

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
研究期間：2006～2008
課題番号：18390357
研究課題名 (和文) 常在腸内細菌に対する消化管粘膜防御および共存機構の解明
研究課題名 (英文) The effect of luminal bacterial flora on intestinal mucosal immune system.
研究代表者 小川 仁 (OGAWA HITOSHI) 東北大学・病院・講師 研究者番号：00312570

研究成果の概要：

本研究では腸内細菌叢およびその代謝産物が腸管免疫機構に与える影響を検討した。手術標本から粘膜平滑筋細胞を分離培養し、腸内細菌産物である LPS(Lipopolysacchhalide)と Sodium butyrate による遺伝子発現の変化を検討した。LPS と Butyrate は粘膜平滑筋細胞においてそれぞれ単独の刺激で種々の遺伝子発現を誘導するが、共刺激によりさらに異なる遺伝子発現を誘導した。これらの結果は、腸内細菌叢が消化管細胞にあたる複雑な影響を示している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,400,000	0	7,400,000
2007 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	2,400,000	17,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：炎症性腸疾患、腸管免疫、腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

ヒトの消化管内には数百種、総数にして人体を構成する細胞の 10 倍以上の腸内細菌が常在している。健康状態において腸管粘膜はこれら多種大量の腸内細菌叢に暴露されながらもこれらと共存し、「生理的炎症」とされる軽度の炎症状態においてその恒常性を維持している。

潰瘍性大腸炎、クローン病といった炎症性腸疾患 (IBD) の原因は未だ不明であるが、1990 年代に種々の動物モデルにおいて腸内細菌叢の存在が IBD 類似腸炎の発症と増悪に必要であることが示され、現在では腸内細菌

菌に対する防御・共存機構の破綻が IBD に代表される慢性難治性消化管粘膜炎症の原因ではないかと考えられている

我々はこれまで、無菌マウスに常在腸内細菌叢を定着させる「通常化モデル」を作成し研究を行ってきた。無菌マウスの大腸粘膜は通常環境下のそれに比べ粘膜・粘膜下層の萎縮を特徴とするが、常在腸内細菌叢の導入後数日で一過性の激しい炎症を生じる。しかし約 2 週間後には炎症は鎮静化し、約 4 週間後には通常環境下のマウスと同様の組織像を呈する。この過程は、遺伝的背景の正常な個体が無菌環境下ゆえに常在腸内細菌叢に対

する防御・共存機構を獲得しえず、そのため腸内細菌叢に暴露された直後に一過性の腸炎を発症し、そのあと防御・共存機構を発現し炎症が鎮静化する過程であると考えられる。従って、この通常化の過程における消化管粘膜構成細胞の機能を解明することは、IBDをはじめとした消化管粘膜炎症の病因・病態を解明する上で極めて重要な知見をもたらすことが期待される。我々は従来、この通常化過程における小腸と大腸の腸上皮細胞の遺伝子発現の変化を焦点に研究を行い、またこの結果をもとにヒトIBDにおける遺伝子発現の異常を同定し報告してきた。

本研究計画では、当初これまでと同様の「通常化モデル」を作成し、腸上皮細胞以外の細胞（粘膜固有層リンパ球、血管内皮細胞、粘膜固有層平滑筋細胞など）の通常化の過程における遺伝子発現の変化、特にNotchシグナルに関わる分子の変化を検討する予定であった。しかし2006年度より、それまで無菌マウスを販売していた日本クレアからの販売が中止され入手が不可能となった。このため、当初から研究計画の大幅な変更を余儀なくされた。

そこで本研究では、粘膜免疫においてまだその役割が充分解明されていない平滑筋細胞（粘膜平滑筋細胞：以下M-SMC）に注目し、腸内細菌叢産物による細胞機能の変化を研究することとした。

2. 研究の目的

本研究では、粘膜を構成する主要な細胞成分である平滑筋細胞（M-SMC）を分離培養し、腸内細菌産物であるSodium ButyrateおよびLPS(Lipopolysaccharide)刺激による遺伝子発現の変化を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)M-SMCの分離と培養：

手術で得られた正常大腸粘膜より、酵素処理によりM-SMCを分離・培養した。長期培養による特徴的形態および免疫染色法により平滑筋細胞であることを確認した。(図1A, B)

図1A:

長期培養による平滑筋細胞の形態変化:ヤマ状の部分と谷状の部分が観察される。

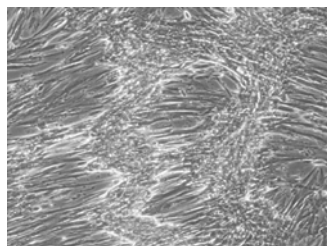
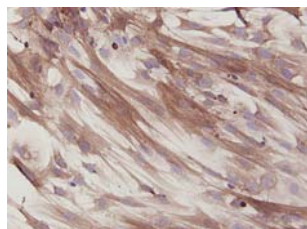


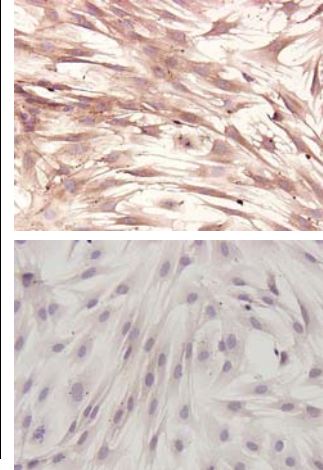
図1B:



免疫染色法による培養細胞の確認：

上段：α-SMA
中段：desmin
下段：control IgG

α-SMA、desminともに陽性であることから、平滑筋細胞であることが確認される。



(2)アレイ法による遺伝子発現の同定：

M-SMCをLPS(100mg/mL, 5hr), Sodium Butyrate(5mM, 5hr), およびLPS+Sodium Butyrateにより刺激し、total RNAを抽出した。Panomics社製「TranSignal NF-κB Target Gene Array」を用いて遺伝子発現の変化をスクリーニングした。

(3)Real-time PCR法による遺伝子発現変化の確認：

(2)の方法で検出された遺伝子発現(mRNA発現)の変化を、Applied Biosystems社製7300 Real Time PCR Systemを用いて定量的に確認した。

(4)ELISA法による蛋白質発現の検討：

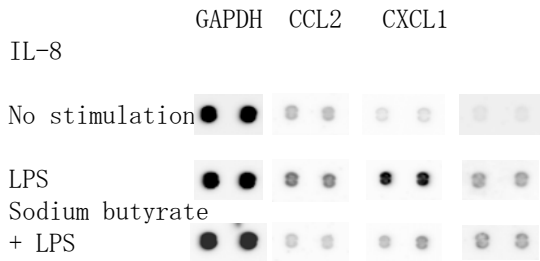
R&D社製ELISA kitにより、培養細胞上清中の蛋白質濃度を測定した。

4. 研究成果

(1)アレイ法による遺伝子発現の同定(図2)：

LPS刺激により、ケモカインであるCCL2, CXCL1, IL-8の発現が誘導された。Sodium butyrateとの共刺激により、CCL2とCXCL1の発現は抑制されたが、IL-8の発現には変化は見られなかった。

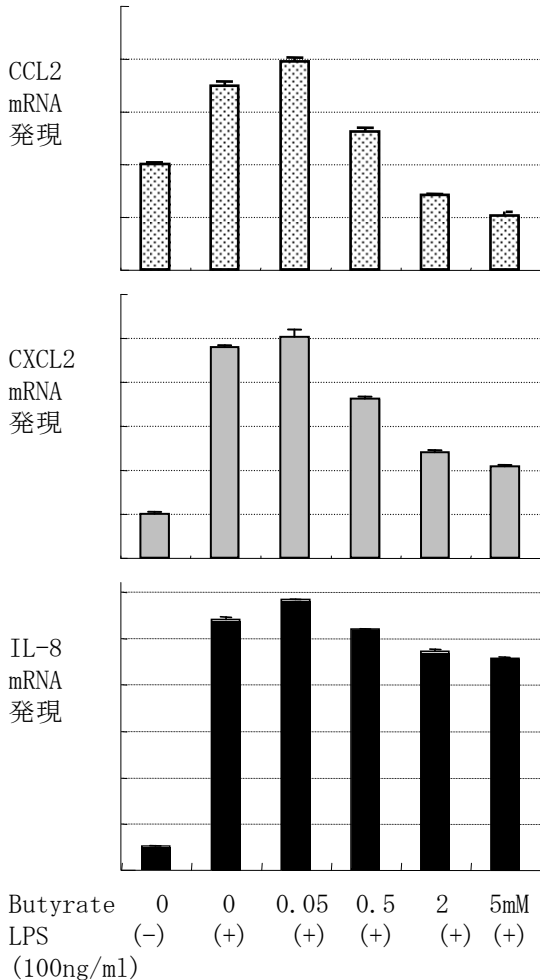
<図2:アレイ法による遺伝子発現の同定>



(2) Real-time PCR 法による遺伝子発現変化の確認 (図 3)

アレイ法によって同定された上記遺伝子発現の変化を、定量的 PCR 法により検討した。CCL2 発現は LPS 刺激により約 1.8 倍に上昇した。低濃度 (0.05mM) の butyrate 共刺激は CCL2 発現を軽度上昇させたが、0.5mM 以上の濃度では用量依存性に発現を低下させた。CXCL1, IL-8 発現にも同様の傾向が認められたが、IL-8 においては Butyrate 作用はより軽度であった。

<図 3: 定量的 PCR による遺伝子発現の検討>

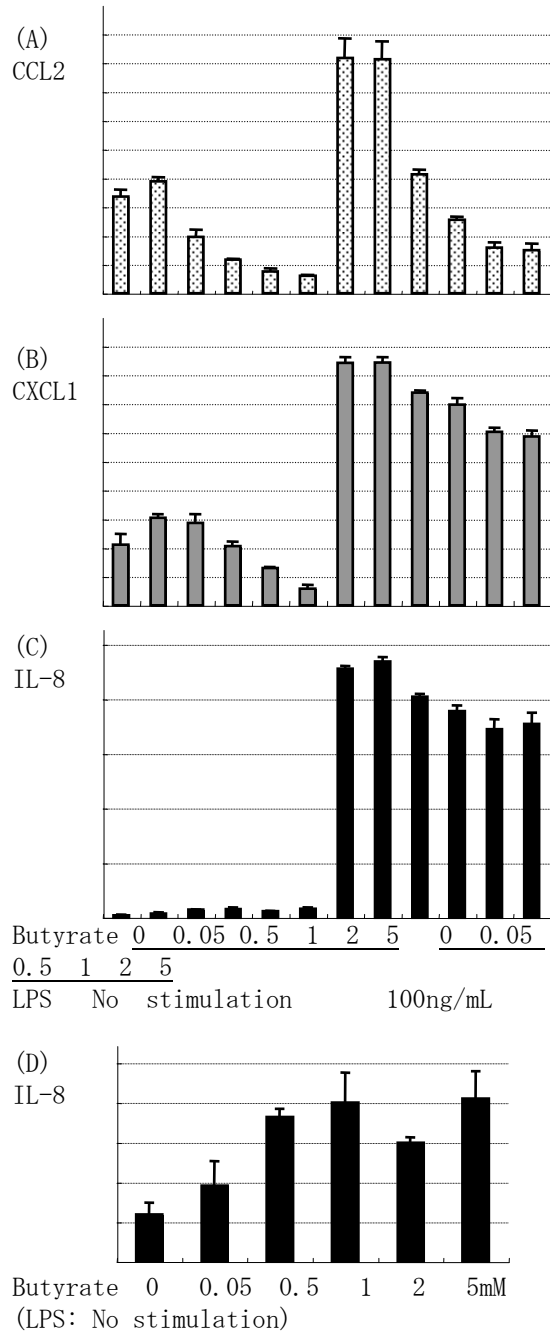


(3) ELISA 法による蛋白質定量 (図 4)

ELISA 法による M-SMC 培養上清中の蛋白質定量を、Butyrate 単独刺激と Butyrate + LPS 刺激下に行った。

CCL2, CXCL1 は、Butyrate 単独刺激により低濃度 (0.05~0.5mM) ではやや上昇するが、1mM 以上の濃度では用量依存的に低下した。LPS との共刺激では、Butyrate 用量依存性に蛋白質発現は低下した (A, B)。一方 IL-8 は、Butyrate 単独刺激で用量依存的に発現が増加し (D)、LPS との共刺激では 0.5mM 以上の用量で低下したが、その程度は CCL2 に比べて軽度であった (C)。

<図 4: ELISA 法による蛋白質の定量>



これらの結果から、

- ① Sodium butyrate は低濃度 (0.05~0, 5mM) 以下では CCL2, CXCL1 遺伝子発現を亢進させ、高濃度ではその発現を抑制する。
- ② IL-8 は、Sodium butyrate 単独刺激により用量依存的に発現が亢進する。
- ③ LPS 刺激はいずれのケモカイン発現も増加させる。Butyrate 共刺激により高濃度でその発現は抑制されるが、その程度はケモカインによってことなる。

ことが明らかとなった。

これらの結果は、腸内細菌によって産生される Butyrate が濃度によって平滑筋細胞からのケモカイン産生に対して逆の作用を呈することを示している。さらに、LPS と Butyrate の共刺激の結果から、腸内細菌は様々な物質を介して腸粘膜を構成する細胞に対して複雑に作用することを示唆しており、生体と腸内細菌の共存機構を解明するためにはこれらの複雑な相互作用の研究が重要であると考えられる。

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 7 件)

- ① 小川 仁、高橋賢一、舟山裕士「潰瘍性大腸炎に対する最適な外科治療とは」臨床外科、5月号、587-591、2009、査読無
- ② Kohyama A, Ogawa H, Funayama Y, 他 6 名「Bacterial population moves toward a colon-like community in the pouch after total proctocolectomy」Surgery、4月号、435-437、2009、査読有
- ③ 小川 仁、舟山裕士、福島浩平、他 5 名「Crohn病に合併した難治性痔瘻に対する seton法の長期成績」日本大腸肛門病学会雑誌、3月号、101-106、2008、査読有
- ④ 小川 仁、舟山裕士、佐々木巖「炎症性腸疾患」消化器外科NURSING、5月号、468-73、2007、査読無
- ⑤ 小川 仁「クローン病のトータルマネジメント」Progress in Medicine、4月号、947-950、2007、査読無
- ⑥ 小川 仁、高橋賢一、舟山裕士、他 2 名「肛門・肛門管悪性腫瘍の診断」外科、9月号、1038-43、2007、査読無
- ⑦ 小川 仁、舟山裕士、福島浩平、他 2 名「潰瘍性大腸炎外科治療の進歩」Modern Physician、9月号、1489-92、2006、査読無

[学会発表] (計 4 件)

- ① 小川 仁「潰瘍性大腸炎に対する大腸全摘・回腸囊肛門(管)吻合術の治療経過と長期予後」第109回日本外科学会定期学術集会、平成21年4月2日、福岡
- ② 小川 仁「潰瘍性大腸炎に対する大腸全摘・回腸囊肛門吻合術後のC.Difficile関連難治性回腸囊炎」第63回日本大腸肛門病学会学術集会、平成20年10月16日、東京
- ③ 小川 仁「クローン病に合併した難治性痔瘻に対する seton手術の長期予後」第62回日本消化器外科学会総会、平成19年7月14日、東京
- ④ 小川 仁「クローン病に合併した難治性痔瘻に対する seton法の長期予後」第93回消化器病学会総会、平成19年4月20日、青森

[図書] (計 1 件)

- ① 小川 仁、佐々木巖「クローン病術後のインフリキシマブ投与と再燃」武藤徹一郎監修、日本メディカルセンター、大腸疾患NOW2009、2001年発行、総ページ数発行223頁、199-202、査読無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 仁 (OGAWA HITOSHI)
東北大学・病院・講師
研究者番号：00312570

(2) 研究分担者

佐々木 巖 (SASAKI IWAO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60125557
福島 浩平 (FUKUSHIMA KOUHEI)
東北大学・医工学研究科・教授
研究者番号：20271900
柴田 近 (SHIBATA CHIKASHI)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30270804

(3) 連携研究者

該当なし