

令和 5 年 10 月 27 日現在

機関番号：31102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20573

研究課題名(和文)プレ・プロバイオティクスによる内在性抗炎症物質の産生誘導を介した脳内炎症の抑制

研究課題名(英文) Suppression of brain inflammation through induction of endogenous anti-inflammatory compound by prebiotics and probiotics

研究代表者

奥野 海良人 (Okuno, Alato)

柴田学園大学・生活創生学部・准教授

研究者番号：50623980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳内炎症モデルマウスにおいて特定の乳酸菌の死菌体(HK-LAB)の摂取により、炎症性サイトカインIL-1の減少傾向が認められた。これはHK-LAB摂取によってLPSのような強力な起炎剤による炎症も抑制する可能性を示している。また抗生剤を投与して作成した腸内環境攪乱マウスにおけるHK-LAB投与は血中キヌレニン濃度を著増させることから、HK-LAB摂取は腸内環境の乱れによって生じる炎症反応を助長する可能性も示した。今後HK-LAB摂取がどのようにキヌレニン代謝に作用するのか、変動したキヌレニンが身体に及ぼす影響について検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳酸菌の摂取が炎症抑制物質キヌレニンレベルを上昇させ、全身の炎症を抑制する可能性を示した。この結果は加熱して死菌化した菌体によるものであり、摂取する菌は必ずしも生きている必要が無い。これらのことは種々の食品に乳酸菌死菌体を加えることで味を含む食品の品質を変化させることなく、背景に炎症が関係している様々な疾患が予防可能であることを示している。また本研究で調べたトリプトファンキヌレニン代謝を指標としてさらに多くの菌株の有用性を調べることで比較的容易に抗炎症性作用を有する菌株を探索することができるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Specific heat killed lactic acid bacteria (HK-LAB) tended to decrease inflammatory cytokine IL-1 in brain inflammation model mice. This indicates that ingestion of HK-LAB may also suppress inflammation caused by strong inflammatory agents such as LPS. In addition, it was clarified that administration of killed lactic acid bacteria to dysbiosis model mice by administration of antibiotics markedly increased in KYN levels in blood. It was suggested that administration of HK-LAB may promote inflammatory reactions caused by dysbiosis. It is necessary to investigate how HK-LAB intake affects kynurenine metabolism and the effects of fluctuating kynurenine on the body in the future.

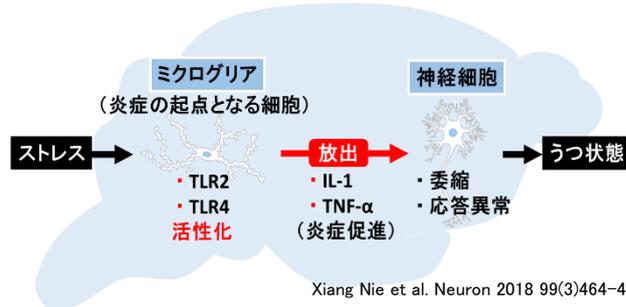
研究分野：栄養学

キーワード：キヌレニン トリプトファン代謝 プレバイオティクス

1. 研究開始当初の背景

近年日本では、うつ病の患者数が増加してきており、世界保健機関（WHO）の調査では日本国内には300万人のうつ病患者がいるとの試算もある。うつ病の治療には一般的に抗うつ薬等の薬物療法や認知行動療法が用いられるが、これらの治療法は数十パーセントの患者において効果を発揮しない。さらに、創薬は難航しており、抗うつ薬の研究開発は進んでいない。

図1 ストレスが脳内炎症を惹起しうつ病を引き起こす



うつ病の根本原因は未だに不明であるが、その脳内炎症が関連しているとする神経炎症仮説が有力である（図1）。実際、抗炎症剤の服用がうつ病症状を改善したという報告もある（*J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020 **91**(1):21-32.）（*JAMA Psychiatry*. 2014 **71**(12):1381-91.）。しかしながら既存の抗炎症剤には副作用の問題や、妊婦の服用は推奨されておらず、薬剤を常用する予防法はリスクが伴う。そのため日々の食事から生体内に備わっている内在性の抗炎症物質を増加させることで炎症を抑えることはできないかと考えた。

2. 研究の目的

トリプトファン（Trp）代謝産物のキヌレニン（KYN）およびインドール-3-酢酸（IAA）、インドール-3-プロピオン酸（IPA）はこれらの化合物はアリル炭化水素受容体（AhR）のリガンドであり、Th1細胞の抑制や制御性T細胞の誘導に関与して炎症を抑制する作用がある（*Nature* 2011 **478**:197-203）（*山梨医科雑誌* 2017 **32**(1) 7-13）。これらの化合物は宿主や、腸内細菌によってTrpから合成されることから、栄養的にこの代謝系を活性化することで脳内炎症も抑制できるのではないかと着想を得た。

すなわち本研究の目的は、継続的な栄養による体内でのTrp代謝の調節および脳内炎症の制御である。

3. 研究の方法

(1) 脳内炎症惹起モデル動物の作成

C57BL6 雄性マウスの腹腔内に（0.5mg/kg）のO055大腸菌由来リポポリサッカライド（LPS）を7日間連続投与し、脳内炎症惹起モデルマウスの作成を検討した。炎症の指標には飼育最終日における血中IL-1β、および経時的なLPS投与後4時間後の尾静脈血中KYN/Trp濃度比を用いて評価した。

(2) 脳内炎症惹起モデル動物における乳酸菌摂取の影響

C57BL6 雄性マウスに乳酸菌溶液（ 5.0×10^{10} cells/0.2mL）を14日間強制経口投与し、後半の7日間は（0.5mg/kg）のO055大腸菌由来LPSを腹腔投与した。飼育最終日のLPS投与4時間後に血液、脳を採材し、Trp、KYN濃度とIL-1βを測定した。

(3) マウスにおける腸内環境の変化がTrp-KYN代謝に及ぼす影響

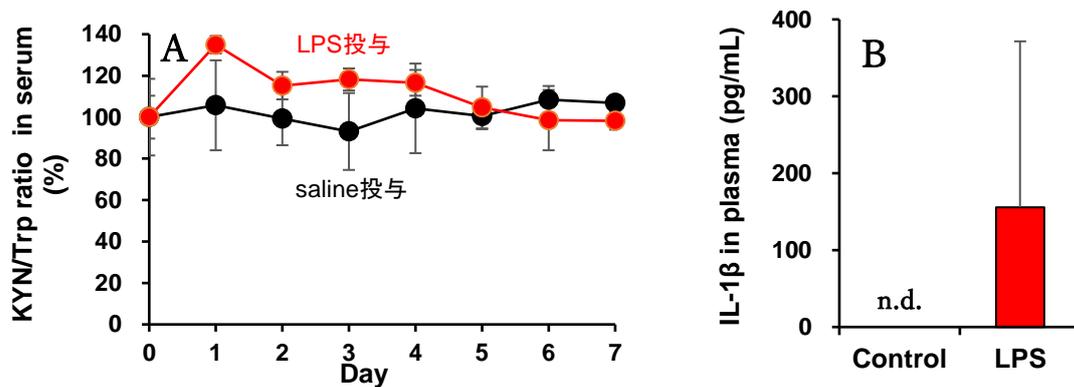
C57BL6 雄性マウスに水もしくは抗生剤（0.025%バイコマイシン, 0.05%ネオマイシン, 0.05%アンピシリン, 0.05%メトロニダゾール）を5日間飲水投与後、乳酸菌溶液（ 5.0×10^{10} cells/0.2mL）

を14日間強制経口投与し、飼育最終日に血液、小腸、肝臓、脳を採取し、血中、脳中 Trp、KYN 濃度および小腸、肝臓の Trp-KYN 代謝酵素 (IDO および TDO) の酵素活性を測定した。なお、対照群には生理食塩水を経口投与した。

4. 研究成果

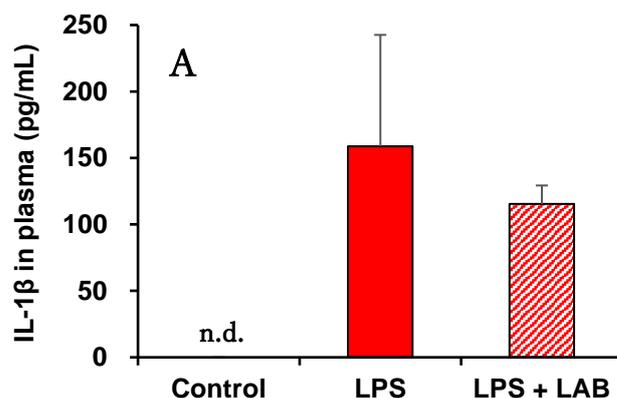
(1) 脳内炎症惹起モデル動物の作成

炎症によって誘導されると報告されている血中 KYN/Trp 比は7日間の 0.5mg/kg LPS 連続投与によって有意な変化を得ることはできなかった。飼育最終日の血中 IL-1 β の増加は観察されたが、脳内の IL-1 β に変化は認められなかった。KYN/Trp を指標とした場合、連続投与5日目で LPS 投与に対する耐性のようなものが出てきていることから、他の論文で報告されているような LPS 連続投与による脳内炎症の誘導は困難であった。KYN/Trp 比を指標にすると最も炎症が誘導されているのは初回の投与であるため、単回投与で用量依存的な実験を行ったが、最も効率よく炎症を誘導できるのは 2mg/kg であり、10mg/kg の投与は致死的であった。本実験の副次的な成果として、LPS による炎症を抑制する機能性栄養素に関する成果を得た (*Int J Tryptophan Res.*, 2022 15:11786469221128697.)。脳内炎症誘導のためには連続投与する「LPS の種類を日ごとに変える」や、「LPS の投与量を漸増させていく」等の工夫が必要であると考えられる。



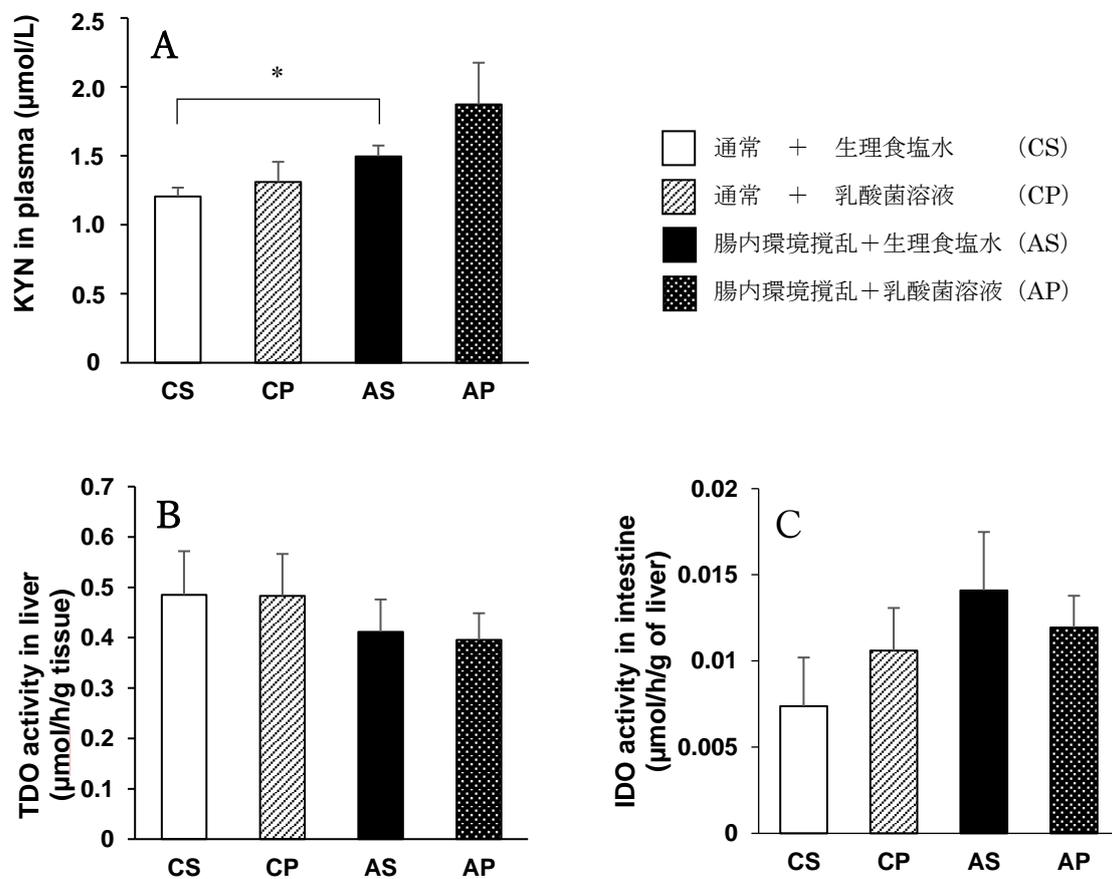
(2) 脳内炎症惹起モデル動物における乳酸菌摂取の影響

LPS の腹腔投与で脳内の IL-1 β の上昇は認められなかったが、乳酸菌投与群で血中 IL-1 β は減少する傾向が認められた。しかしながら血中および脳内 KYN/Trp 比については変化が認められなかった。乳酸菌の摂取は全身性の抗炎症作用の可能性を示したものの、脳内への影響については不明であり、上述したように LPS 投与の工夫、脳室内への LPS 直接投与等、方法を検討する必要がある。



(3) 腸内環境の変化が Trp-KYN 代謝に及ぼす影響

抗生剤の投与によって腸内環境を攪乱したところ、血中 KYN 濃度の上昇が認められた (A)。しかしながら末梢での Trp 代謝酵素が局在する臓器である小腸 IDO と肝臓 TDO において KYN 濃度の上昇と同様の活性の変化は認められず (B) (C)、血中 KYN 濃度上昇のメカニズムは他の組織に因るものである可能性が高い。また、乳酸菌の摂取によって健康なマウスでは KYN 濃度はほとんど増えないが、腸内環境攪乱モデルマウスでは増加の傾向が認められた。これについても小腸 IDO や肝臓 TDO の変化と一致しないため、脾臓や肺などの臓器での IDO 等、他のメカニズムを考慮する必要があるかもしれない。特に小腸ではパイエル板に免疫細胞が集まっているため、Trp 代謝の局在は小腸のさらにパイエル板である可能性が高い。そのためパイエル板にフォーカスした検討を行うことでより鮮明な結果が得られる可能性がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 SAITO Suguru, OKUNO Alato, KAKIZAKI Nanae, MAEKAWA Toshio, TSUJI Noriko M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Lactococcus lactis subsp. Cremoris C60 induces macrophages activation that enhances CD4+ T cell-based adaptive immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	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） 10.12938/bmfh.2021-057	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 -

1. 著者名 Yajima Yuhei, Okuno Alato, Nakamura Isamu, Miyazaki Teruo, Honda Akira, Toyoda Atsushi	4. 巻 15
2. 論文標題 Differential Effect of Non-Purified and Semi-Purified Standard Diets on Kynurenine and Peripheral Metabolites in Male C57BL/6J Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Tryptophan Research	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） 10.1177/11786469211066285	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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------