

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21700757

研究課題名 (和文)

食生活の偏りが消化器疾患関連遺伝子の発現に及ぼす影響と腸内菌叢の関わりについて

研究課題名 (英文)

Effect of unbalanced diet on expression of gut disease-associated gene and intestinal microflora

研究代表者

有持 秀喜 (ARIMOCHI HIDEKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：30311822

研究成果の概要 (和文)：

Bacteroides fragilis、B. vulgatus、B. thetaiotaomicron をヒト大腸癌細胞に付着させ、産生されるマトリックスメタロプロテアーゼおよびサイトカイン量を測定すると発現誘導に差がみられ、また、同一菌種であっても菌株によって大きく異なったことから、疾患の発症・増悪に関与するタンパク質の発現は腸内菌によって変動することが明らかとなり、そのパターンは非常に複雑であることがわかった。

研究成果の概要 (英文)：

Bacteroides fragilis, B. vulgatus, and B. thetaiotaomicron were attached on colon tumor cells, then matrix metalloprotease and cytokines produced by the cells were determined. These bacteria could induce these proteins but the level and the pattern of the proteins was quietly different. The differences of the expression pattern were also observed after challenging with distinct strains in one species of bacteria. These results suggest that proteins associated with development of intestinal disease are affected by bacteria attached on intestinal epithelial cells, and their expression pattern is very complicated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：腸内細菌、大腸癌細胞、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

現在の日本では食生活が従来の日本型か

らアメリカ型に移行しつつあり、ファーストフードやジュースなどの過食による脂肪、蔗糖の摂取過多、野菜不足による食物繊維の不足など、いわゆる食生活の偏り、乱れが起きている。近年、アレルギー疾患や過敏性大腸炎、潰瘍性大腸炎、大腸癌などの腸疾患が増加しているが、食生活の乱れによる腸内環境の悪化が要因の一つであると考えられる。

腸管は外界から栄養を獲得するための器官であると同時に、腸管上皮細胞どうしを強固に結びつけ、さらに粘液を分泌することで物理的なバリアーを作り、食物由来の異物や腸内菌の侵入を防ぐ仕組みを発達させている。腸内菌は、腸管内の全域に常在菌として住み着き、利用できる栄養成分の違いや腸内環境に合わせて住み分けし、優勢菌も少数菌も相互に抑制しあいつつ、一定の菌数を保っている。500種、10兆個存在している腸内菌はヒトに必要なビタミンや大腸粘膜の栄養源となる短鎖脂肪酸を合成し、腸粘膜表面において有害な病原菌の接着を阻害するなどしてヒトとの間に共生関係を保っている。

しかし、ヒトの腸内菌叢は食事、加齢、運動、ストレス、感染症、抗生物質の服用など様々な要因に影響を受ける。腸内菌叢の変化は食事内容に由来する腸内菌代謝産物の変動につながり、腸管上皮細胞に対して毒性を示す代謝産物の増加は腸内環境の悪化につながる。また、宿主細胞は病原体関連分子パターン (PAMPs) と呼ばれる微生物固有の構造を認識するのに必要な受容体 (PRR) を持っており、上皮細胞は PRR を介して付着した細菌とクロストークを行う。腸管上皮細胞に定着した腸内常在菌が宿主に対して過剰な免疫応答が起こらないようシグナルを送ることで炎症性腸疾患を抑えることが報告され、腸管上皮細胞に接着した腸内菌は宿主細胞の遺伝子発現に影響を与えていることが

明らかとなった。また、我々の研究グループでも腸内常在菌がヒト大腸由来上皮細胞に対して、腸管の再構成、血管新生、免疫細胞の浸潤、がん細胞の転移など様々な生理学的、病理学的現象に重要な役割を果たすマトリックスメタロプロテアーゼの発現に影響を与えることを明らかにしている。従って腸内菌の構成が変動しにくい人ほど腸疾患やアレルギー疾患にかかりにくく、逆に食生活の乱れにより腸内菌のバランスが崩れやすい人では巧妙な共生関係が保てなくなり、ストレスの増加などが重なると容易にアレルギー疾患や腸疾患などの発症、増悪が起こるものと考えられ、ヒトの健康を維持する上でも疾病を予防する上でも腸内菌のバランスが健全に保たれることが重要であるといえる。しかし、食生活の乱れによる腸内菌叢の変動は複雑であり、健康への悪影響に関する詳細な機序は不明な点も多い。

2. 研究の目的

腸管における遺伝子発現の変化は潰瘍性大腸炎や大腸癌の発症や増悪に関与している。そこで付着した腸内菌の種類によって腸管上皮細胞によるマトリックスメタロプロテアーゼやサイトカインといった消化器疾患関連タンパクの発現パターンがどのように変化するのかを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 菌液の調製

腸内優勢菌である *Bacteroides* 属 3 菌種 8 菌株 (*B. fragilis* 3 菌株、*B. vulgatus* 3 菌株、*B. thetaiotaomicron* 2 菌株) を GAM 培地 (日水製薬) で一晩培養した後で菌体を回収し、Phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄後、PBS に再懸濁して菌懸濁液を調製した。菌の濃度は菌懸濁液の 600 nm における吸光度が 1 となるように調整した。

(2) マトリックスメタロプロテアーゼ活性の測定

マトリックスメタロプロテアーゼの活性はザイモグラフィを用いて測定した。即ち、大腸癌細胞である HT-29 および HCT116 を 10% FBS を含む DMEM 培地 (和光純薬工業) 中で、80%以上 confluent になるまで 6-well plate で培養した後、血清を含まない培地に交換し、菌懸濁液を 1/10 倍量加えて、CO₂ インキュベーターで 14 時間保温した。その後、培養上清を回収してろ過滅菌を行い、凍結乾燥して 10 倍に濃縮した。濃縮した培養上清を 1%ゼラチン (Sigma) 含有ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、その後、ゲルを緩衝液中で一晩、37 度で保温してから CB G-250 (和光純薬工業) で染色を行った。

(3) サイトカインの定量

大腸癌細胞である HT-29 および HCT116 を 80%以上 confluent になるまで 6-well plate で培養した後、菌懸濁液を 1/10 倍量加えて、CO₂ インキュベーターで 14 時間保温し、菌を付着させた。その後、培養上清を回収してろ過滅菌を行い、サイトカインの測定まで -20 度で保存した。測定したサイトカインは炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6、抗炎症性サイトカインである IL-10、TGF- β 1 で、測定にはこれらのサイトカインを定量する専用の ELISA キット (SABiosciences corporation 他) を用いた。

4. 研究成果

(1) マトリックスメタロプロテアーゼ活性に与える Bacteroides の影響

腸内常在菌の主要な菌種である Bacteroides 属がヒト大腸由来上皮細胞に対して、腸管の再構成、血管新生、免疫細胞の浸潤、がん細胞の転移など様々な生理学的、病理学的現象に重要な役割を果たすマトリ

ックスメタロプロテアーゼ (MMP) の発現に与える影響を調べた。その結果、*B. vulgatus* および *B. thetaiotaomicron* はヒト大腸癌細胞である HT-29 および HCT116 に対して MMP-2 の発現を誘導するが、*B. fragilis* は誘導しないことが明らかとなった。*B. thetaiotaomicron* による MMP-2 の誘導効果は大腸癌細胞に先に *B. fragilis* を付着させることで見られなくなったが、*B. vulgatus* には *B. fragilis* に見られたような MMP-2 誘導抑制効果はなかった。*B. vulgatus* および *B. thetaiotaomicron* による MMP-2 誘導効果はこれらの菌体の無細胞抽出物でも見られたが、加熱処理することによってその効果が失われた。また、*B. vulgatus* の菌体と大腸癌細胞をトランスウェルを用いて非接触にすると MMP-2 の発現誘導が見られなかったことから、菌体のタンパク質成分のような易熱性成分が細胞に直接働きかけることによって MMP-2 の発現を誘導していると考えられた。

(2) サイトカイン産生に与える Bacteroides の影響

B. fragilis を HT29 細胞に接触させた場合、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6、抗炎症性サイトカインである IL-10 の誘導が見られ、逆に TGF- β 1 は産生が抑制された。TGF- β 1 の産生抑制は HCT116 細胞でも見られた。HT29 細胞に *B. vulgatus* を接触させたときには IL-10 の産生誘導が見られ、HCT116 細胞に接触させた場合は IL-10、TNF- α 、IL-6 の産生誘導、および TGF- β 1 の産生抑制が観察された。*B. thetaiotaomicron* を HT29 細胞に接触させた場合、TNF- α 、IL-10 の誘導、および TGF- β 1 の抑制が観察されたが、HCT116 細胞に対しては影響を与えなかった。また、同一菌種であっても菌株によってサイトカイン発現に対する影響が大きく異なった。

(3) まとめ

以上の結果より、疾患の発症や増悪に重大な影響を与えるマトリックスメタロプロテアーゼやサイトカインの発現は腸管上皮細胞に接着した腸内菌の種類によってパターンが変化することがわかり、宿主細胞の遺伝子発現パターンが付着・定着する腸内菌によって影響を受けることを示唆する結果であった。しかし、その発現パターンは関与する腸内菌と宿主細胞の組み合わせによって大きく変動しており、非常に複雑であることから、食生活の偏りなどによる腸内菌叢の変化と腸管粘膜細胞における疾患関連遺伝子の発現変化の関係を明らかにするため、さらに研究を進めていかなければならない。

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0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有持 秀喜 (ARIMOCHI HIDEKI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：30311822

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：