

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11513

研究課題名(和文) 粘膜関連細菌叢と粘膜バリアを標的とした生活習慣病への治療応用

研究課題名(英文) Therapeutic application of lifestyle-related diseases targeting mucosa-associated microbiota and mucosal barrier

研究代表者

堅田 和弘 (Katada, Kazuhiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60593910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病などの様々な疾患の発症や進展に、腸内細菌叢の変容は密接に関連している。腸内細菌叢の変容がもたらす腸管の恒常性の破綻について研究が進められているが、腸管粘膜上皮に密接に関わる粘膜関連細菌叢や粘膜バリアについて十分解明されていない。本研究では、非アルコール性脂肪性肝疾患、腸管炎症、粘膜バリア障害等のモデルを用いて、水溶性食物繊維、ヘムオキシナーゼや一酸化炭素、フェロトシス制御、酸化チタンによる炎症制御や粘膜バリア制御の機構および腸内細菌叢や粘膜関連細菌叢の変容について解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病などの様々な疾患の発症や進展に、腸内細菌叢の変容は密接に関連しており、腸内細菌叢を標的とした研究の進歩は凄まじい。一方、腸管粘膜上皮の恒常性に密接に関わる粘膜関連細菌叢や粘膜バリアについての研究は不十分である。本研究では、生活習慣病等のモデルを用い、水溶性食物繊維、一酸化炭素、鉄、酸化チタンによる、炎症制御機構や粘膜バリアへの影響、腸内細菌叢や粘膜関連細菌叢の変容について検討を行った。粘膜関連細菌叢や粘膜バリアを標的とした生活習慣病への治療応用につながる研究となった。

研究成果の概要(英文)：Gut microbiota is closely related to the pathogenesis and development of various diseases such as lifestyle diseases. There are many studies regarding the disruption of gut homeostasis due to the altered gut microbiota; however, mucosa-associated microbiota (MAM) and mucosal barrier are not fully investigated in this field. Herein, in the present study, we demonstrated that the intestinal inflammation, mucosal barrier, gut microbiota and MAM were changed and controlled by water-soluble dietary fiber, heme oxygenase and carbon monoxide, ferroptosis inhibitor, and titanium dioxide in the models of non-alcoholic fatty liver, intestinal inflammation, and leaky gut syndrome.

研究分野：消化器病学、粘膜バリア学

キーワード：生活習慣病 粘膜関連細菌叢 粘膜バリア 腸管粘膜上皮機能

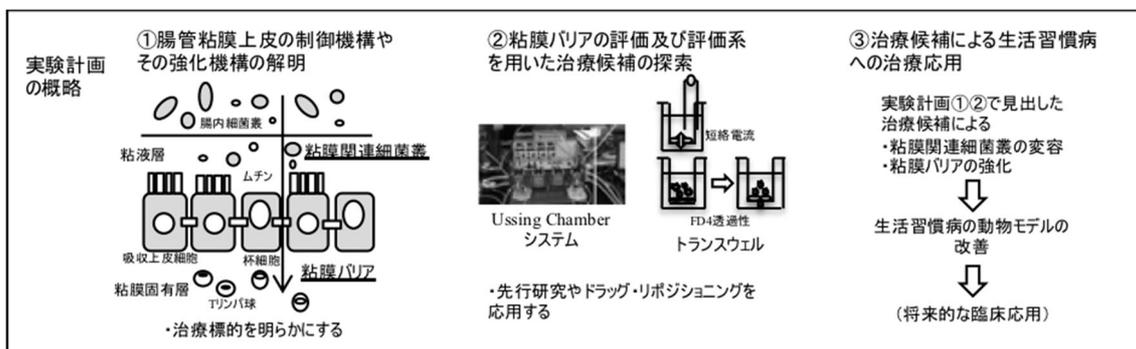
### 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病などの様々な疾患において、腸内細菌叢の変容はその病態の発症・進展に密接に関連している。腸内細菌叢の変容がもたらす腸管恒常性の破綻について研究が進められているが、腸管粘膜上皮に密接に関わる粘膜関連細菌叢や粘膜バリアについて十分解明されていない。生活習慣病やリーキーガット症候群の動物モデルやUssing chamber システムを用いて、粘膜関連細菌叢や粘膜バリアを介した腸管粘膜上皮の制御機構を解明した先行研究を進展させ、本研究では、粘膜関連細菌叢の変容や粘膜バリアの強化に資する機構を解明し、治療標的のスクリーニングを行い、粘膜関連細菌叢や粘膜バリアを標的とした生活習慣病への治療応用を行う。

### 2. 研究の目的

生活習慣病をはじめとした様々な疾患において腸内細菌叢の変容がその病態の発症・進展に密接に関連していることが明らかとなった。しかしながら、腸内細菌叢の変容がもたらす腸管恒常性の破綻において、腸管粘膜上皮により密接に関わる粘膜関連細菌叢や粘膜バリアについては十分に解明されていないのが現状である。本研究では、生活習慣病やリーキーガット症候群の動物モデルを用いて、粘膜関連細菌叢や腸管バリアを介した腸管粘膜上皮の制御機構およびその強化機構を解明する。またトランスウェルやUssing chamber を用いた腸管粘膜上皮における粘膜バリアの評価系を基に、先行研究での成果、ドラッグ・リポジショニングを応用し、治療標的のスクリーニングを行い、粘膜関連細菌叢の変容や粘膜バリアの強化を引き起こす候補薬剤を見出し、将来的な生活習慣病への治療応用に繋がることを目的とする。

### 3. 研究の方法



#### 1. 生活習慣病・リーキーガット症候群の動物モデルにおける粘膜関連細菌叢や粘膜バリアを介した腸管粘膜上皮の制御機構やその強化機構の解明

生活習慣病の動物モデル(db/db 糖尿病マウス、高脂肪食負荷マウス等)を用いて、粘膜関連細菌叢のメタゲノム解析を次世代シーケンサー(Miseq)を用いて、粘液中の短鎖脂肪酸をイオン排除高速液体クロマトグラフィー法で、粘液量と抗 Muc2 抗体による免疫染色で、消化管バリア機能を Cr-EDTA クリアランス法で、タイトジャンクション関連蛋白を免疫組織化学および電気泳動法を用いて、解析する。リーキーガット症候群を呈する動物モデル(低濃度デキストラン硫酸ナトリウム、酸化チタンを用いた腸管バリアの破綻による動物モデル、ポリソルベート 80 を用いた粘液層の減少による動物モデル)を作成し、同様に粘膜関連細菌叢及び粘膜バリア機能に関する検討を行う。上記結果を統合評価し、粘膜関連細菌叢や粘膜バリアを介した腸管粘膜上皮における制御機構や強化機構を明らかにし、その結果から腸管粘膜上皮の強化に向けた治療標的を見出す。

#### 2. トランスウェルやUssing chamberによる粘膜バリアの評価及び先行研究やドラッグ・リポジショニングを応用した治療候補の探索

各動物モデル(糖尿病モデル、高脂肪食モデル、腸管バリア破綻モデル、透過性亢進をきたすノックアウトマウスを用いた検討、等)を用いてUssing chamberを用いた粘膜バリア機能の評価を行う。小腸の粘膜-粘膜下組織標本を作成しUssing chamberに装着し、粘膜上皮組織のイオン透過性(短絡電流)や高分子透過性(FITC 標識デキストラン透過性)を測定する。トランスウェル上に大腸上皮細胞を重層培養し、経上皮抵抗 TEER や FD4 透過性を測定する。先行研究やドラッグ・リポジショニングによる候補薬剤を用いて、トランスウェルを用いた in-vitro での細胞実験やUssing chamberによるEx-vivo検討を行い、粘膜バリア機能の強化に資する治療標的をスクリーニングし、治療候補を見出す。

#### 3. 治療候補による生活習慣病への治療応用の検証

治療標的や標的薬物が、粘膜関連細菌叢の変容や粘膜バリアの強化を引き起こし、生活習慣病を改善させるかについて、動物モデルを用いて検証する。その結果を基にヒトでの臨床検討に向

けた研究基盤をさらに確立することを目的とする。

1、2、3ともに、研究代表者が、研究協力者の協力のもと、動物実験や細胞実験を行う。研究分担者が、研究協力者の協力のもと腸内細菌叢解析を行う。研究代表者及び研究分担者が、実験データの解析、学会発表、論文作成を行う。腸内細菌研究の専門研究者及び粘膜バリア研究の専門研究者である研究協力者からの助言のもと研究を進めていく。

#### 4. 研究成果

1.生活習慣病・リーキーガット症候群の動物モデルにおける粘膜関連細菌叢や粘膜バリアを介した腸管粘膜上皮の制御機構やその強化機構の解明

腸管粘膜バリアの破綻による非アルコール性脂肪性肝疾患モデルを用いて、水溶性食物繊維による炎症制御、粘膜バリアの強化、腸内細菌叢や短鎖脂肪酸の変容の機構について検討し、論文報告した (World Journal of Gastroenterology, 2021)。腸管炎症におけるヘムオキシゲナーゼや一酸化炭素炭素を介した炎症制御や粘膜バリア制御機構について検討し、論文報告した (Antioxidants, 2022)。また、腸管バリア破綻動物モデルを用いて粘膜バリア障害におけるフェロトシスの役割について検討し、学会報告した (日本微小循環学会シンポジウム 2024)。高脂肪食負荷マウスにポリソルベート 80 を併用した動物モデルを用いて、粘膜バリアの破綻による生活習慣病の進展機構について検討し、粘液層を介した粘膜保護効果についての検討を進めているが、現時点で学会発表には至っていない。また、酸化チタンによる粘膜バリアの破綻を介した腸管炎症の増悪機構について検討を進め、粘膜バリアや粘膜関連細菌叢の変容による影響を解明し、現在論文投稿中である (未受理)。

このように、生活習慣病・リーキガット症候群の動物モデルを用いて、粘膜関連細菌叢や粘膜バリアを介した腸管粘膜上皮の制御機構やその強化機構について検討し、一部解明できた。未解明および継続検討中の機構については、今後さらに検討を進めていきたい。

2.トランスウェルや Ussing chamber による粘膜バリアの評価及び先行研究やドラッグ・リポジショニングを応用した治療候補の探索

Ussing chamber による粘膜バリアの評価について、高脂肪食負荷マウスや酸化チタンやポリソルベート 80 を用いた粘膜バリア破綻モデルの小腸の粘膜-粘膜下組織標本を用いて検討を行った。酸化チタンによる粘膜バリア破綻についての Ussing chamber での検討結果については、酸化チタンによる透過性亢進機構について明らかにでき、上記論文に投稿中である。また、粘膜バリア破綻モデルの小腸の粘膜-粘膜下組織標本を用いて、また腸管上皮細胞を重層培養したトランスウェルを用いて、当研究室保有の既存薬 (粘膜保護薬、潰瘍薬、抗炎症薬など) を用いて予備的な検討を行ったが、粘膜バリアの強化を強く示す候補を見出すことには至らなかった。未検討の他の効能の薬剤各種についての予備検討を今後進めていく予定である。

このように、引き続き検討中ではあるが、現状残念ながら、粘膜バリア機能の強化に資する有益な治療候補を見出すには至っていない。引き続き既存薬を用いた治療候補のスクリーニングを進め、治療候補を見出していく。

3.治療候補による生活習慣病への治療応用の検証

生活習慣病として何れの疾患をターゲットにするかにもよるが、非アルコール性脂肪性肝疾患に対しては、動物モデルでの検討で水溶性食物繊維による疾患抑制効果について報告できた。ヒトでの水溶性食物繊維の効果の検討については、水溶性食物繊維がすでに一般に服用可能なものであり、安全性は担保されており、今後の臨床での検討を進めていきたい。

粘膜バリアの破綻による生活習慣病の発症や進展について、粘膜バリアの強化を標的とした検討を進め、粘膜バリアに対するヘムオキシゲナーゼや一酸化炭素による保護効果、および酸化チタンやポリソルベート 80 による増悪効果について動物モデルで明らかにできた。特に酸化チタンは顔料として、ポリソルベート 80 は乳化剤として広く使用されているものであり、医薬品や食品で使用され、安全性が担保されている。動物実験とは容量も異なり、ヒトでの生活習慣病への影響についての検討については課題も多いが、引き続き検討を進めていく。

このように、生活習慣病への臨床応用については現状まだまだ先ではあるが、臨床応用に向けた基盤となるように研究を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Uchiyama Kazuhiko, Takagi Tomohisa, Mizushima Katsura, Asaeda Kohei, Kubota-Kajiwara Mariko, Sugaya Takeshi, Kashiwagi Saori, Minagawa Yuki, Hotta Yuma, Tanaka Makoto, Inoue Ken, Katada Kazuhiro, Kamada Kazuhiro, Ishikawa Takeshi, Yasuda Hiroaki, Konishi Hideyuki, Kishimoto Mitsuo, Naito Yuji, Itoh Yoshito | 4. 巻<br>8           |
| 2. 論文標題<br>Clinical Background Factors as Predictors of the Efficacy of 5-Aminosalicylic Acid Suppositories in Patients with Ulcerative Colitis   | 5. 発行年<br>2023年     |
| 3. 雑誌名<br>Inflammatory Intestinal Diseases  | 6. 最初と最後の頁<br>84～90 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1159/000533543  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Yasuda Ritsu, Kamada Kazuhiro, Murakami Takaaki, Inoue Ryo, Mizushima Katsura, Hirose Ryohei, Inoue Ken, Dohi Osamu, Yoshida Naohisa, Katada Kazuhiro, Uchiyama Kazuhiko, Handa Osamu, Ishikawa Takeshi, Takagi Tomohisa, Konishi Hideyuki, Naito Yuji, Itoh Yoshito | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Astaxanthin attenuated the stress-induced intestinal motility disorder via altering the gut microbiota  | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>International Journal for Vitamin and Nutrition Research   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1024/0300-9831/a000756   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Takayama Shun, Katada Kazuhiro, Takagi Tomohisa, Iida Takaya, Ueda Tomohiro, Mizushima Katsura, Higashimura Yasuki, Morita Mayuko, Okayama Tetsuya, Kamada Kazuhiro, Uchiyama Kazuhiko, Handa Osamu, Ishikawa Takeshi, Yasukawa Zenta, Okubo Tsutomu, Itoh Yoshito, Naito Yuji | 4. 巻<br>27              |
| 2. 論文標題<br>Partially hydrolyzed guar gum attenuates non-alcoholic fatty liver disease in mice through the gut-liver axis   | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>World Journal of Gastroenterology  | 6. 最初と最後の頁<br>2160～2176 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3748/wjg.v27.i18.2160  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Katada Kazuhiro, Takagi Tomohisa, Iida Takaya, Ueda Tomohiro, Mizushima Katsura, Fukui Akifumi, Okayama Tetsuya, Kamada Kazuhiro, Uchiyama Kazuhiko, Ishikawa Takeshi, Naito Yuji, Itoh Yoshito | 4. 巻<br>11              |
| 2. 論文標題<br>Role and Potential Mechanism of Heme Oxygenase-1 in Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury   | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Antioxidants  | 6. 最初と最後の頁<br>559 ~ 559 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/antiox11030559  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kazuhiro katada, Tomohisa Takagi, Tasushi Omatsu, Kazuhiro Kamada, Kazuhiko Uchiyama, Yuji Naito. |
| 2. 発表標題<br>Role of ferroptosis in intestinal ischemia-reperfusion injury.                                    |
| 3. 学会等名<br>第49回日本微小循環学会総会  |
| 4. 発表年<br>2024年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>堅田和弘、高木智久、高山峻、水島かつら、平井泰子、菅谷武史、福居顕文、岡山哲也、内山和彦、内藤裕二 |
| 2. 発表標題<br>大腸癌進行予測におけるヘムオキシゲナーゼ-1の有用性の検討                     |
| 3. 学会等名<br>第76回日本酸化ストレス学会学術集会                                |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kazuhiro Katada, Tomohisa Takagi, Kazuhiro Kamada, Kazuhiko Uchiyama, Yuji Naito                     |
| 2. 発表標題<br>Role and potential mechanism of action of heme oxygenase-1 in intestinal ischemia-reperfusion injury |
| 3. 学会等名<br>第48回日本微小循環学会総会   |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kazuhiro Katada, Tomohisa Takagi, Kazuhiro Kamda, Yuji Naito   |
| 2. 発表標題<br>The role and potential mechanisms of heme oxygenase-1 on ischemia/reperfusion-challenged intestinal injury in mice |
| 3. 学会等名<br>第46回日本微小循環学会総会   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                             | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 高木 智久<br><br>(Takagi Tomohisa)<br><br>(70405257) | 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授<br><br><br><br>(24303) |    |

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|------------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 水島 かつら<br><br>(Mizushima Katsura)  |                       |    |
| 研究協力者 | 井上 亮<br><br>(Inoue Ryo)            |                       |    |
| 研究協力者 | 唐木 晋一郎<br><br>(Karakai Shinichiro) |                       |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|