

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00929

研究課題名(和文) シンバイオテイクスによる乾癬の予防・治療に関する研究

研究課題名(英文) Glutamine, polydextrose, lactulose and Bifidobacterium lungum exert symbiotic effects on imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in rats.

研究代表者

久保 薫 (KUBO, KAORU)

奈良県立医科大学・医学部・教育教授

研究者番号：20254493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：グルタミン、ポリデキストロース、ラクチュロースとBifidobacterium lungumを各々2%、3.2%、3%、5%含む飼料を8週間給餌することによりイミキモド軟膏塗布により惹起される皮膚炎が有意に抑制され、また盲腸内のFirmicutes門に対するBacteroidetes門の組成比率が改善され、糞便中の酢酸濃度と酪酸濃度が有意に上昇した。8週間の煙草喫煙は、この皮膚炎にほとんど影響しなかった。今回の実験系では乾癬への煙草喫煙の影響は明らかにはできなかった。以上、腸内細菌叢の改善を介したシンバイオテイクスによる乾癬の改善の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬の原因は未だ不明であるが、遺伝因子(自己免疫反応)を背景に、内的因子(主に肥満、糖尿病、高脂血症)と外的因子(主に喫煙)により、発症・悪化する難治性の慢性炎症性皮膚疾患であり、紅斑、痒み、リウマチ様関節炎などの症状は患者のQOLを著しく低下させる。本研究では、栄養素(グルタミン・ポリデキストロース・ラクチュロース)並びにビフィズス菌の混合物(GFOB)の摂取により、腸内の自然免疫を改善し、全身における自然治癒力、抗炎症能を高めることによる乾癬の発症と進行の抑制、治癒の可能性を探索することである。GFOBは扱い易く、安全性が高く、更なる研究開発により食品や医薬製造分野への応用が可能と考える。

研究成果の概要(英文)：Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation was significantly inhibited by taking the diet including 2% glutamine, 3.2% polydextrose, 3% lactulose and 5% Bifidobacterium lungum for 8 weeks. This diet intake improved a reduced Firmicutes to Bacteroidetes ratio in cecal content and significantly raised an acetic acid concentration and a butyric acid concentration in feces. The 8-week cigarette smoking exposure hardly influenced this skin inflammation. We were not able to make the influence of the cigarette smoking on psoriasis clear in this experiment system. The above-mentioned results suggested improvements of psoriasis by symbiotic effects of glutamine, polydextrose, lactulose and Bifidobacterium lungum via improving an intestinal dysbiosis.

研究分野：実験動物学、薬理学

キーワード：乾癬 喫煙 シンバイオテイクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乾癬の原因は未だ不明であるが、遺伝因子(自己免疫反応)を背景に、内的因子(主に肥満、糖尿病、高脂血症)と外的因子(主に喫煙)により、自己免疫反応から発症・悪化する難治性の慢性炎症性皮膚疾患であり、紅斑、痒み、リウマチ様関節炎などの症状は患者のQOLを著しく低下させる。日本皮膚科学会では、外用療法、光線療法又は内服療法に加え生物学的製剤の使用が治療方針として推奨されている。一方、腸内細菌叢の制御により肥満、糖尿病の治療が進展しているが、腸内細菌叢を介した乾癬の予防と治療法の開発、更には喫煙を背景とした乾癬に関する研究は着手されていない。

申請者は疾患モデル研究から、以下の研究成果を得ている。

アジュバント関節炎の好発系統である Lewis 系ラットに栄養素(グルタミン、ポリデキストロース、ラクチュロース)と *Bifidobacterium lungum* の混合物(GFOB)を添加した飼料を8週間給餌した後に、アジュバント関節炎を惹起すると、通常飼料ならびにセルロース欠乏飼料に比べて免疫応答による後肢の腫脹が有意に軽減された。加えて糖尿病や肥満と同様に Bacteroidetes 門と Firmicutes 門の不均衡が認められたが、GFOB はこの不均衡を改善し、また有機酸の産生に關与する Actinobacteria 門の占有率(%)が有意に増加した。よって、GFOB の摂取は腸内細菌叢を正常化し、腸管免疫機構を介して自己免疫疾患を改善するものと推察された。(平成26~28年度:基盤研究(C)「シンバイオテイクスによる慢性関節リウマチの予防・治療に関する研究」)。

自然発症高血圧ラットに8週間の煙草喫煙曝露を実施すると、腸内細菌の代謝物で腸内環境維持に重要な役割を果たす短鎖脂肪酸やビフィズス菌が減少した(Tomoda K, Kubo K, et al. J. Toxicol. Sci. 2011)。

自然発症高血圧ラットに8週間の喫煙曝露とともにセルロース欠乏飼料で飼育すると、血中抗酸化ストレス活性が低下し(Tomoda K, Kubo K, et al J. Toxicol. Sci. 2012.) 肺気腫と骨粗鬆症が発症した。これら肺気腫と骨粗鬆症は、煙草喫煙曝露と共に5%GFO®(グルタミン、食物繊維とオリゴ糖を含む補助栄養食品、大塚製薬)と1%ビフィズス菌末 BB536 (*Bifidobacterium lungum*, 森永乳業)を添加したセルロース欠乏飼料を摂取することにより改善した(特許実用出願 2013年3月31日)。

2. 研究の目的

本研究は、乾癬と腸内環境、更には喫煙の関連性を明確にし、GFOB による腸内細菌制御を介した乾癬の根治的な予防と治療法の開発を目的し、栄養素(グルタミン、食物繊維、オリゴ糖)とビフィズス菌の組成率、濃度と摂取期間を検討した。

3. 研究の方法

(1)プロトコール

イミキモド軟膏塗布により誘発される乾癬様皮膚炎に対するグルタミン、食物繊維、オリゴ糖とビフィズス菌の改善効果、煙草喫煙の影響および煙草喫煙の影響に対するグルタミン、食物繊維、オリゴ糖とビフィズス菌の効果を明らかにする目的で以下の実験系を設定した。

Lewis 系ラットならびに Wistar 系ラットにおいてイミキモド軟膏塗布による乾癬様皮膚炎を惹起し、その程度を比較検討した。

通常飼料(AIN-93G)、セルロース欠乏飼料あるいはグルタミン、食物繊維ならびにオリゴ糖を添加したセルロース欠乏飼料にビフィズス菌を添加した飼料(以下、GFOB 飼料)の不断給餌を8週間実施した後に、イミキモド軟膏塗布による乾癬様皮膚炎を惹起し、GFOB の効果を検討した。

4週間あるいは8週間の煙草喫煙曝露によるイミキモド軟膏塗布による乾癬様皮膚炎への影響を検討した。

煙草喫煙曝露とともに通常飼料、セルロース欠乏飼料あるいは GFOB 飼料の不断給餌の8週間目にイミキモド軟膏塗布による乾癬様皮膚炎を惹起し、GFOB の効果を検討した。

(2)特殊飼料の作製

標準的な栄養バランスを有する精製原料で構成され、実験動物の成長期・繁殖期に用いる AIN-93G(以下、通常飼料)の配合を基準に、セルロース欠乏飼料はセルロースを加えず、その基準量に相当する sucrose を増量することにより作製した(表1)。このセルロース欠乏飼料に2%グルタミン、1.6%あるいは3.2%ポリデキストロース、0.48%あるいは3%ラクチュロースを組み合わせて添加した飼料にビフィズス菌末 BB536(*Bifidobacterium lungum*, 森永乳業)を5%(W/W)の割合で添加した飼料を GFOB 飼料とした。

表1 通常飼料とセルロース欠乏飼料の組成

成分	通常飼料	セルロース欠乏飼料
Cornstarch	397.486	397.486
Casein	200	200
Dextrinized cornstarch	132	132
Sucrose	100	150
Soybean oil	70	70
Cellulose	50	0
Mineral mix	35	35
Vitamine mix	10	10
L-Cystine	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014

(g/kg)

(3) Lewis 系雄性ラットならびに Wistar 系雄性ラットにおけるイミキモド軟膏塗布による乾癬様皮膚炎の比較

Lewis 系雄性ラットならびに Wistar 系雄性ラットの剃毛・除毛した背部にイソフルラン吸入麻酔下にてイミキモド軟膏（ベセルナクリーム 5%、持田製薬）を 62.5 mg あるいは 100mg を 24 時間間隔で塗布する。最大 6 日間塗布した。塗布部位の紅斑、肥厚、鱗屑の程度を PASI (Psoriasis Area and Severity Index) を参考に各々 5 段階 (0~4) の点数化により評価した。

(4) 煙草喫煙曝露

実験動物を専用ホルダーで保定し、MIPS 社製喫煙曝露装置を用いて、煙草喫煙曝露はハイライト[®]を用いて 1 回につき 30 分間、1 日 2 回を週 6 日(月から土曜日)、4 週間あるいは 8 週間の条件で実施した。

(5) 腸内細菌の解析

実験期間の最終日に新鮮便を採取し、腸内細菌の 16S rRNA 配列解析を次世代シーケンスにより解析した。

(6) TNF- α 及び IL-17 抗体の定量

実験終了時に皮膚を採取し、皮膚組織を調整し、ELISA kit で定量した。

(7) MPO 活性の測定

o-dianisidine dihydrochloride 及び過酸化水素を含む反応液を加えて 450nm の吸光度 を MPO 活性値とする。

4. 研究成果

(1) Lewis 系雄性ラットならびに Wistar 系雄性ラットにおけるイミキモド軟膏塗布による乾癬様皮膚炎の比較

Lewis 系ラットにおけるイミキモド軟膏塗布による乾癬様皮膚炎（紅斑、肥厚、鱗屑）の総スコアは、Wistar 系ラットのそれに比べて、背部皮膚に 62.5mg 塗布では、3 日目以降から有意に増加し、実験最終の 7 日目まで持続した（図 1）。両系統において紅斑と肥厚を主体とする皮膚炎であり、鱗屑は BALB/c 系や C57BL/6 系を用いた乾癬様皮膚炎モデルよりも軽微であった。また、実験最終の 7 日目において脾臓の腫大が両系統で認められたが、Wistar 系に比べて Lewis 系ラットで有意に増加していた。

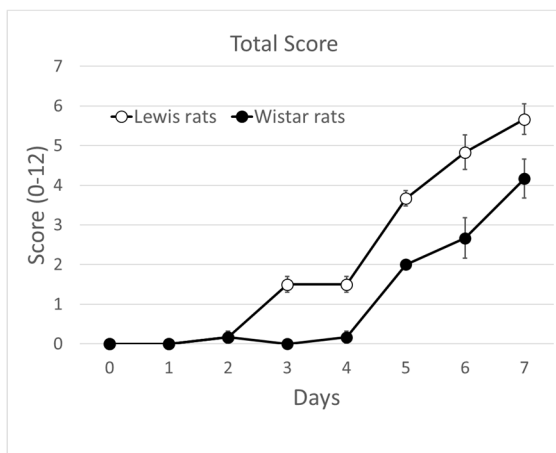


図 1 Lewis 系ならびに Wistar 系ラットにおけるイミキモド軟膏塗布による乾癬様皮膚炎の経時変化

背部皮膚に 100mg 塗布の場合、Lewis 系ラットにおいて塗布後 24 時間で紅斑が観察された。そこで塗布後 2、4、6、及 24 時間目の反応局所における TNF- α と IL-17A の含有量並び MPO 活性を測定したところ、24 時間目ですべて Lewis 系ラットに高い傾向が認められ、また MPO 活性も高い傾向が認められた。

(2) イミキモド軟膏塗布による乾癬様皮膚炎に対する GF0B 含有飼料摂取の影響

2 種類の組成率による GF0B(2%, 1.6%, 0.48%, 5%)飼料ならびに GF0B(2%, 3.2%, 3%, 5%)を含むセルロース欠乏飼料を 8 週間連続給餌後の 62.5mg のイミキモド軟膏塗布による乾癬様皮膚炎は、後者の摂取により、惹起後 2、3、4、5、6 及び 7 日目でセルロース欠乏飼料群ならびに通常飼料群に比べて有意な抑制が認められた（図 2）。また、脾臓重量の増加を有意に抑制した。更に、糞便中の短鎖脂肪酸濃度は、酢酸と酪酸が有意に高かった（表 2）。

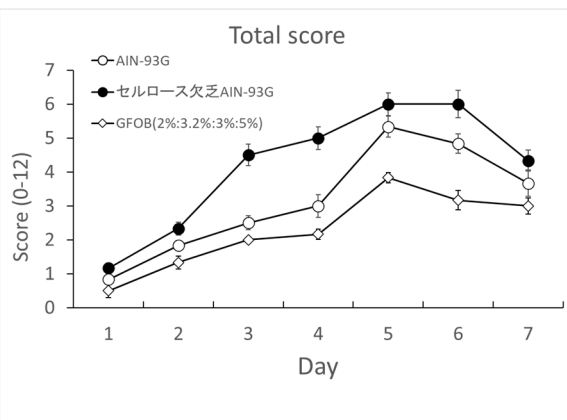


図 2 イミキモド軟膏塗布による乾癬様皮膚炎に対する GF0B 含有飼料摂取の抑制

表 2 糞便中の短鎖脂肪酸（酢酸、酪酸、プロピオン酸）の濃度

飼料	酢酸	酪酸	プロピオン酸
通常飼料	7.6 ± 0.45	0.81 ± 0.03	4.92 ± 1.00
セルロース欠乏飼料	8.34 ± 1.19	1.42 ± 0.28	2.92 ± 0.68
GFOB飼料	14.73 ± 1.12**	4.2 ± 0.98*	4.57 ± 0.85

**P<0.01, *P<0.05 vs 通常飼料, セルロース欠乏飼料

(3) イミキモド軟膏塗布による乾癬様皮膚炎に対する煙草喫煙曝露の影響及び GFOB 飼料摂取の効果

喫煙 8 週間後のイミキモド軟膏塗布による乾癬様皮膚炎は、喫煙曝露により通常飼料群とセルロース欠乏群で 7 日目にのみ有意な増強が観察された。この増強作用に対して、喫煙期間中に GFOB(2%, 1.6%, 0.48%, 5%) 飼料を含むセルロース欠乏飼料を不断給餌したが、軽減効果は得られなかった。

(4) 腸内細菌叢の解析

Lewis 系ラットの糞便中の腸内細菌種組成は、門レベルにおいて Firmicutes 門が優位に占める腸内細菌叢の不均衡が認められた。これに対してイミキモド軟膏塗布による乾癬様皮膚炎を軽減した GFOB (2.0%, 3.2%, 3.0%) と 5% *Bifidobacterium lungum* を含む GFOB 飼料の摂取では、盲腸内の Firmicutes 門が有意に減少し、Bacteroidetes 門、Verrucomicrobia 門、Actinobacteria 門および Tenericutes 門が有意に増加した。また、属レベルの解析結果から *Bifidobacterium* 属の有意な増加と *Blautia* 属の有意な減少が認められた。一方、GFOB(2.0%、1.6%、0.48%) と 5% *Bifidobacterium lungum* を含む GFOB 飼料の摂取では有意な変化は認められなかった。

以上の結果より、アジュバント関節炎や 型コラーゲン関節炎モデルに汎用されている Lewis 系ラットにおけるイミキモド塗布による乾癬様皮膚炎は、Wistar 系に比べて紅斑と肥厚が有意に顕著であり、塗布後 24 時間における皮膚組織中の IL-17A や TNF- α の含量が比較的高かった。これまで報告されている BALB/c 系や C57BL/6 系のマウスモデルに比べると軽度な皮膚炎であり、特に鱗屑は軽微であった。この皮膚炎に対して AIN-93G のセルロースをグルタミン、ポリデキストロース、ラクチュロースで置換し、*Bifidobacterium lungum* を添加した飼料(2%グルタミン、3.2%ポリデキストロース、3%ラクチュロース、5% *Bifidobacterium lungum*) を 8 週間摂取することで、紅斑と肥厚、脾臓の腫脹を有意に抑制することが認められた。加えて、盲腸内の Firmicutes 門に対する Bacteroidetes 門の組成比率の減少を改善し、糞便中の酢酸濃度と酪酸濃度の有意な増加も認められたことから、腸内細菌が乾癬に関与する可能性が示唆された。

一方、これまでの煙草喫煙の曝露条件では、イミキモド軟膏塗布による乾癬様皮膚炎への煙草喫煙の影響は認められなかった。

以上より、グルタミン、ポリデキストロース、ラクチュロースと *Bifidobacterium lungum* で構成するシンバイオティクスの組成率、濃度と摂取期間が見出され、腸内細菌叢の改善を介した乾癬の改善の可能性が示唆された。しかしながら、その作用機序にまでは至らず、また煙草喫煙と乾癬との関連を明らかにする実験条件等の再検討が必要であることなど、今後は更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久保 薫
2. 発表標題 疾患モデル動物を用いたシンバイオテイクスの試み
3. 学会等名 第138回関西実験動物研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	浅田 秀夫 (ASADA HIDEO) (60252681)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	
研究分担者	友田 恒一 (TOMODA KOICHI) (90364059)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	