

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591950

研究課題名（和文）炎症性腸疾患の腸管粘膜免疫機構とプロバイオティクスの治療応用の検討

研究課題名（英文）Immune system of the intestinal mucosa and effects of probiotics in inflammatory bowel disease

研究代表者

氏名（ローマ字）：吉田 英生（YOSHIDA HIDEO）

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：60210712

研究成果の概要：

腸内細菌叢からの TLR を介した刺激の制御機構に異常が生じ、腸内環境の恒常性の維持に破綻が生じていることを示し、腸内環境のコントロールを目的としたプロバイオティクスの投与が有用であることを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	800,000	240,000	1,040,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	450,000	3,050,000

研究分野：医歯薬学

科研ひの分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：先天性消化器疾患学

## 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎とクローン病に代表される炎症性腸疾患の病因はいまだ不明である。

近年、炎症性腸疾患と腸内細菌叢との関連が明らかとなってきた。炎症性腸疾患が腸内細菌叢の豊富に存在する回腸、大腸に好発することから、腸内細菌叢に対する免疫応答の異常が、慢性腸炎発症において重要な役割を担っていると考えられている。

炎症性腸疾患治療の基本は 5-アミノサルチル酸製剤や副腎皮質ステロイドであった

が、最近の病態解明に伴い、白血球除去療法・顆粒球吸着療法、シクロスポリン静注療法、抗 TNF 抗体など有効な治療も開発されている。しかしながら、依然として種々の治療法に抵抗する難治例や頻回に繰り返す症例が存在することから、これら腸疾患の病因・病態の解明とこれに基づく新しい治療法の開発は急務である。

## 2. 研究の目的

腸管局所における自然免疫の活性化機構において、Toll-like receptors (TLR)が重要な役割を担っている。炎症性腸疾患では腸内細菌叢からのTLRを介した刺激の制御機構に異常が生じ、腸内環境の恒常性の維持に異常が生じていると考えられる。TLRの刺激伝達において myeloid differentiation protein (MyD88)はアダプター分子として必要な分子である。そこで腸管局所における自然免疫 (innate immunity) の活性化機構において中心的役割を担っている。腸管局所における自然免疫の活性化機構に重要な役割を担っている Toll-like receptors (TLR)のシグナルの面から、炎症性腸疾患発症における TLR シグナルの関連性について解明する。

TLRの解析から炎症性腸疾患では腸内細菌叢からのTLRを介した刺激の制御機構に異常が生じ、腸内環境の恒常性の維持に異常が生じていることが判明すれば、腸内環境のコントロールを目的とした予防的アプローチも成り立つ。その一つとして最近その有用性が明らかとなってきたプロバイオティクス、プレバイオティクスがあげられる。これらの治療法は有害菌の増殖を抑制するだけでなく、宿主の免疫力の増強作用や腸管機能の賦活化作用を有する。炎症性腸疾患発症における腸内細菌の重要性から、新たな治療法として腸内細菌叢を宿主に有益な方向へと是正するプロバイオティクス、プレバイオティクスの有用性について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物実験

#### 実験モデルの作成

##### 【実験材料ならびに実験方法】

実験動物：8週齢 C57BL/6 雌性マウス  
使用薬物：Dextran sulfate sodium(DSS, 和光純薬)

DSS 大腸炎モデルの作成：3%DSS 溶解水を7日間飲水させ、8日目より通常水に変更、DDS 投与開始より2週間後、犠死し、全結腸を摘出

検討項目：飼料摂取量、体重変化、便性、下血、摘出結腸の長さおよび病理組織像

【実験結果】通常水を飲水させたC57BL/6を対象群とした。

飼料摂取量：DDS 投与期間中、減り続けた。

体重変化：DDS 投与直後より減少し、DDS 投与終了後も11日まで減少傾向にあった。

下痢：DDS 投与3日目より認められ始め、4日目には全てのマウスに下血を認めた。

摘出結腸：長さは対象群に比べ短く、病理組織像では炎症性細胞浸潤を伴った潰瘍やびらんを認めた。

DDS 大腸炎に対するプロバイオティクスの効果

##### 【実験材料ならびに実験方法】

実験動物：C57BL/6 雌性 DDS 大腸炎マウス  
使用薬物：Bifidobacterium breb, Lactobacillus casei

プロバイオティクス投与モデル：上記薬物（生菌数濃度  $1 \times 10^9$  CFS/kg）懸濁液を DDS 投与前3日間、1回/日経口投与した。

検討項目：飼料摂取量、体重変化、便性、下血、摘出結腸の長さおよび病理組織像

##### 【実験結果】

プロバイオティクス投与により、下血を認めず、結腸の短縮も認めなかった。

TLR(Toll-like receptor)欠損マウスの検討

##### 【実験材料ならびに実験方法】

実験動物：TLR4 欠損マウス、C57BL/6 マウス  
使用薬物：DDS, Bifidobacterium breb, Lactobacillus casei

実験群の作成：DDS 投与 TLR4 欠損マウス（T - 群）DDS+乳酸菌製剤投与 TLR（T マウス（T + 群）DDS 投与 C57BL/6 マウス（C - 群）DDS+乳酸菌製剤投与 C57BL/6 マウス（C + 群）の 4 群

検討項目：飼料摂取量、体重変化、便性、下血、摘出結腸の長さと同組織像

#### 【実験結果】

T - 群は C - 群に比べ、早期に激しい下血を認め、粘膜組織の炎症細胞浸潤の程度も強かった。T + 群も C + 群も乳酸菌の投与によって症状の軽減を認めた。

T + 群で結腸粘膜に TGF- $\beta$ 、IL-10 の発現の増強がみられた。

### （2）臨床的検討

#### 基礎的検討

ワンステップで RNA の抽出が可能な RNA 結合メンブレンをもちいて検体処理を試み、平均 74.5  $\mu$ g という非常に高い収率で RNA を回収することが可能であり、real time PCR の解析を行う上では十分な量の RNA と考えられた。この方法を用いることにより、バイオプシー検体でも十分 mRNA の解析が可能であることが確認できた。消化管粘膜には多量の常在細菌やウイルスが存在するため、実際に human 由来の gene が detect 可能かどうかを通常の RT-PCR にて確認し十分なバンドが得られた。これにより回収した RNA は host としての human 由来の RNA も十分含まれていることを確認した。

#### 潰瘍性大腸炎患者の病態とプロバイオティクス投与の効果

#### 【対象と方法】

当科で治療中の潰瘍性大腸炎患者の便、粘膜生検組織を検体としてプロバイオティクス投与前後の変化を比較検討した。

#### 【結果】

便培養：Bifidobacteria の減少、Bacteroides fragilis の検出を認めた。

結腸粘膜：サイトカインプロファイルでは、IFN- $\gamma$  の発現は、非特異性大腸炎では増強を認めたが、潰瘍性大腸炎では正常粘膜よりは低かった。

回腸囊粘膜：回腸囊炎の粘膜は正常粘膜に比べ、TLR2, TLR4 の発現が高かった。炎症を惹起していない回腸囊でも正常粘膜に比べ、TLR4 の発現が高かった。乳酸菌製剤投与により短鎖脂肪酸の増加が認められた。

### 4 . 研究成果

潰瘍性大腸炎とクローン病に代表される炎症性腸疾患の病因はいまだ不明である。腸内細菌叢に対する免疫応答の異常が、慢性腸炎発症において重要な役割を担っていると考えられている。Toll-like receptors (TLR) は、腸管局所における自然免疫の活性化機構において重要な役割を担っている。炎症性腸疾患では腸内細菌叢からの TLR を介した刺激の制御機構に異常が生じ、腸内環境の恒常性の維持に異常が生じていると考えられる。

活性化された TLR は、細胞内シグナル伝達経路を介して、転写因子である IRF や NF- $\kappa$ B を活性化し、それぞれ IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  または、IL-1、IL-6、IL-8 などサイトカインを誘導し、獲得免疫、あるいは炎症を誘導する。TLR-4 は、グラム陰性菌の糖タンパクで炎症に関与する LPS を認識する受容体である。われわれの実験結果では、TLR-4 欠損マウスにおいて大腸炎症状が強かった。腸管の炎症反応において TLR-4 は腸管上皮の維持、上皮障害の防御の役割を担っていると思われる。プロバイオティクスの投与は、臨床症状の軽減をもたらす、粘膜に抗炎症性サイトカインである TGF- $\beta$ 、IL-10 の発現の増強が認

めた。

潰瘍性大腸炎患者を対象とした臨床的検討では、回腸囊炎の粘膜は正常粘膜に比べ、TLR2, TLR4 の発現が高かった。この変化は、サイトカインのような炎症性メディエーターの産生を誘導し、粘膜障害を惹起しているものと思われた。動物実験結果とあわせると、健常時は腸管上皮と細菌が問題を起こすことなく共存している。しかし、なんらかのストレスが加わり IFN- $\gamma$  のような炎症性サイトカインが遊離されると、腸管粘膜の TLR-4 が増強し、その結果さらに炎症性メディエーターの産生を促し、粘膜障害、修復障害を引き起こすと考えられる。プロバイオティクスの投与は、回腸囊炎の改善を認めたが、便細菌叢の変化、便中短鎖脂肪酸の増加を示した。腸内細菌叢からの TLR を介した刺激の制御機構に異常が生じ、腸内環境の恒常性の維持に異常が生じていることから腸内環境のコントロールを目的としたプロバイオティクスの有用性が示された。最近の報告では、プロバイオティクス、プレバイオティクスは有害菌の増殖を抑制するだけでなく、宿主の免疫力の増強作用や腸管機能の賦活化作用を有するといわれている。

#### 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 1 件)

吉田英生、下痢をしやすいのですが、小児外科、39 巻、444~449、2007、査読有

[学会発表](計 6 件)

齋藤 武、吉田英生  
診断に苦慮した乳幼児クローン病の 1 例第 9 回日本小児 I B D 研究会  
2009.2.15、大阪

吉田英生、小児 I B D の治療方針、第 15 回千葉 I B D フォーラム

2008.7.15、千葉

光永 哲也、吉田英生、Immunologic characterization of enterocolitis associated with Hirschsprung's disease: Deficiency of mucosal immunity in aganglionic intestine、Pacific Association of Pediatric Surgeons、41<sup>st</sup> Annual Meeting、2008.7.1、Lake Lodge (USA)

光永 哲也、吉田英生、消化管粘膜における炎症の客観的評価 微小検体によるサイトカイン環境測定、第 1158 回千葉医学会、2007.12.8、千葉

光永 哲也、吉田英生、サイトカイン環境測定による消化管粘膜における炎症の客観的評価、第 1140 回千葉医学会、2006.12.9、千葉

吉田英生、当科における小児期発症炎症性腸疾患の治療、第 20 回日本小児栄養消化器肝臓学会、2006.10.7、大阪

[図書](計 1 件)

吉田 英生、第 3 版小児科学(共著)、116-123、医学書院、2008

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

吉田 英生 (YOSHIDA HIDEO)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
60210712

### (2)研究分担者

菱木 知郎 (HISHIKI TOMOROU)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
00375776

斎藤 武 (SAITO TAKESHI)  
千葉大学・医学部附属病院・講師  
20406044

光永 哲也 (MITSUNAGA TETSUYA)  
松戸市立病院小児外科・部長  
80375774

### (3)連携研究者