

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2020
課題番号：18K15770
研究課題名（和文）炎症性腸疾患に対して腸管保護作用を有するプロバイオティクス由来の新規物質の探索

研究課題名（英文）The identification of probiotic derived intestinal protection reagents for inflammatory bowel disease

研究代表者
井尻 学見（Ijiri, Masami）

旭川医科大学・大学病院・客員助教

研究者番号：00646078
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト上皮細胞から分泌されるLCN2と菌が産生するSiderophoreの複合体は、過度の炎症から腸管細胞を保護することが知られている。本研究では、各種Siderophoreについて腸管保護作用のマーカ一分子の発現誘導能を解析し、腸管保護作用を発揮するSiderophore Xを同定した。また、そのメカニズムは腸管上皮細胞の分化、成熟を促進することで発揮されていると示唆された。よってSiderophore Xは新規の炎症性腸疾患治療薬として臨床応用される可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロバイオティクスは宿主に有益な作用をもたらす微生物であり、古くから疾患の治療薬として応用可能ではないかと考えられてきた。近年は、糞便移植やプロバイオティクスの組み合わせ投与などにより、疾患を治療する研究が進められている。しかしながら、プロバイオティクスがどのようにして宿主細胞に作用するのかは不明な点が多い。本研究結果により、プロバイオティクス由来物質とヒト由来LCN2による複合体形成を介した新しいhost-microbe interactionの学術分野が創造されるとともに、この複合体を用いた新規腸炎治療薬開発の基盤的成果が得られる。

研究成果の概要（英文）：Previous studies have suggested that Siderophore-LCN2 complexes protect the intestinal cells from excessive inflammations. In this study, we show that siderophores strongly induce intestinal molecules exerting protective effects in the intestine. Then, we found that siderophore X had novel protective functions for the intestine through promoting differentiation and maturation of the epithelial cells. Therefore, siderophore X may be a potential therapeutic agent for protecting intestinal epithelial cells from inflammatory bowel diseases.

研究分野：消化器内科学

キーワード：Siderophore 炎症性腸疾患 腸管保護

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Lipocalin2(LCN2)は腸管上皮や好中球から分泌される蛋白であり、細菌が分泌する金属キレート分子 Siderophore と結合し、細菌の鉄獲得を阻害する。その際形成される Siderophore-LCN2 複合体は、菌による免疫阻害作用や過度の炎症から細胞を保護することが知られている。しかし、LCN2 と結合する菌由来 siderophore は数種類しか同定されておらず、腸管上皮における Siderophore-LCN2 複合体の認識機構や作用機序は不明である。私は乳酸菌由来の Siderophore である Ferrichrome が胃癌細胞に対して抗腫瘍作用を有すること、結合分子のシミュレーション解析により抗炎症作用と関連する複数のヒトタンパク質と相互作用を持つことを明らかにした。

2. 研究の目的

ヒトに対して安全なプロバイオティクスから、LCN2 と結合し抗炎症作用を発揮する結合物質を同定し、その作用機序を解明する。これによりプロバイオティクス由来物質とヒト由来 LCN2 による複合体形成を介した新しい host-microbe interaction の学術分野が創造されるとともに、この複合体を用いた新規腸炎治療薬開発の基盤的成果が得られる。

3. 研究の方法

(1)HSPs 誘導能を持つ Siderophore 類の同定

17種類の Siderophores を大腸上皮細胞株である HCEC-1CT 細胞および Caco2/bbe 細胞に処置し、腸管バリア増強因子である HSPB1 および HSPA1A の発現を誘導する Siderophore を RT-PCR および Western blotting により選別する。

(2)in vitro マンニトール露出試験による Siderophore X による腸管保護作用の検討

トランスウェル上で Caco2/bbe 細胞を腸管上皮用シート状に分化させ、(1)で同定した Siderophore X を管腔側へ 24 時間処置する。続いて 3H 標識マンニトールおよび酸化ストレスを付加し、基底膜側へ漏出したマンニトール量を計測することで腸バリア増強作用を持つかを確認する。

(3)Ex vivo マンニトール露出試験による Siderophore X による腸管保護作用の検討

6~10 週齢のマウスより摘出した小腸に Siderophore X を封入し、2 時間培養する。続いて 3H 標識マンニトールおよび酸化ストレスを付加し、基底膜側へ漏出したマンニトール量を計測することで腸バリア増強作用を持つかを確認する。

(4)Siderophore X による腸管バリア増強作用の作用メカニズムの解明

腸管上皮細胞 Caco2/bbe 細胞に(1)で同定した腸管保護作用を持つ Siderophore X を投与し、mRNA の発現量変化をトランスクリプトーム解析により網羅的に解析する。変化が認められた mRNA を対象にパスウェイ解析を行い細胞シグナル関連分子の活性変化を解析する。

(5)Siderophore X による免疫担当細胞への作用の検討

ヒト末梢血由来単核球 (PBMC) を遠心分離用密度勾配により分離・回収し、CD14 陽性細胞を濃縮した後 M-CSF を添加した培地でマクロファージへと分化させる。LPS でマクロファージを活性化させ、Siderophore X を添加した際の炎症関連サイトカインの発現量変化を解析する。

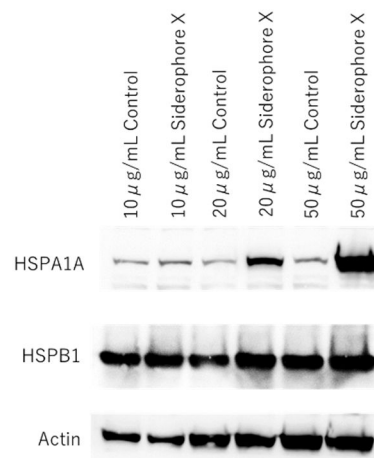
4. 研究成果

(1) HSP 誘導能を持つ Siderophore X の同定

種々の siderophores を腸管上皮細胞に処置したところ Siderophore X は強い HSPs 誘導作用を発揮した (図 1)。

図 1. Western blotting による HSPs 誘導の確認

HCEC-1CT 細胞に Siderophore X を処置し、24 時間後に蛋白質を回収した。Siderophore X は処置濃度依存的に HSPB1 および HSPA1A の発現誘導を認めた。

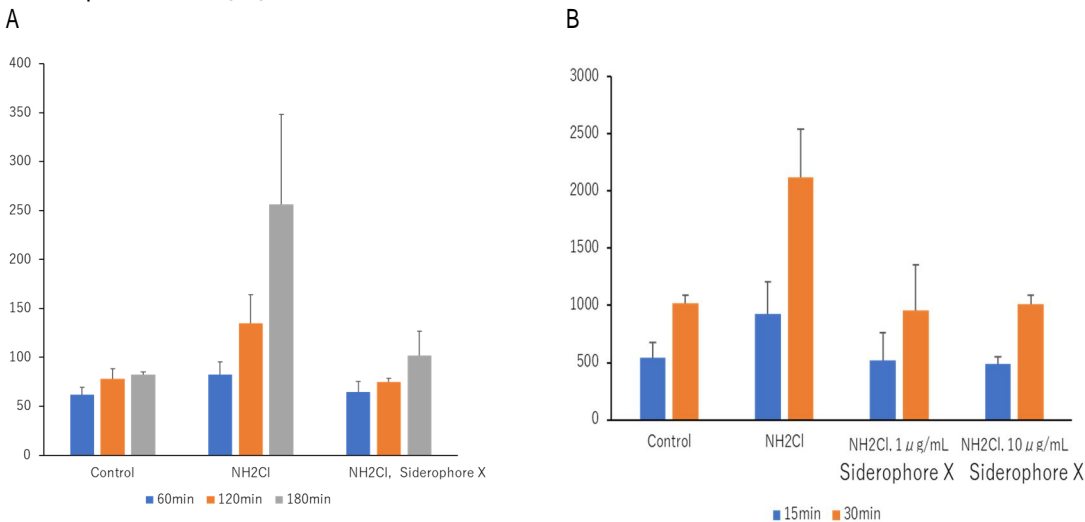


(2) Siderophore X による腸管保護作用の検討

in vitro および Ex vivo 系により Siderophore X の腸管保護作用を検討した。その結果、酸化ストレスによる腸管障害は Siderophore X の処置により改善した (図 2)。

図 2. in vitro および Ex vivo におけるマンニトール露出試験

腸管上皮細胞に Siderophore X を反応させ、酸化ストレスに対する腸管保護活性を検証した。in vitro 試験では 100 μg/mL Siderophore X を (A) Ex vivo 試験においては 1 μg/mL 以上の Siderophore X を (B) 添加した際に腸管保護活性が確認された

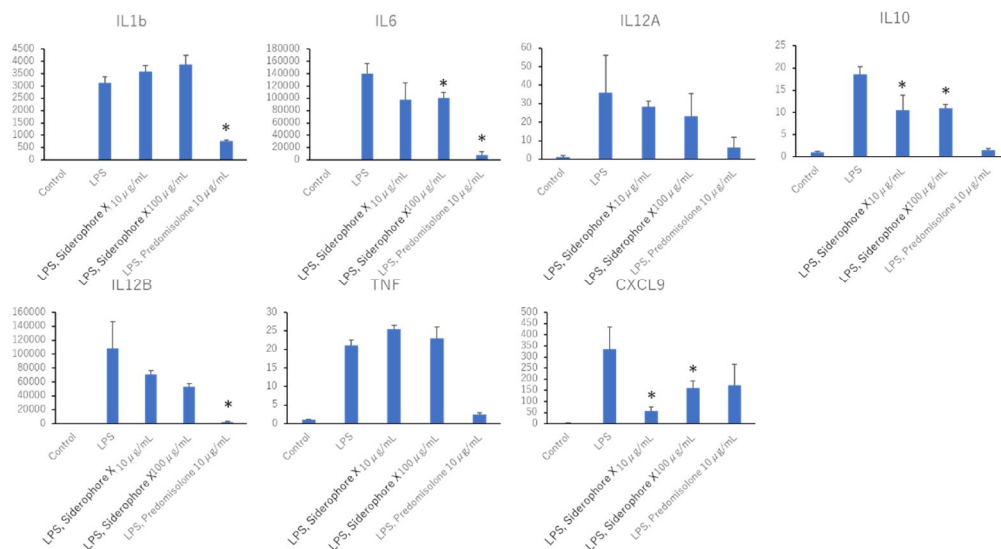


(3) Siderophore X による腸管バリア増強作用の作用メカニズムの解析

腸管上皮細胞である Caco2/bbe 細胞に Siderophore X を添加し、24 時間後に RNA を回収後、トランスクリプトーム解析を行った。MetaCore ソフトを用いたパスウェイ解析を行ったところ、細胞の分化を促進するシグナルが変動していることが明らかになった。これにより腸管上皮の成熟が促進され腸管バリアの増強作用が生じているものと推察された。

(5) Siderophore X による免疫担当細胞への作用の検討

ヒト末梢血由来単核球 (PBMC) より構築したマクロファージを LPS で活性化させ、Siderophore X を添加した。その結果 IL6、IL10、IL12B、CXCL9 といった炎症関連サイトカインの発現量が有意に改善した。一方で、プレドニゾロンと比較するとその炎症関連サイトカインの改善作用は弱く、Siderophore X はマクロファージに対する免疫反応の不活化作用ではなく、腸管保護作用を主として発揮する分子であることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Kita Akemi, Fujiya Mikihiro, Konishi Hiroaki, Tanaka Hiroki, Kashima Shin, Iwama Takuya, Ijiri Masami, Murakami Yuki, Takauji Shuhei, Goto Takuma, Sakatani Aki, Ando Katsuyoshi, Ueno Nobuhiro, Ogawa Naoki, Okumura Toshikatsu | 4. 巻 57 |
| 2. 論文標題 Probiotic derived ferrichrome inhibits the growth of refractory pancreatic cancer cells | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Oncology | 6. 最初と最後の頁 721～732 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2020.5096 | 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 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Ijiri Masami, Lee Alex Q., Rodriguez Ryan, Gandour-Edwards Regina, Lee Joyce, Tepper Clifford G., Li Yueju, Beckett Laurel, Lam Kit, Goodwin Neal, Satake Noriko | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Novel Patient Metastatic Pleural Effusion-Derived Xenograft Model of Renal Medullary Carcinoma Demonstrates Therapeutic Efficacy of Sunitinib | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Oncology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2021.648097 | 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 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Ijiri Masami, Sasaki Takahiro, Fujiya Mikihiro, Iwama Takuya, Murakami Yuki, Takahashi Keitaro, Tanaka Kazuyuki, Ando Katsuyoshi, Ueno Nobuhiro, Kashima Shin, Moriichi Kentaro, Tanabe Hiroki, Saito Yusuke, Okumura Toshikatsu | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 The efficacy of the submucosal injection of lidocaine during endoscopic submucosal dissection for colorectal neoplasms: a multicenter randomized controlled study | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Surgical Endoscopy | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00464-020-08017-1 | 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 - |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Moriichi K, Fujiya M, Kobayashi Y, Murakami Y, Iwama T, Kunogi T, Sasaki T, Ijiri M, Takahashi K, Tanaka K, Sakatani A, Ando K, Nomura Y, Ueno N, Kashima S, Ikuta K, Tanabe H, Mizukami Y, Saitoh Y, Okumura T. | 4. 巻 24(6) |
| 2. 論文標題 Autofluorescence Imaging Reflects the Nuclear Enlargement of Tumor Cells as well as the Cell Proliferation Ability and Aberrant Status of the p53, Ki-67, and p16 Genes in Colon Neoplasms. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Molecules | 6. 最初と最後の頁 1106 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24061106. | 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 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Takahashi K, Fujiya M, Ueno N, Saito T, Sugiyama Y, Murakami Y, Iwama T, Sasaki T, Ijiri M, Tanaka K, Sakatani A, Ando K, Nomura Y, Kashima S, Goto M, Moriichi K, Okumura T. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 White coat status is a predictive marker for post-esophageal endoscopic submucosal dissection stricture: a retrospective study. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Esophagus. | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10388-019-00659-y. | 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 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Ando K, Fujiya M, Nomura Y, Inaba Y, Sugiyama Y, Kobayashi Y, Iwama T, Ijiri M, Takahashi K, Ueno N, Kashima S, Moriichi K, Tanabe H, Mizukami Y, Akasaka K, Fujii S, Yamada S, Nakase H, Okumura T. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 The Incidence and Risk Factors of Venous Thromboembolism in Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Prospective Multicenter Cohort Study. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Digestion. | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000495289. | 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Ando K, Fujiya M, Nomura Y, Inaba Y, Sugiyama Y, Iwama T, Ijiri M, Takahashi K, Tanaka K, Sakatani A, Ueno N, Kashima S, Moriichi K, Mizukami Y, Okumura T. | 4. 巻 16(3) |
| 2. 論文標題 The incidence and risk factors of venous thromboembolism in Japanese inpatients with inflammatory bowel disease: a retrospective cohort study. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Intest Res. | 6. 最初と最後の頁 416-425 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5217/ir.2018.16.3.416. | 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 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Fujiya M, Kashima S, Sugiyama Y, Iwama T, Ijiri M, Tanaka K, Takahashi K, Ando K, Nomura Y, Ueno N, Goto T, Moriichi K, Mizukami Y, Okumura T, Sasajima J, Fujishiro D, Okamoto K, Makino Y. | 4. 巻 10:22 |
| 2. 論文標題 Takayasu's arteritis associated with eosinophilic gastroenteritis, possibly via the overactivation of Th17. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Gut Pathog. | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13099-018-0251-z | 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 - |

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 小林 裕, 井尻 学見, 盛一 健太郎, 齊藤 成亮, 岩間 琢哉, 高橋 慶太郎, 安藤 勝祥, 野村 好紀, 上野 伸展, 嘉島 伸, 藤谷 幹浩, 奥村 利勝 |
| 2. 発表標題 通常内視鏡およびAFIによる潰瘍性大腸炎の再燃予測 |
| 3. 学会等名 JDDW2018 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小林裕, 高橋慶太郎, 杉山雄哉, 岩間琢哉, 井尻学見, 安藤勝祥, 野村好紀, 上野伸展, 嘉島伸, 盛一健太郎, 水上裕輔, 藤谷幹浩, 奥村利勝 |
| 2. 発表標題 FAP患者における胃底腺ポリポージス合併早期胃癌の1例 - NBIの有用性を中心に |
| 3. 学会等名 第116回日本消化器内視鏡学会北海道支部例会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堀内正史, 野村好紀, 小林裕, 杉山雄哉, 岩間琢哉, 佐藤裕基, 井尻学見, 高橋慶太郎, 河端秀賢, 林明宏, 安藤勝祥, 上野伸展, 後藤拓磨, 嘉島伸, 笹島順平, 盛一健太郎, 藤谷幹浩, 奥村利勝 |
| 2. 発表標題 リンパ節からのEUS-FNAにて診断し得たエキノコックス症の一例 |
| 3. 学会等名 第121回日本消化器病学会北海道支部例会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岩間琢哉, 盛一健太郎, 齊藤成亮, 杉山雄哉, 佐藤裕基, 岡田哲弘, 井尻学見, 高橋慶太郎, 河端秀賢, 林明宏, 安藤勝祥, 野村好紀, 上野伸展, 嘉島伸, 後藤拓磨, 笹島順平, 水上裕輔, 藤谷幹浩, 奥村利勝 |
| 2. 発表標題 大腸上皮性腫瘍に対する自家蛍光内視鏡の組織学的・分子生物学的特徴の予測 |
| 3. 学会等名 第121回日本消化器病学会北海道支部例会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 齊藤成亮, 上野伸展, 小林裕, 杉山雄哉, 岩間琢哉, 佐藤裕基, 井尻学見, 高橋慶太郎, 河端秀賢, 林明宏, 安藤勝祥, 野村好紀, 後藤拓磨, 嘉島伸, 盛一健太郎, 水上裕輔, 藤谷幹浩, 奥村利勝 |
| 2. 発表標題 消化管病変に起因する脾腫によって汎血球減少を呈したクローン病の一例 |
| 3. 学会等名 第121回日本消化器病学会北海道支部例会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 杉山雄哉, 上野伸展, 小林裕, 岩間琢哉, 佐藤裕基, 井尻学見, 高橋慶太郎, 安藤勝祥, 林明宏, 川端秀賢, 野村好紀, 嘉島伸, 後藤拓磨, 笹島順平, 高氏修平, 盛一健太郎, 水上裕輔, 藤谷幹浩, 奥村利勝 |
| 2. 発表標題 QOLの観点から検討したインフリキシマブバイオシミラー投与の妥当性 |
| 3. 学会等名 第121回日本消化器病学会北海道支部例会 |
| 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|