

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11597

研究課題名（和文）シンバイオテイクスの粘膜免疫機構を活かした自己免疫疾患の予防・治療に関する研究

研究課題名（英文）Research on the prevention and treatment of synbiotheics for autoimmune diseases via the mucosal immune.

研究代表者

久保 薫 (Kubo, Kaoru)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20254493

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）：シンバイオテイクスの関節リウマチへの改善効果を目的に、2%グルタミン、3.2%ポリデキストロース、3%ラクチュロースを含むセルロース欠乏AIN-93Gに5% Bifidobacterium longumを添加した特殊飼料GFOBの8週間摂取によるアジュバント関節炎の軽減効果の再現性を検討した。アジュバント関節炎誘発後に軟便又は下痢を呈する個体が現れ、再現性は得られなかった。次にコラーゲン関節炎モデルで検討し、個体の不調は現れないが軽減効果は得られなかった。GFOB摂取により血清中エンドトキシン濃度が低下する傾向にあったが、ZO-1の発現に影響はなく、盲腸内のIgA量の増加は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シンバイオテイクス【GFOB, G:グルタミン, F:食物繊維（ポリデキストロース）, O:オリゴ糖（ラクチュロース）, B:ビフィズス菌の混合物（混合比率：2%: 3.2%: 3%: 5%）】の8週間給餌によりLewis系ラットのアジュバント関節炎の腫脹と骨破壊が有意に軽減されることを見出した。加えて、腸内細菌叢のBacteroidetes門とFirmicutes門の不均衡が改善され、酢酸と酪酸の糞便中濃度が有意に増加した。シンバイオテイクスは、扱いやすくヒトへの安全性が高く、さらなる研究開発により、食品製造分野や医薬製造分野での製品化への可能性は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：For the purpose of improving the effect of symbiotheics on rheumatoid arthritis, we examined the reproducibility of the reduction effect of adjuvant arthritis by ingestion of GFOB, a special feed containing 5% bifidobacterium longum to cellulose deficiency AIN-93G containing 2% glutamine, 3.2% polydextrose, and 3% lactulose. Individuals with loose stools or diarrhea appeared after induction of adjuvant arthritis, and reproducibility was not obtained. Next, a collagen arthritis model was examined, and although no individual disorder appeared, no alleviating effect was observed. GFOB intake tended to lower serum endotoxin levels, but did not affect the expression of ZO-1 and did not increase the amount of IgA in the cecum.

研究分野：実験動物学

キーワード：シンバイオテイクス 関節リウマチ 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患、なかでも関節リウマチ患者は高齢化社会の進行とともに増加しており、根治的な予防・治療法の開発が急務である。近年、腸内細菌と関節リウマチの発症・進展との関連に関して研究が進められているが、予防・治療方法には至っていない。

これまでシンバイオティクス【GFOB, G:グルタミン, F:食物繊維(ポリデキストロース), O:オリゴ糖(ラクチュロース), B:ビフィズス菌の混合物】の8週間の摂取が自然発症高血圧ラットの喫煙曝露により誘発される肺気腫の気腔形成の減少、
型糖尿病マウスにおける皮膚の創傷遅延、Lewis系ラットのイミキモド軟膏塗布による乾癬様皮膚炎の紅斑と肥厚の軽減及び慢性腎疾患の進展の改善並びにGFOとBの組み合わせと各成分比率が有効性に関与することを見出した。加えて、2%グルタミン、3.2%ポリデキストロース、3%ラクチュロース含むセルロース欠乏AIN-93G(実験動物飼育用精製飼料)に5% *Bifidobacterium longum* (BB536)を添加した特殊飼料GFOB(以下、GFOBという)の8週間の摂取が関節リウマチモデルであるLewis系ラットのアジュバント関節炎における腫脹及び骨破壊を軽減し、更に腸内細菌叢の大半を占めるBacteroidetes門とFirmicutes門の不均衡を改善し、また有機酸の産生に関与するActinobacteria門の占有率(%)が有意に増加し、酢酸と酪酸の糞便中濃度が有意に増加させた。(平成26~28年度:基盤研究(C)「シンバイオティクスによる慢性関節リウマチの予防・治療に関する研究」)

2. 研究の目的

関節リウマチモデルであるアジュバント関節炎を用いたGFOBの関節リウマチへの軽減効果と、その背景にある腸内細菌叢の不均衡の改善並びに有機酸(酢酸、酪酸)の産生亢進から二次リンパ組織の一種である粘膜関連リンパ組織(Mucosa-associated Lymphoid Tissue, MALT)その代表格である小腸のパイエル板を介した自然免疫や獲得免疫の関与が推察された。一方、ビフィズス菌が最も多く生息する大腸のMALTと関節リウマチの改善効果並びに自然免疫や獲得免疫の関連は明らかではない。シンバイオティクスの概念を基に大腸のMALTを標的とした研究の展開を目的とする。

3. 研究の方法

AIN-93G(実験動物飼育用精製飼料)セルロース欠乏AIN-93G、あるいは2%グルタミン、3.2%ポリデキストロース、3%ラクチュロース含むセルロース欠乏AIN-93Gに5% *Bifidobacterium longum* (BB536)を添加した特殊飼料(GFOB)をLewis系雄性ラットに8週間摂取させた後、アジュバント関節炎を誘発し、GFOBの軽減効果の再現性とその機序を検討した。すなわち、右足蹠皮内に *Mycobacterium tuberculosis* H37RA 流動パラフィン懸濁液(6 mg/ml, Difco Laboratories)の0.1 mlを注射し、左右の足蹠の容量を毎日、28日間測定した。

加えて、コラーゲン関節炎モデルをHOU-PAN SONGらの方法に準じて作成した。すなわち、上述の通り8週間の給餌の後、2 mg/ml ウシ型コラーゲン(CII)/0.05 M 酢酸溶液と不完全型アジュバント(IFA)を等量混合したCII/IFAエマルジョン(1 mg/ml)を尾の付け根に2箇所、合計0.1mlのCII/IFAエマルジョンを皮内注射した(一次免疫)。その後の7日目に0.1mlのCII/IFAエマルジョンを初回注射部位は避けて追加注射した(二次免疫)。一次免疫前とその後、左右の足蹠の容量を29日間測定した。尚、いずれの実験系においても実験期間中、各飼料の給餌を継続した。

成分	AIN-93G	セルロース欠乏 AIN-93G	GFOB
カゼイン	20	20	20
シスチン	0.3	0.3	0.3
ベータコーンスターチ	39.7	39.7	39.7
アルファコーンスターチ	13.2	13.2	13.2
ショ糖	10	15	6.8
大豆油	7	7	7
セルロース	5	0	0
AIN-93Gミネラル混合	3.5	3.5	3.5
AIN-93ビタミン混合	1	1	1
重酒石酸コリン	0.25	0.25	0.25
第三ブチルヒドロキノン	0.0014	0.0014	0.0014
グルタミン	0	0	2
ポリデキストロース	0	0	3.2
ラクツロース	0	0	3

4. 研究成果

Lewis系ラットのアジュバント関節炎における腫脹及び骨破壊を軽減した2%グルタミン、3.2%ポリデキストロース、3%ラクチュロース含むAIN-93G(実験動物飼育用精製飼料)に5% *Bifidobacterium longum* (BB536)を添加した特殊飼料(GFOB飼料)の再現性を検討したところ、アジュバント関節炎の誘発後に軟便あるいは下痢を発症する個体が現れ、この場合は腫脹の軽減が認められなかった。そこでポリデキストロースを半減し、またラクチュロースを約6分の1に改変したGFOB(改変GFOB)のアジュバント関節炎の腫脹への効果を検討したが、軟

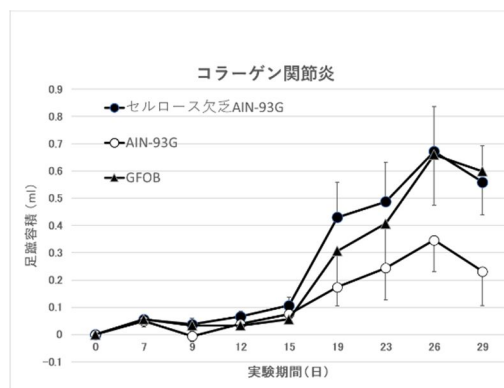
便あるいは下痢を発症は見られないものの腫脹の軽減には至らず、腸内細菌叢の不均衡も改善されなかった。改変 GFOB を 8 週間摂取させた後において、酢酸と酪酸の糞便中濃度が有意な増加は得られなかった。一方、盲腸内容物中の IgA 量に GFOB 摂取あるいは改変 GFOB 摂取のいずれも影響しなかった。

主な腸内細菌（門）の占有率（％）			
腸内細菌（門）	セルロース 欠乏飼料	通常飼料	セルロース 欠乏飼料 + 改変GFOB
Tenericutes	0.3	0.1	0.18
Proteobacteria	0.5	0.49	0.2
Verrucomicrobia	0.3	0.1	0.78
Bacteroidetes	2	1.9	3.08
Actinobacteria	6.2	4.7	7.61
Firmicutes	90.4	92.7	88.03

ヒトの関節リウマチモデルに類似するコラーゲン関節炎を用いて GFOB の軽減効果の再原性を検討した。

結果、コラーゲン関節炎の腫脹に抑制傾向がみられるものの、有意な効果は得られなかった。

一方、8 週間の摂餌の後の血清中エンドトキシン濃度を Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit で測定したところ、血清中エンドトキシン濃度 (EU/ml) は AIN-93G 群 (20.2 ± 4.75) であったが、セルロース欠 AIN-93G 群 (25.0 ± 5.67) に比べて GFOB 飼料群 (12.0 ± 1.92 , $p < 0.04$) と有意に低かった。



また、盲腸内容物中の IgA 量を Akadegawa らの方法を参考に測定した。すなわち、AIN-93G、セルロース欠 AIN-93G 飼料あるいは GFOB 飼料の 8 週間摂餌後、盲腸内容物 100mg をリン酸緩衝液に懸濁し、遠心分離により得た上清を Rat IgA ELISA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories) を用いて測定した。結果、盲腸内容物中の IgA 量 ($\mu\text{g/ml}$) は AIN-93G 飼料群 (129.0 ± 30.1) であったが、セルロース欠 AIN-93G 飼料群 (132.5 ± 48.1) に比べて GFOB 飼料群 (77.1 ± 27.2) と差は認められなかった。

加えて、腸管タイトジャンクションバリアに着目し、腸上皮のタイトジャンクションの接着に関わる分子の中で zonula occludens (ZO) - 1 を測定した。すなわち、上部結腸の粘膜上皮部の粘膜上皮を採取し、リン酸緩衝液に懸濁し、遠心分離により得た上清を Rat TJP1/ZO-1 ELISA Kit (LSBio) で測定した。結果、ZO-1 量 (ng/mg protein) は AIN-93G 群 (7.4 ± 1.20)、セルロース欠 AIN-93G 飼料群 (7.4 ± 2.75) と GFOB 飼料群 (3.75 ± 0.47) であり、3 群間で有意な差は認められなかった。

以上より、これまで得られた GFOB (2%グルタミン、3.2%ポリデキストロース、3%ラクチュロース及び 5% *Bifidobacterium Ilungum* (BB536)) の 8 週間摂取によるアジュバント関節炎の軽減効果について、軟便あるいは下痢の発現により再現性は得られなかったが、ポリデキストロースとラクチュロースの減量の結果は、両物質の調節によりアジュバント関節炎モデルあるいはコラーゲン関節炎モデルを用いてシムバイオティクスの安定した評価が可能になるものと考えられる。一方、GFOB の摂取は、Lewis 系ラットの腸内細菌叢の不均衡を改善するとともに、酢酸と酪酸の腸管内産生を亢進したが、これまでの報告のように大腸における IgA 産生の亢進 (Lee and Hase, 2014. Isobe *et al.*, 2020) には至らなかった。疾患モデルの精度や個体差を最小限とすること、並びに技術的な改善も含めて、今後更なる検討が必要である。

引用文献

SONG HP *et al.*, 2015. Phenotypic characterization of type II collagen-induced arthritis in Wistar rats. *Exp. Ther. Med.* 10: 1483-1488.

Akadegawa K. *et al.*, 2005. Breakdown of Mucosal immunity in the gut and resultant systemic sensitization by oral antigens in a murine model for systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 174:5499-5506.

Lee, W. J. and K. Hase., 2014. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat. Chem. Biol.* 10: 416-424.

Isobe J., *et al.*, 2020. Commensal-bacteria-derived butyrate promotes the T-cell-independent IgA response in the colon. *Int. Immunol.*, 12;32(4):243-258.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	友田 恒一 (Tomoda Koichi) (90364059)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	

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