

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11699

研究課題名(和文) 母乳由来プロバイオティクスから炎症性腸疾患・炎症性発癌の新規治療法の開発

研究課題名(英文) New therapeutic strategy for inflammatory bowel disease and inflammatory carcinogenesis from breast milk-derived probiotics

研究代表者

倉原 琳 (Kurahara, Lin)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：00341438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：初乳由来乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* Probio-M9 およびプレバイオティクスである難消化性ミルクオリゴ糖ラクツロースのIBD発癌治療効果の検討を行った。炎症性発癌モデルマウスにおいて、それぞれ炎症を抑制し、腫瘍数を劇的に減少させることを見出した。作用機序としては、直接腸内細菌叢の多様性や構造に影響及ぼすのみならず、癌関連マクロファージの発現を減少させた。さらに、大腸がん株化細胞 Caco-2細胞との共培養実験において、Probio-M9がリポポリサッカライド(LPS)によるタイトジャンクション構成蛋白質の発現低下とミトコンドリア機能障害を抑制することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医学雑誌「Lancet」は「Lancet Breastfeeding」シリーズを設け、母乳育児によって、腸炎をはじめとする多くの疾病の予防に繋がり、82万人の命を救うことができるという調査結果を発表した。母乳がどのような機序で腸管炎症の発症を抑制しているのか、母乳育児によって形成される腸内細菌叢が関与しているのか、さらには、母乳が治療的に有効であるかということに関しては、多くの不明な点が残されている。本研究は、炎症性発癌の観点から母乳由来プロバイオティクスやミルクオリゴ糖の治療効果の機序を、腸内細菌および腸管炎症に及ぼす影響を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The longer the breastfeeding period, the lower is the risk of IBD. Prolonged IBD is one of the major risks related to colitis-associated cancer (CAC) development. Here, we investigated effects of the colostrum derived *Lactobacillus rhamnosus* M9 (Probio-M9) or milk oligosaccharide lactulose on CAC. CAC model mice showed weight loss, diarrhea, intestinal shortening, tumorigenesis, increased inflammation, fibrosis, increased macrophage cells in the subserosal layer of non-tumor areas. Probio-M9 or lactulose treatment upregulated fecal microbial diversity and reversed fecal microbial functions, and suppressed tumor formation by regulating inflammation. Furthermore, we found that co-culture of Probio-M9 ameliorated the LPS induced tight junction proteins down-regulation in Caco-2 cells. Probio-M9 has a gene sequence for L-rhamnose isomerase, the recombinant enzyme exhibits enzymatic activity even under acidic conditions, and X-ray crystal structure was successfully analyzed.

研究分野：病態生理学

キーワード：母乳 炎症性腸疾患 プロバイオティクス 炎症性発癌 ミルクオリゴ糖

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) は潰瘍性大腸炎とクローン病に代表され、腸管慢性炎症を基盤とする原因不明の自己免疫疾患である。潰瘍性大腸炎患者数は日本の指定難病の中で最多であり、炎症の遷延により高い発癌リスクが大きな問題として残っている。現在、抗体製剤などの生物学製剤が寛解導入・維持に広く使用されているが、30%の患者が抗体製剤に反応せず、また、抗体による副作用や長期投与に伴う治療効果の減弱が問題となっている。2017年のハーバード大学による世界規模の調査結果により、母乳育児が IBD の罹患リスクを顕著に低下させるとする知見が得られている。一年以上の母乳育児による IBD 罹患リスク低下は、白人では 22% に過ぎなかったのに対して、アジア人では 69% とされている。

2. 研究の目的

本研究では、「炎症性腸疾患および炎症性発癌に対して、母乳由来プロバイオティクスおよび母乳成分をもちいて、長期改善効果を持つ安全な治療法を開発できるか?」という問いを立て、これを検証する *In vivo* と *In vitro* 研究解析を実施した。

3. 研究の方法

In vivo 解析: アゾキシメタン (AOM)+DSS を繰り返し投与する炎症性発癌モデルを作製する。Probio-M9 を投与し、病態の評価として: 便の性状 (軟便血便) 体重変化、腸の長さ・重量、盲腸重量、脾臓の大きさを解析する。腫瘍の個数、増殖性、悪性度を評価する。腸粘膜の組織学的変化を病理解析: 組織免疫染色 (増殖性: Ki67、炎症細胞浸潤: CD68・CD163)。

腸管粘膜固有層内のリンパ球やマクロファージにおけるサイトカイン産生を RT-PCR にて測定する、腸内細菌のメタゲノム解析: 16s リボゾーム RNA 遺伝子解析にて腸内細菌叢の構成を網羅的に解析し、細菌叢への影響を評価する。腸内の短鎖脂肪酸: 酢酸、プロピオン酸、酪酸を定量解析する。

In vitro 解析: 腸管上皮由来 Caco-2 細胞を Probio-M9 と共培養し、タイトジャンクション等の細胞間接着構造タンパクの発現に及ぼす影響を評価する。本株には希少糖生産にも利用可能な L-ラムノースイソメラーゼの遺伝子配列があり、組換え酵素を作成して酵素活性を確認し、希少糖との複合体の X 線結晶構造解析を行う。

4. 研究成果

母乳由来乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* Probio-M9 およびプレバイオティクスである難消化性ミルクオリゴ糖ラクツロースの IBD 発癌治療効果の検討を行った。炎症性発癌モデルマウスにおいて、それぞれ炎症を抑制し、腫瘍数を劇的に減少させることを見出した。作用機序としては、直接腸内細菌叢の多様性や構造に影響及ぼすのみならず、癌関連マクロファージの発現を減少させることを見出した。さらに、大腸がん株化細胞 Caco-2 細胞において、リポポリサッカライド (LPS) によるタイトジャンクション構成蛋白質の発現低下とミトコンドリア機能障害を Probio-M9 が抑制することを見出した。また、Probio-M9 株においては、有用な酵素が存在することが確認されている。本株には希少糖生産にも利用可能な L-ラムノースイソメラーゼの遺伝子配列があり、組換え酵素を用いた研究では、本酵素は酸性条件下でも酵素活性を示すことを確認し、希少糖との複合体の X 線結晶構造解析にも成功した。Probio-M9 は有用な酵素を持つことが検証された。

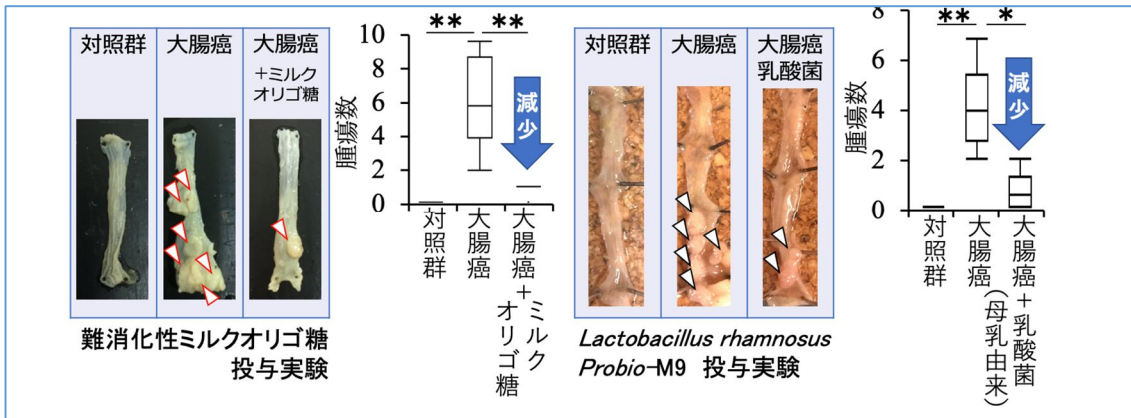


図1 炎症性発癌モデルの発癌抑制効果の検討

母乳由来プロバイオティクスは、安全性が担保され、生きたまま腸に到達して消化管にて有益な効果を持つ。母乳由来プロバイオティクスおよび母乳成分をもとに治療効果の高いIBD治療薬や抗癌薬を開発できることが示唆される。今後、母乳に含まれる菌による腸管免疫再構築の観点から母乳育児の重要性を強調・発信し、「菌」による予防・治療薬の開発を進めたい。

医学雑誌「Lancet」は「Lancet Breastfeeding」シリーズを設け、母乳育児によって、多くの疾病の予防に繋がり、82万人の命を救うことができるという調査結果が発表された。IBD母乳の発症に関しても母乳育児と関連が報告されているが、母乳がどのような機序でIBD発症を抑制しているのか、母乳育児によって形成される腸内細菌叢が関与しているのか、さらには、母乳が治療的に有効であるかということに関しては、多くの不明な点が残されている。本研究は、IBDに対する母乳由来プロバイオティクス、もしくはラクツロースの治療効果の機序を、腸内細菌および腸管炎症に及ぼす観点から明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Zhao Feiyan, Hiraishi Keizo, Li Xiaodong, Hu Yaopeng, Kojima Daibo, Sun Zhihong, Zhang Heping, Kurahara Lin-Hai	4. 巻 12
2. 論文標題 Long-Term Tracking of the Effects of Colostrum-Derived Lactocaseibacillus rhamnosus Probio-M9 on Gut Microbiota in Mice with Colitis-Associated Tumorigenesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 531 ~ 531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines12030531	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Hiraishi Keizo, Zhao Feiyan, Kurahara Lin-Hai, Li Xiaodong, Yamashita Tetsuo, Hashimoto Takeshi, Matsuda Yoko, Sun Zhihong, Zhang Heping, Hirano Katsuya	4. 巻 14(3)
2. 論文標題 Lactulose Modulates the Structure of Gut Microbiota and Alleviates Colitis-Associated Tumorigenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 649 ~ 649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu14030649	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 3.Xu H, Hiraishi K, Kurahara L-H*, Nakano-Narusawa Y, Li X, Hu Y, Matsuda Y, Zhang H, Hirano K	4. 巻 13(4)
2. 論文標題 Inhibitory effects of breast milk-derived Lactobacillus rhamnosus Probio-M9 on colitis-associated carcinogenesis by restoration of the gut microbiota in a mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13041143	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Li Xiaodong, Kurahara Lin-Hai, Zhao Zhixin, Zhao Feiyan, Ishikawa Ryo, Ohmichi Kiyomi, Li Gaopeng, Yamashita Tetsuo, Hashimoto Takeshi, Hirano Mayumi, Sun Zhihong, Hirano Katsuya	4. 巻 18
2. 論文標題 Therapeutic Effect of Proteinase-Activated Receptor-1 Antagonist on Colitis-Associated Carcinogenesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 105 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2024.04.001	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Yoshida Hiromi, Yamamoto Naho, Kurahara Lin Hai, Izumori Ken, Yoshihara Akihide	4. 巻 108
2. 論文標題 X-ray structure and characterization of a probiotic <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Probio-M9 L-rhamnose isomerase	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-024-13075-9	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kurahara L, Xu H, Hiraishi K, Li X, Zhang H, Hirano K
2. 発表標題 Breast milk-derived <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Probio-M9 ameliorates colitis-associated carcinogenesis by restoration of the gut microbiota.
3. 学会等名 The 39th Congress of International Union of Physiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉原琳、李小東、平石敬三、平野勝也
2. 発表標題 母乳由来プロバイオティクスによる炎症性大腸発癌の抑制効果
3. 学会等名 第141回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉原琳
2. 発表標題 腸内環境の発達と母乳由来プロバイオティクス
3. 学会等名 看護薬理学カンファレンス2022 in 横浜
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉原琳
2. 発表標題 炎症性腸疾患 (IBD) の腸内環境と母乳由来プロバイオティクス
3. 学会等名 香川大学第17回医農連携セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kurahara LH, Zhao F, Hiraishi K, Li X, Sun Z, Zhang H, Hirano K
2. 発表標題 Therapeutic effect of lactulose on intestinal flora structure and composition in colitis-associated tumorigenesis
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉原琳、平石敬三、李小東、山下哲生、橋本剛、平野勝也
2. 発表標題 炎症性大腸腫瘍モデルにおける希少糖D-アロースの腫瘍抑制効果
3. 学会等名 第73回日本生理学会中国四国地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉原琳、趙飛燕、平石敬三、李小東、張和平、平野勝也
2. 発表標題 炎症性大腸腫瘍モデルマウスにおける腸内細菌叢の多様性に対するラクツロースの改善効果
3. 学会等名 第63回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	平石 敬三 (Hiraishi Keizo) (60896413)	福岡大学・医学部・助教 (37111)	
研究分担者	山下 哲生 (Yamashita Tetsuo) (80444727)	香川大学・医学部・助教 (16201)	
研究分担者	松田 陽子 (Matsuda Yoko) (20363187)	香川大学・医学部・教授 (16201)	

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		
中国	内蒙古農業大学教育部重点研究室酪農バイオテクノロジーエンジニアリング		