

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15954

研究課題名(和文) TRAF6シグナルが制御するSLPIの腸管組織における恒常性維持機能の解析

研究課題名(英文) Role of SLPI in the maintenance of intestinal homeostasis

研究代表者

園田 光 (Akira, Sonoda)

大分大学・医学部・病院特任助教

研究者番号：40751045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：LPS刺激によりTRAF6シグナルを介してマウス腸上皮細胞株からSLPIが誘導されることを見出した。SLPIは、好中球エラスターゼ阻害活性を有し組織損傷に対する保護作用が示唆されているが、腸管組織における生理的機能は不明である。そこで、SLPI欠損マウスのDSS誘導腸炎を解析したところ、変異マウスの病態が悪化する事が明らかになった。また、偶然にも、アンピシリンとバンコマイシン2剤の抗生剤を経口投与すると、腸内細菌叢と代謝物の変化、盲腸の肥大、腸管組織のバリア機能の低下および便潜血が起きることを見出した。新たな薬剤起因性腸炎モデルの確立とその病態機序の解明に貢献した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌成分によって腸上皮細胞から誘導されるSLPIが、腸管組織における恒常性の維持に重要であることが遺伝子改変マウスの解析から明らかになった。すなわち、SLPIはプロテアーゼ阻害活性により過剰な炎症反応で生じる組織損傷に対して腸管組織を保護していることが示唆された。また、抗生物質投与後に各種腸炎が引き起こされることが知られているが、マウスにアンピシリンとバンコマイシンを投与することで、腸内細菌叢の変化による薬剤起因性腸炎が誘導されることを見出した。新たな腸炎モデルの確立とその病態機序の解明により、今後のヒト腸疾患の予防法・治療法の開発に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that LPS stimulation induced SLPI from mouse intestinal epithelial cell line via TRAF6 signal. SLPI has neutrophil elastase inhibitory activity and has been suggested to protect against tissue damage, but its physiological function in intestinal tissues is unknown. Analysis of DSS-induced colitis in SLPI-deficient mice revealed that the pathological condition of mutant mice was exacerbated. It was also found by chance that oral administration of two antibiotics, ampicillin and vancomycin, causes changes in the composition of intestinal microbiota and metabolites, an enlargement of the cecum, a defective intestinal tissue barrier function and fecal occult blood. In this study, we have established a new drug-induced enteritis model and elucidated its pathological mechanism.

研究分野：消化器内科学

キーワード：SLPI 腸炎 TRAF6 アンピシリン バンコマイシン

1. 研究開始当初の背景

クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患 (IBD) は、慢性的に炎症を起こす難治性腸疾患であるがその原因は不明である。小腸陰窩の基底部に存在するパネート細胞は腸内細菌の成分に応答し α ディフェンシンなどの抗菌ペプチドを産生する。近年、抗菌ペプチドの異常が腸内細菌叢の恒常性に破綻を来し、様々な疾病の発症や病態形成に関与することが示唆されている。

細菌成分を認識する Toll 様受容体 (TLR) 4 とそのシグナル伝達分子である MyD88 が欠損したマウスは、デキストラン硫酸塩 (DSS) によって誘導される腸炎が増悪することが報告されている^①。さらに、TLR4 のシグナル伝達分子である TRAF6 が腸上皮細胞特異的に欠損したマウス (Villin-Cre:TRAF6^{fllox/fllox} マウス) でも、DSS 誘導腸炎が増悪する^②。これらの結果は、腸内細菌叢が腸上皮細胞の TLR4 に認識されると MyD88 及び TRAF6 を介したシグナルが活性化し、このシグナルが腸上皮細胞の恒常性の維持と組織損傷からの保護に働いていることを示唆している。加えて、抗生物質投与後には、菌交代現象によって各種腸炎が引き起こされることも知られている。しかし、腸内細菌叢と TLR シグナルが如何に腸炎を制御しているのか、そのメカニズムは明らかではない。

我々は、マウス腸上皮細胞株を LPS で刺激すると TRAF6 シグナルを介して抗菌ペプチドの一種である secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) の著しい発現が誘導されることを見出した。SLPI は、肺、涙腺、性腺、皮膚等において分泌され、好中球エラスターゼ阻害活性を有し、組織損傷に対する保護作用や抗菌ペプチドとしての機能が示唆されているが生体内での詳細は不明である。これまでに、Tslp 欠損マウスでは SLPI の発現が低下し、DSS 誘導腸炎が悪化する事が報告されているが^③、腸炎の病態制御に関する SLPI の直接的な証拠は得られていない。一方、SLPI 欠損マウスを用いた生理的機能の解析は、呼吸器疾患に限定されており、消化器における SLPI の生理的機能は未だ不明である。

2. 研究の目的

そこで、研究開始当初において、SLPI の腸管組織での生理的機能と DSS 誘導腸炎における病理学的機能を明らかにすることを研究の目的とした。そのため、SLPI 欠損マウスに抗生物質や DSS を投与し腸炎を誘導してその病態を解析することとした。

3. 研究の方法

(1) マウス

SLPI 欠損マウスは大阪大学竹田潔博士より分与していただいた。遺伝的背景を均一にするため、大分大学動物実験施設において C57BL/6 系統マウスに 6 世代戻し交配した。遺伝子型は尻尾の DNA を用いて PCR 検定により決定した。全てのマウスは大分大学動物実験施設内の SPF 環境下で維持され、全ての動物実験は大分大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

(2) DSS 誘導腸炎

8~12 週齢の野生型及び SLPI 欠損マウスに 2.5%DSS を 7 日間自由飲水させ、腸炎を誘導し、その後通常の水を 3 日間自由飲水させた。その間体重を毎日測定し、便の性状を観察した。試験紙を用いて便潜血を検査した。最終日にマウスを安楽死させ、大腸および盲腸を摘出し、その性状を観察した。腸管組織は、固定後、HE 染色、Ki65 免疫染色及び TUNEL 染色を行い観察した。

(3) 抗生剤起因性腸炎

8~12 週齢のマウスにアンピシリン、バンコマイシン、メトロニダゾール、ネオマイシンを様々な組み合わせで、24 時間ごとに、3 回、ゾンデを用いて経口投与した。最後の投与から 24 時間後に、腸管組織を摘出し、病理学的解析、遺伝子発現解析、腸内細菌叢及び腸内代謝物の解析を行った。

(4) 遺伝子発現解析

腸管組織より RNA を抽出し、炎症性サイトカイン、抗菌ペプチドの発現をリアルタイム PCR 法により測定した。

(5) 腸内細菌叢及び腸内代謝物の解析

盲腸より内容物を回収し -80°C で保存した。盲腸内容物から DNA を抽出し、ライブラリを構築し、次世代シーケンサーを用いた 16s rRNA メタゲノム解析により腸内細菌叢を調べた。また、盲腸内容物を GS/MS で分析し、腸内代謝物の変化を多変量解析ソフトウェア SIMCA を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) SLPI の腸管組織における機能解明

SLPI 欠損マウスに DSS を投与して腸炎を誘導しその病態を解析したところ、欠損マウスの著しい体重減少と、腸炎の増悪化を観察した。さらに、SLPI 欠損マウスにおける DSS 誘導腸炎の免疫組織化学的解析により、腸管組織内の好中球の増加と線維化の亢進が野生型マウスより顕著であることが示された。また、腸管上皮細胞のアポトーシス亢進と腸管バリア機能の低下を認め、更に、腸内細菌叢を調べると、腸炎を誘導した SLPI 欠損マウスは善玉菌として知られる Lactobacillales が野生型マウスよりも更に減少し、悪玉菌として知られる Bacteroides が増加していることが明らかになった。以上の結果より、SLPI が腸管バリア機能と腸内細菌叢の維持に働き、腸管組織を保護していることが示唆された。本研究は、論文作成に向け、さらなる解析を継続している。

(2) 抗生剤起因性腸炎モデルの確立と病態解明

過去の報告で、DSS 誘導腸炎は予め腸内細菌を除菌することで増悪することが示されている^①。

そこで、マウスにアンピシリン、バンコマイシン、メトロニダゾール、ネオマイシンを経口投与したところ、DSS の投与前に便潜血が全例で確認された。そこで、この薬剤起因性腸炎を解析することとした。4 剤を 3 日間投与したマウスは、すべて便潜血陽性で盲腸が肥大した。盲腸内容物は黒褐色に変色し、重量は約 3 倍に増加した。この原因となる抗生剤の特定を試みたところ、アンピシリンとバンコマイシンの 2 剤で十分

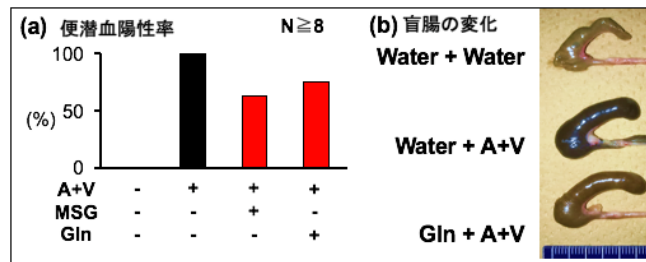
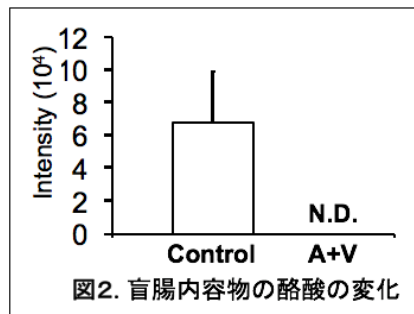


図 1. アンピシリンとバンコマイシン(A+V) 投与により全例便潜血陽性となり盲腸は肥大し内容物が黒褐色に変色する。これはグルタミン酸(MSG)やグルタミン(Gln)の投与により改善する。

であることが明らかになった (図 1)。更に盲腸内の代謝産物をガスクロマトグラフ質量分析計で測定した所、グルタミン酸や酪酸といった腸管上皮のエネルギー源となる代謝産物が減少



していた (図 2)。更に大腸上皮の ki-67 陽性細胞数が減少しており、細胞増殖の低下が判明した。また、TUNEL 陽性細胞数が増加しており上皮細胞のアポトーシス亢進も示唆された。抗生物質による腸内細菌叢の変化をメタゲノム解析した所、酪酸を始めとした短鎖脂肪酸を産生する Clostridiales が減少しており、これらの菌が減少する事によって酪酸を始めとした腸管エネルギー物質の産生低下が示唆された (図 3)。さらに、酪酸はマクロファージ細胞株 RAW267. 4 において、LPS 刺激による炎症性サイトカインの mRNA 発現を抑制し、大腸癌細胞株 CMT93 からの抗菌ペプチドの mRNA 発現を促進した。この薬剤起因性腸炎モデルにグルタミン酸を投与したところ、便潜血は顕著に抑えられた (図 1)。よってグルタミン酸や酪酸が本腸炎に重要な関わりがあると考えられる。本研究により、アンピシリンとバンコマイシンの経口投与により Clostridiales が減少し、その結果グルタミン酸や短鎖脂肪酸の代謝障害が引き起こされて、腸管ホメオスタシスが破綻することで薬剤起因性腸炎が発症することが明らかとなった。本研究は、新たな薬剤起因性腸炎モデルの確立とその病態機序の解明に貢献した。今後の腸疾患の研究とヒト腸疾患の予防法・治療法の開発に貢献するものと考えられる。

酸や酪酸が本腸炎に重要な関わりがあると考えられる。本研究により、アンピシリンとバンコマイシンの経口投与により Clostridiales が減少し、その結果グルタミン酸や短鎖脂肪酸の代謝障害が引き起こされて、腸管ホメオスタシスが破綻することで薬剤起因性腸炎が発症することが明らかとなった。本研究は、新たな薬剤起因性腸炎モデルの確立とその病態機序の解明に貢献した。今後の腸疾患の研究とヒト腸疾患の予防法・治療法の開発に貢献するものと考えられる。

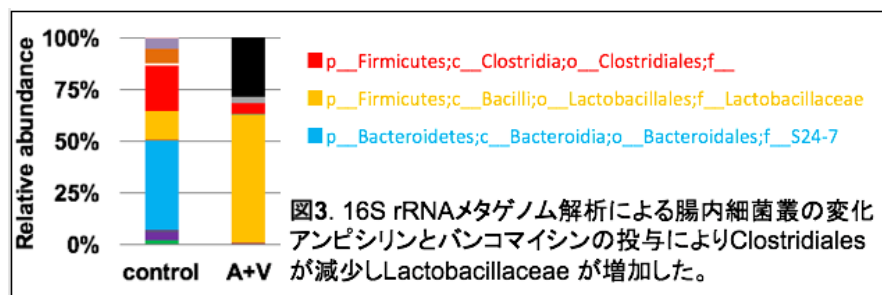


図 3. 16S rRNAメタゲノム解析による腸内細菌叢の変化 アンピシリンとバンコマイシンの投与により Clostridiales が減少し Lactobacillaceae が増加した。

酸や酪酸が本腸炎に重要な関わりがあると考えられる。本研究により、アンピシリンとバンコマイシンの経口投与により Clostridiales が減少し、その結果グルタミン酸や短鎖脂肪酸の代謝障害が引き起こされて、腸管ホメオスタシスが破綻することで薬剤起因性腸炎が発症することが明らかとなった。本研究は、新たな薬剤起因性腸炎モデルの確立とその病態機序の解明に貢献した。今後の腸疾患の研究とヒト腸疾患の予防法・治療法の開発に貢献するものと考えられる。

本研究は、原著論文として Genes and Cells 誌に掲載された。

<引用文献>

- ① Rakoff-Nahoum S, et al. Cell. 2004;118(2):229-241.
- ② Vlantis K, et al. Gut. 2016 Jun;65(6):935-943.
- ③ Reardon C, et al. Immunity. 2011 Aug 26;35(2):223-235

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sonoda A, Kamiyama N, Ozaka S, Gendo Y, Ozaki T, Hirose H, Noguchi K, Saechue B, Sachi N, Sakai K, Mizukami K, Hidano S, Murakami K, Kobayashi T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Oral administration of antibiotics results in fecal occult bleeding due to metabolic disorders and defective proliferation of the gut epithelial cell in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 1043-1055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12649.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Gendo Y, Matsumoto T, Kamiyama N, Saechue B, Fukuda C, Dewayani A, Hidano S, Noguchi K, Sonoda A, Ozaki T, Sachi N, Hirose H, Ozaka S, Eshita Y, Mizukami K, Okimoto T, Kodama M, Yoshimatsu T, Nishida H, Daa T, Yamaoka Y, Murakami K, Kobayashi T.	4. 巻 3
2. 論文標題 Dysbiosis of the Gut Microbiota on the Inflammatory Background due to Lack of Suppressor of Cytokine Signalling-1 in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflammatory Intestinal Disease	6. 最初と最後の頁 145-154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000495462.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Noguchi K, Kamiyama N, Hidano S, Gendo Y, Sonoda A, Ozaki T, Hirose H, Sachi N, Saechue B, Ozaka S, Eshita Y, Mizukami K, Kawano K, Kobayashi T.	4. 巻 504
2. 論文標題 Autoimmune sialadenitis is associated with the upregulation of chemokine/chemokine receptor pairs in T cell-specific TRAF6-deficient mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 245-250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.bbrc.2018.08.162.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 園田 光, 玄同 淑子, 尾崎 貴士, 佐知 望美, 神山 長慶, 飛弾野 真也, 福田 健介, 首藤 充孝, 小川 竜, 岡本 和久, 水上一弘, 沖本 忠義, 小林 隆志, 村上 和成
2. 発表標題 アンピシリンとバンコマイシンの投与によってグルタミン代謝と短鎖脂肪酸の発酵が障害され、マウス腸炎が誘発される
3. 学会等名 第25回日本消化器関連学会週間(JDDW) 第59回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名	A. Sonoda, N. Sachi, Y. Gendo, T. Ozaki, N. Kamiyama, S. Hidano, K. Mizukami, T. Okimoto, K. Murakami, T. Kobayashi
2. 発表標題	A combined administration of ampicillin and vancomycin induces mild colitis with decreased diversity of gut microbiota and perturbation of glutamine and short chain fatty acid metabolisms.
3. 学会等名	25th United European Gastroenterology Week (UEGW) (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	園田 光, 玄同 淑子, 尾崎 貴士, 佐知 望美, 神山 長慶, 飛弾野 真也, 村上 和成, 小林 隆志
2. 発表標題	アンピシリンとバンコマイシンの投与によってグルタミン代謝と短鎖脂肪酸の発酵が障害され、マウス腸炎が誘発される
3. 学会等名	生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	小坂聡太郎、有木晋平、園田光、Benjawan Saechue、Astri Dewayani、神山長慶、飛弾野真也、水上一弘、村上和成、小林隆志
2. 発表標題	抗生物質や抗菌ペプチドによる腸内環境の変化が腸内細菌叢に及ぼす影響
3. 学会等名	第10回癌・炎症と抗酸化研究会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	小坂聡太郎、有木晋平、園田光、佐知望美、後藤美月、曾我泰裕、広瀬晴奈、尾崎貴士、Benjawan Saechue、Astri Dewayani、神山長慶、飛弾野真也、水上一弘、村上和成、小林隆志
2. 発表標題	抗生物質起因性大腸炎モデルマウスに対する柴苓湯の保護効果の解明
3. 学会等名	第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年	2019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
--	---------------------------	-----------------------	----