 **AQP3** の発現変化には

相関があったことから、プロバイオティクスの効果を評価する上で、**AQP3** の発現変化が有用である可能性が示唆された。

本研究の結果から、腸内細菌は大腸 **AQP3** の発現量を制御しているものと考えられた。また、プロバイオティクスの特徴を説明する上で、大腸 **AQP3** の発現や機能がバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。今後は、どの腸内細菌が **AQP** を制御しているのかについて詳細な解析を行うことにより、腸内細菌と大腸 **AQP** との関係がより明確となり、プロバイオティクスの特徴や使用方法についても明示できるものと考えている。

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 11 件)

1. Risako Kon, Miho Yamamura, Tetsuya Fujikawa, Takefumi Uemura, Yoshiki Kusunoki, Nobutomo Ikarashi and Kiyoshi Sugiyama. Laxative action of sennoside A, which causes decreased colonic aquaporin-3 expression, is controlled by the anti-inflammatory effect of glycyrrhizin. *Trad. Kampō Med.*, 5, 45-50, 2018
2. Risako Kon, Miho Yamamura, Yukari Matsunaga, Hiroshi Kimura, Moe Minami, Saki Kato, Nobutomo Ikarashi and Kiyoshi Sugiyama. Laxative effect of repeated Diokanzoto is attributable to decrease in aquaporin-3 expression in the colon, *J. Nat. Med.*, 72, 493-502, 2018
3. Risako Kon, Yuika Tsubota, Moe Minami, Saki Kato, Yukari Matsunaga, Hiroshi Kimura, Yuta Murakami, Tetsuya Fujikawa, Ryoya Sakurai, Rei Tomimoto, Yoshiaki Machida, Nobutomo Ikarashi and Kiyoshi Sugiyama. CPT-11-induced delayed diarrhea develops via reduced aquaporin-3 expression in the colon, *Int. J. Mol. Sci.* 19, E170, 2018 (doi:10.3390/ijms19010170)

[学会発表](計 7 件)

1. 今理紗子、松永由香里、木村博、皆見萌、加藤咲、山村美保、五十嵐信智、杉山清、「大黄甘草湯を連続使用した際の瀉下効果の検証」日本薬学会第 138 年会、2018
2. 今理紗子、五十嵐信智、松永佑香里、皆見萌、木村博、加藤咲、杉山清、「大腸アキュアポリンを指標とした大黄甘草湯における甘草の役割解析」第 34 回和漢

- 医薬学会学術大会、**2017**
3. 今理紗子、五十嵐信智、坪田結香、皆見萌、松永佑香里、加藤咲、木村博、杉山清、「イリノテカン誘発遅発性下痢モデルにおける大腸アクアポリンの役割」第**25**回クリニカルファーマシーシンポジウム、**2017**

〔図書〕(計**0**件)

〔産業財産権〕

取得状況(計**1**件)

名称：アクアポリンを指標とする腸内細菌叢の変化を検出する方法

発明者：五十嵐信智、今理紗子

権利者：星薬科大学

種類：特許

番号：**6943360**

出願年月日：**2017**年**9**月**4**日

国内外の別：国内

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

今理紗子 (**Kon Risako**)

星薬科大学・先端生命科学研究所・特任助教

研究者番号：**90779943**

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

五十嵐 信智 (**Ikarashi Nobutomo**)

星薬科大学・薬動学教室・講師