

令和元年6月21日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08279

研究課題名(和文) 腸内細菌に応答する膜タンパク質を標的とした消化管疾患に対する新規治療戦略

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategies for gastrointestinal diseases targeting membrane proteins responsive to gut microbiota

研究代表者

五十嵐 信智 (IKARASHI, NOBUTOMO)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40409363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸内細菌と大腸の水チャネル「アクアポリン(AQP)」との関係について明らかにすることを目的とした。その結果、腸内細菌が大腸のAQP3の発現量をコントロールしていることがわかった。また、下剤やプレバイオティクスによる便秘改善効果に、腸内細菌によるAQPの発現調節が関与していることが明らかとなった。本結果は、腸内細菌の変動に伴う消化管疾患の新たな治療法や予防法に関して、有益な知見となり得ると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、過敏性腸症候群などの消化管疾患患者が増加の一途をたどっており、社会的に問題となっている。これら疾患の発症には腸内細菌の異常が関与していると考えられているが、その詳細は不明であった。本研究結果から、便の濃縮に重要な機能分子アクアポリンが、腸内細菌によって制御されていることが明らかとなった。本結果は、上述した消化管疾患に対する新たな治療法・予防法を提案する上で重要な知見となり得る。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the relationship between intestinal microbiota and water channel "Aquaporin (AQP)" in the large intestine. It was found that microbiota control the expression level of AQP3 in the large intestine. In addition, it has become clear that regulation of AQP expression by microbiota is involved in ameliorating constipation by laxatives and prebiotics. The present results are considered to be useful findings regarding new treatments and prevention methods for gastrointestinal tract diseases associated with variations in microbiota.

研究分野：生体分子薬理学

キーワード：腸内細菌 アクアポリン 大腸

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、過敏性腸症候群や炎症性腸疾患などの消化管疾患患者が増加の一途をたどっており、社会的に大きな問題となっている。これらの疾患の発症には腸内細菌叢の異常が関与していると考えられており、これまでに関連菌種などが同定されつつある。しかし、これら消化管疾患の発症に腸内細菌がどのように関与しているのかについての詳細は、いまだ不明な点も多く、疾患発症までのプロセス(機能分子)を把握することが、治療戦略を立てる上で重要となる。このような背景の中、我々は、腸内細菌叢の異常により消化管疾患が発症する際には、主症状として必ず下痢や便秘が認められることに着目し、腸管での水輸送を担う機能分子「アキュアポリン(AQP)」がこれら疾患の発症に関与しているのではないかと考えた。

AQPは膜タンパク質の一つであり、我々はこれまでに、腸内細菌が多く存在する大腸において、AQP3が優位に発現していることを明らかにした。また、大腸におけるAQP3の発現量や機能の変化が便の水分量を変動させる極めて重要な因子となっていることを見出した。しかしながら、大腸AQP3の発現制御機構については依然不明な点が多く残っており、特に腸内細菌との関わりについては全くわかっていなかった。

### 2. 研究の目的

我々は、上述した背景のもと、大腸におけるAQP3の発現制御メカニズム、特に腸内細菌との関わりについて明らかになれば、下痢や便秘をはじめとした種々の消化管疾患に対して、今までにない新たな治療戦略が立てられるのではないかと、この着想に至った。そこで本研究では、消化管疾患に対する新規治療法・予防法の開発を目指すに先立ち、腸内細菌の変動に伴う下痢や便秘の発症における大腸AQP3の役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 大腸におけるAQPの発現に及ぼす腸内細菌の影響の検討

腸内細菌が存在しないGFラットおよび腸内細菌が存在するSPFラットを購入し、糞中水分量を測定するとともに、大腸におけるAQP3の発現量をリアルタイムRT-PCRおよびウェスタンブロッティングにより解析した。また、抗生物質シプロフロキサシンをラットに投与し、糞中水分量および大腸AQP3の発現量を測定するとともに、腸内細菌量をリアルタイムPCRにより解析した。

#### (2) プレバイオティクスによる便秘改善効果の検証

プレバイオティクスをラットに連続経口投与し、糞中水分量および大腸AQP3の発現量を調べた。また、大腸におけるタイトジャンクション関連タンパク質の発現量を解析した。

#### (3) 「大黃甘草湯」の下剤効果における大腸AQP3および腸内細菌の役割の検証

大黃あるいは大黃甘草湯をラットに単回あるいは連続経口投与し、糞中水分量および大腸AQP3の発現量を調べた。また、血中胆汁酸濃度を測定するとともに、腸内細菌叢を次世代シーケンサーにより解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 大腸におけるAQPの発現に及ぼす腸内細菌の影響の検討

AQPはヒトにおいて、AQP0からAQP12までの13種類が様々な組織に発現している。腸管には多数のAQPファミリーの発現が認められており、これまでに少なくともAQP1、AQP2、AQP3、AQP4、AQP7、AQP8、AQP9、AQP10の8種類の存在が知られている。本研究ではまず、腸内細菌が多く存在する大腸に焦点を当て、腸内細菌とAQPの発現量との関係について調べた。具体的には、腸内細菌が存在しないGFラットと腸内細菌が存在するSPFラットについて、大腸のAQPの発現量を網羅的に解析した。その結果、大腸の粘膜上皮細胞に優位に発現し、便の水分量をコントロールしているAQP3の発現量は、GFラットではSPFラットに比べて有意に低下していることがわかった(右図)。また、この際、GFラットの糞中水分量はSPFラットに比べて有意に高かった。したがって、腸内細菌が大腸のAQP3の発現量を制御し、便の濃縮に影響を及ぼす可能性が考えられた。

次に、正常ラットに抗生物質シプロフロキサシンを投与し、腸内細菌量を低下させた際の糞中水分量および大腸AQP3の発現量を解析した。その結果、シプロフロキサシン投与群の糞中水分量は、コントロール群と比べて有意に高く、この際、大腸AQP3のタンパク質発現量は有意に低下することがわかった。なお、結腸がん由来HT-29細胞にシプロフロキサシンを添加しても、AQP3の発現量には変化がなかったことから、シプロフロキサシンをラットに投与した際に認められたAQP3の発現低下は、大腸に対するシプロフロキサシンの直接作用ではなく、腸内細菌叢の変化に起因している可能性が考えられた。

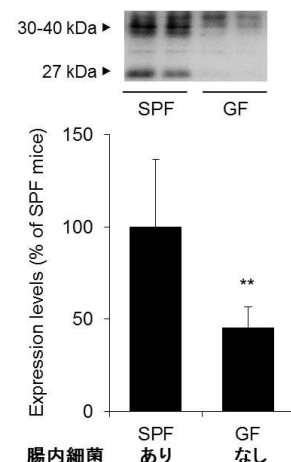


図. 腸内細菌の有無による大腸AQP3発現変化

以上の結果から、腸内細菌が大腸 AQP3 の発現量を制御していること、ならびに腸内細菌の変動に伴う下痢が大腸 AQP3 の発現低下を介して引き起こされることが明らかとなった。

### (2) プレバイオティクスによる便通改善効果の検証

プレバイオティクスは、腸内細菌に作用し、生体に有益な効果を発揮することが謳われている。しかしながら、その詳細なメカニズムについては、不明な点が多く残っていた。そこで、プレバイオティクスの作用メカニズムについて、大腸 AQP3 に焦点を当て、解析を行った。プレバイオティクス投与群の糞中水分量は、コントロール群と比べて有意に増加し、この際の大腸における AQP3 のタンパク質発現量は、コントロール群と比べて有意に低下していた(右図)。なお、糞中水分量の増加に大きく関与することが知られているタイトジャンクション関連タンパク質の発現量には変化が認められなかった。以上のことから、本研究で用いたプレバイオティクスは大腸の AQP3 の発現量を低下させ、腸管内から血管側への水の移動を抑制することにより、便秘を改善する作用を有するものと考えられた。

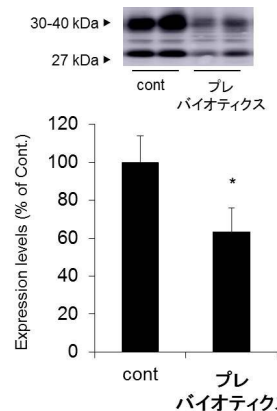


図. プレバイオティクスを処置した際のラット大腸におけるAQP3のタンパク質発現量

### (3) 「大黃甘草湯」の下剤効果における大腸 AQP3 および腸内細菌の役割の検証

ここまでの結果から、腸内細菌が大腸の AQP3 の発現量を制御し、便の濃縮機構に重要な役割を担っていることが明らかとなった。そこで、腸内細菌の作用を介して活性を示す下剤「大黃甘草湯」とその活性生薬「大黃」を用いて、その薬理活性を調べる中で、大腸 AQP3 と腸内細菌との関係性について種々検討した。ラットに大黃あるいは大黃甘草湯を単回投与したところ、いずれの場合においても糞中水分量が著明に増加し、この際、大腸における AQP3 の発現量が有意に低下することが明らかとなった。したがって、大黃および大黃甘草湯は大腸 AQP3 の発現低下を介して、瀉下活性を発揮していることがわかった。一方、大黃単剤を連続投与した際には、糞中水分量の有意な増加は見られず、AQP3 の発現低下も認められなかった。これに対して、ラットに大黃甘草湯を 7 日間連続投与した際には、瀉下活性が維持されているとともに、AQP3 の発現低下も維持されていた(右図)。したがって、大黃甘草湯は甘草が配合されたことにより、大黃単剤とは異なり、連続投与した際にも瀉下作用が維持されることがわかった。また、この理由として、大腸 AQP3 の発現低下が維持されていることが重要である可能性が考えられた。

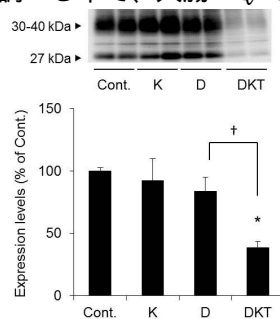


図. 甘草(K)、大黃(D)あるいは大黃甘草湯(DKT)を7日間投与した際のラット大腸AQP3のタンパク質発現量

それではなぜ、大黃甘草湯は連続投与しても AQP3 の低下が維持されたのか。これまで、A) 血中および糞中胆汁酸量の増加あるいは組成の変化が下痢の発症に関与していること<sup>1)</sup>、B) 胆汁酸をラットに投与すると下痢が発症し、この際、大腸 AQP3 の発現量が低下すること<sup>2)</sup>、C) 胆汁酸誘発性の下痢が発症した際には、血中の胆汁酸濃度が増加すること<sup>3)</sup>が報告されている。これらの知見から、大黃甘草湯を連続投与した際には、何らかの原因により胆汁酸の量あるいは組成が変化し、大腸 AQP3 の発現低下が維持された可能性が考えられた。そこで、大黃甘草湯を投与した際の血中総胆汁酸濃度を測定し、大黃単剤投与群と比較した。ラットに大黃単剤連続投与した際の血中総胆汁酸濃度は、コントロール群との間に差は認められなかった。これに対して、大黃甘草湯を連続投与した場合の血中総胆汁酸濃度は、コントロール群と比べて有意に増加した。以上のことから、大黃甘草湯は胆汁酸濃度の増加により、大腸 AQP3 の発現量が低下し、瀉下作用が維持されている可能性が考えられた。

胆汁酸の量や組成は、*Lactobacillus*、*Bacteroides*、*Bifidobacterium* などの腸内細菌の変化によって大きく変動することが知られている<sup>5-8)</sup>。そこで次に、大黃甘草湯を連続投与した際の腸内細菌叢を次世代シーケンサーにより解析し、大黃単剤投与群と比較することにより、血中総胆汁酸濃度が上昇した理由について考察した(右図)。大黃甘草湯を 7 日間連続投与した際には、*Lactobacillaceae* が約 50% を占め、次いで *Lachnospiraceae*

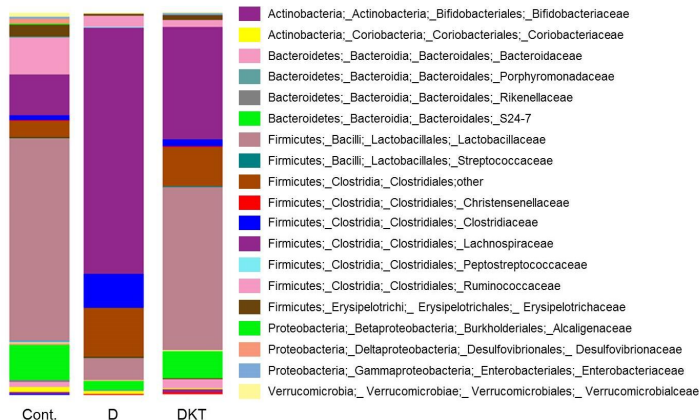


図. 大黃(D)あるいは大黃甘草湯(DKT)を7日間投与した際の腸内細菌叢の変化

が多かった。これらで菌全体の約 70%を占めており、これはコントロール群とほぼ同様であった。これに対して、大黃単剤を連続投与すると *Lachnospiraceae* の割合が全体の約 65%を占め、*Lactobacillaceae* は著明に低下し、大黃甘草湯を投与した場合と比較して、菌叢パターンが大きく変動していることがわかった。*Bacteroidaceae* の占有率は、大黃甘草湯を 7 日間連続投与した場合にはコントロール群と比べて約 2 倍増加していたのに対して、大黃単剤を連続投与した際には約 1/10 であった。また、*Bifidobacteriaceae* の占有率は、大黃甘草湯を連続投与した際にはコントロール群と同程度であったのに対し、大黃単剤を連続投与した場合には低下していることがわかった。以上のことから、大黃単剤を連続投与した場合には、主要な菌のパターンが大きく変動していたのに対し、大黃甘草湯を連続投与した際にはコントロール群と同程度であることが明らかになった。

以上の結果から、大黃甘草湯は甘草が配合されたことにより、腸内細菌叢の恒常性が維持され、これにより胆汁酸濃度が上昇し、大腸 AQP3 の発現低下が維持できた可能性が示唆された。

#### 引用文献

- 1) Camilleri M. Bile Acid diarrhea: prevalence, pathogenesis, and therapy. *Gut Liver*, **9**, 332-339 (2015).
- 2) Yde J, Keely S, Wu Q, Borg JF, Lajczak N, O'Dwyer A, Dalsgaard P, Fenton RA, Moeller HB. Characterization of AQPs in Mouse, Rat, and Human Colon and Their Selective Regulation by Bile Acids. *Front. Nutr.*, **3**, 46 (2016).
- 3) Demers LM, Lloyd-Still JD. Serum bile acid levels in protracted diarrhea of infancy. *Am. J. Dis. Child.*, **132**, 1001-1003 (1978).
- 4) Gilliland SE, Speck ML. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 15-18 (1977).
- 5) Islam KB, Fukiya S, Hagio M, Fujii N, Ishizuka S, Ooka T, Ogura Y, Hayashi T, Yokota A. Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology*, **141**, 1773-1781 (2011).
- 6) Jarocki P, Podlesny M, Glibowski P, Targonski Z. A new insight into the physiological role of bile salt hydrolase among intestinal bacteria from the genus *Bifidobacterium*. *PLoS One*, **9**, e114379 (2014).
- 7) Jones BV, Begley M, Hill C, Gahan CG, Marchesi JR. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 13580-13585 (2008).
- 8) Masuda N. Deconjugation of bile salts by Bacteroids and Clostridium. *Microbiol. Immunol.*, **25**, 1-11 (1981).

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Nobutomo Ikarashi, Risako Kon, and Kiyoshi Sugiyama, Aquaporins in the colon as a new therapeutic target in diarrhea and constipation, *International Journal of Molecular Sciences*, **17**, 1172, doi: [10.3390/ijms17071172](https://doi.org/10.3390/ijms17071172) (2016), 査読あり.

Risako Kon, Miho Yamamura, Yukari Matsunaga, Hiroshi Kimura, Moe Minami, Saki Kato, Nobutomo Ikarashi, and Kiyoshi Sugiyama, Laxative effect of repeated Daiokanzoto is attributable to decrease in aquaporin-3 expression in the colon, *Journal of Natural Medicines*, **72**, 493-502, doi: [10.1007/s11418-018-1174-1](https://doi.org/10.1007/s11418-018-1174-1) (2018), 査読あり.

〔学会発表〕(計 3 件)

今理紗子、松永佑香里、木村 博、皆見 萌、加藤 咲、山村美保、五十嵐信智、杉山 清、大黃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 年

今理紗子、大黃甘草湯の瀉下作用における甘草の役割解析～連続使用した際の瀉下効果の検証～、第 35 回和漢医薬学会学術大会、2018 年

今理紗子、松永佑香里、木村 博、皆見 萌、加藤 咲、山村美保、五十嵐信智、杉山 清、大黃の瀉下作用に及ぼす甘草の影響、日本生薬学会第 65 回年会、2018 年

〔産業財産権〕

○出願状況 (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：特許願 2017-169760 号

出願年：2017 年

国内外の別： 国内

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：今 理紗子

ローマ字氏名：( KON, Risako )

所属研究機関名：星薬科大学

部局名：薬学部

職名：特任講師

研究者番号 ( 8 桁 ) : 90779943

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。