

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23360373

研究課題名(和文) 微生物を介した大腸炎寛解プロセスのシステム論的制御

研究課題名(英文) Systems engineering approach for colitis remission by use of gut commensal bacteria

研究代表者

常田 聡 (TSUNEDA, SATOSHI)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：30281645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸管の炎症抑制および腸上皮タイトジャンクションバリア機能の回復に寄与する腸内細菌を同定した。さらに、実験的腸炎マウスモデルを用いて、腸炎の寛解プロセスに寄与する腸内細菌および代謝産物のスクリーニングを行った。また、大腸陰窩における上皮細胞の増殖・分化機構の時空間的ダイナミクスを表現するシミュレーターの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：We identified gut commensal bacteria retaining anti-inflammatory or epithelial tight junction barrier-strengthening properties by in vitro screening. Also, we characterized gut bacteria and metabolites retaining the potential to involve in colitis remission by using a dextran sulfate sodium-induced colitis mouse model. Furthermore, we developed the computational framework for elucidation of stem cell dynamics occurring in colonic crypts and quantitatively prediction of cell behavior.

研究分野：生物学

キーワード：腸内細菌 プロバイオティクス 炎症性疾患

1. 研究開始当初の背景

欧米で発症率が高いことが知られていたクローン病や潰瘍性大腸炎など原因不明の慢性炎症を特徴とする炎症性腸疾患(IBD)は、1970年代から日本においてもその発症率が年々増大している。IBDは、遺伝素因、環境因子、免疫応答の異常といった多因子疾患である。また、腸管炎症の自然発症という表現型をもつ一部の免疫関連遺伝子欠損マウスが、IBD疾患モデルとして病態解明研究に広く利用されてきた。とくに、これらIBD疾患モデルは、無菌環境下においては腸炎を発症しないことから、腸内細菌に対する異常な免疫応答が腸管の慢性炎症の大きな要因のひとつとして考えられるようになった。

現行のIBD治療は、ステロイド剤や免疫抑制剤の投薬を主体とした対症療法であり、重篤な副作用などの課題を含んでおり、根治療法の確立が急務である。このような中、乳酸菌やビフィズス菌を活用したプロバイオティクスおよび便微生物移植療法など、細菌-宿主の相互作用に着目した新規IBD治療法に注目が集まっている。すなわち、IBDの病態解明および制御のためには、腸内細菌と腸管粘膜免疫系との間に潜在する炎症制御機構を解明する必要がある。

2. 研究の目的

腸上皮バリア機能の破綻により炎症が惹起した腸炎から回復するためには、過剰な炎症応答の抑制、腸上皮バリア構造の再構成が必要となるが、これら腸炎寛解プロセスに関与する腸内細菌および腸内細菌-宿主間の相互作用を解明することを目的とする。また、腸炎寛解プロセスにおいて腸内環境と宿主は、相互に関係し合う連続的なシステムである。このような複雑な系に対しては、要素還元的アプローチではなく、実験とシミュレーションを併用したシステム論的アプローチが有効になると考えられる。そこで本研究では、腸上皮細胞動態シミュレーターを構築することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗炎症細菌の探索

糞便から分離した系統分類学的に多岐に渡る細菌について抗炎症能を有する細菌を探索した。本研究では、炎症応答のマスターレギュレーターである転写因子NF- κ Bを指標として、抗炎症能を評価した。まず、腸上皮細胞におけるNF- κ Bの活性化をモニタリングするために、NF- κ B Luc レポーター遺伝子を安定発現する腸上皮細胞株(HT-29)を樹立した。このNF- κ B Luc レポーター株をTNF- α (1 ng/ μ l)による単独刺激したときのNF- κ B 活性化値を基準に、熱処理菌体もしくは細菌培養上清の抗炎症能を評価した。さらに、GeneChip (アフィメトリクス社)を用いて、強力な抗炎症能が見られた細菌培養上清を曝露したときの腸上皮細胞株HT-29のmRNA

発現動態の比較解析を行った。

(2) 腸上皮バリア機能を修復する有用細菌の探索

ヒト糞便から分離した乳酸菌(*Enterococcus* 属, *Lactobacillus* 属)とビフィズス菌(*Bifidobacterium* 属)の中から、トランスウェルプレート上に単層培養したCaco-2細胞(ヒト結腸癌由来細胞株)を用いて、腸上皮バリア機能の強化・再生に寄与する有用細菌をスクリーニングした。腸上皮バリア機能は、経上皮電気抵抗値を指標として評価した。まず、炎症性サイトカイン(TNF- α)によって誘導するタイトジャンクションの崩壊を抑制できる細菌をスクリーニングした。つぎに、この腸上皮バリアを強化した細菌株は、TNF- α によって腸上皮バリア機能を損傷させたCaco-2細胞に各細菌株を接触させることで、腸管上皮バリア機能の修復能を評価した。

(3) 大腸炎の病態形成に寄与する腸管内環境因子の探索

日本クレアより購入したC57BL/6マウス(♀, 6週齢)をSPF室にて2週間予備飼育を行ったのち、動物実験を行った。2%デキストラン硫酸塩(分子量: 50,000)を自由飲水にて7日間与えて、マウスに大腸炎を誘発した。また、大腸炎の発症が確認されるDSS投与4日目より各種抗生物質(バンコマイシン、ポリミキシンB、メトロニダゾール)を投与することで、細菌叢改変による病態の変化を試みた。各サンプリングポイント(0, 4, 7, 9日目)に採取した糞便よりDNAを抽出し、6FAMで蛍光標識した516F(5'-TGCCAGCAGCCGCGGTA-3')と1510R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')をプライマーセットとしたPCRを行った。PCR産物は精製後、制限酵素 *Bs*II で処理して、T-RFLP解析により腸内細菌叢を評価した。また、一部の糞便はリン酸緩衝液中に抽出し、¹H-NMR(500MHz, BRUKER)により測定した。その後、得られたNMRスペクトルについて、主成分分析(PCA)による統計処理を行った。

(4) 腸炎寛解誘導過程における腸内環境動態の解析

日本クレアより購入したC57BL/6マウス(♀, 6週齢)をSPF室にて2週間予備飼育を行ったのち、動物実験を行った。5%デキストラン硫酸塩(分子量: 5,000)を自由飲水にて5日間与えて、マウスに大腸炎を誘発した。DSSを5日間投与した後、水道水のみ投与に変更し、腸炎の寛解移行を観察した。その間、糞便試料の採取を行い、腸内細菌および代謝産物の解析を行った。本実験における腸内細菌は、IonPGMシステムを用いたアンプリコン解析(メタ16S rRNA解析)を導入し、網羅的な腸内細菌叢解析を行った。

(5) 腸上皮細胞動態のシミュレーター構築 大腸陰窩における細胞の増殖分化機構を

模倣するシミュレーターの基盤となる数理モデルを Individual-based modeling (IBM) の手法で構築した。まず大腸陰窩を円柱に近似し、これを展開した長方形を大腸陰窩全体の形状とした。細胞は円でモデル化し、細胞種として、細胞分裂を恒常的に行う幹細胞・増殖細胞と、決められた回数分裂し分化した成熟細胞の3種類を考えた。各細胞はモデル陰窩内で増殖・分化を行い、互いに押し合うことで時空間配置が定まる。規定した増殖・分化シナリオに付随する各種パラメーター値は、ヒト陰窩内増殖細胞分布の実験データへのフィッティングにより見積もった。また陰窩の恒常性に重要な細胞死のモデル化も行い、放射線照射に伴うアポトーシス細胞の陰窩内空間分布の実験データへのフィッティングも行った。

4. 研究成果

(1) 腸内細菌分離株の抗炎症能

腸内において細菌と腸上皮細胞との間には過剰な炎症応答を抑制する分子機構が潜在していると考えた。そこで、腸内に常在する細菌を分離し、各種細菌の抗炎症能を評価した。本研究では、NF- κ B レポーター株を用いた *in vitro* スクリーニングの結果、常在細菌叢の主要な構成種である *Bacteroides* 属、*Lactobacillus* 属、*Lactococcus* 属の熱処理菌体に有意な NF- κ B 活性抑制能 (19~51%) が確認された。興味深いことに、乳酸菌お (*Lactobacillus* 属、*Enterococcus* 属) *Staphylococcus* 属、*Bacteroides* 属、*Ruminococcus* 属および *Bifidobacterium* 属の培養上清は、強力な NF- κ B 活性抑制能 (49~99%) を有していた。現在までに、培養上清に含まれる熱安定な低分子物質 (3kDa 以下) が抗炎症応答のトリガーとなっていることが明らかとなった。また、抗炎症能が見出された4菌種 (*Ruminococcus sp.*, *Enterococcus cecorum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bacteroides thetaiotaomicron*) の培養上清を曝露した HT-29 細胞を GeneChip 解析したところ、*Ruminococcus sp.* の培養上清を曝露した HT-29 細胞は、他の3菌種の培養上清を曝露した場合とは大きく異なる遺伝子発現プロファイルを示した。以上の結果より、腸上皮細胞の炎症制御は、腸内共生菌の菌体成分と腸上皮細胞との直接的な接触を介した相互作用だけでなく、系統分類学的に多岐に渡る細菌が産生する多様な代謝産物も腸管の恒常性維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

(2) 腸上皮バリア機能の強化・修復を担う腸内細菌の同定

Lactobacillus 属と *Bifidobacterium* 属のいくつかの菌株において、TNF- α による腸上皮細胞バリア機能の損傷に対する予防効果が見出された。とくに *B. bifidum*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum* の投与では、Caco-2 細胞の

腸上皮バリア機能の増強が認められた。さらにこれらビフィズス菌株は、TNF- α の投与により腸上皮バリア機能の一部を破壊した Caco-2 細胞に対して、腸上皮バリア機能の修復能も有していた。つぎに、とくに高い腸上皮バリア機能の修復能を示した *B. bifidum* を用いて、腸上皮バリア機能の修復誘導に関わる因子を探索した。その結果、熱処理した *B. bifidum* ではその効果が大幅に消失することから、生菌由来の因子 (e.g. 代謝産物) が重要であることが示された。そこで本研究では、培養上清に含まれる代謝産物の動態を ¹H NMR 法を用いたメタボノミクスアプローチにより解析したところ、*B. bifidum*/Caco-2 細胞の共培養系において酢酸濃度が著しく増加していることを確認した。つぎに、酢酸が腸上皮バリア機能の修復に関与するか検証したところ、酢酸のみでも腸上皮バリア機能が改善することを確認した。以上の結果から、ビフィズス菌の産生する酢酸が腸上皮バリア機能の修復に寄与することが明らかとなった。また、腸管上皮バリア機能の強化および修復という機能という側面においては、乳酸菌よりもビフィズス菌の方が優れていることが示唆された。また、*Bifidobacterium* 属による腸上皮バリア機能の修復効果は、種もしくは株レベルで大きく異なることも明らかとなった。

(3) 大腸炎の病態形成に寄与する腸管内環境因子の探索

腸炎病態は、DSS 単独投与群、メトロニダゾール (MNZ)、ポリミキシン B (PMB) 投与群で重篤化した。一方、バンコマイシン (VCM) 投与群では、体重減少が大幅に抑制されたことから、大腸炎の重篤化を抑制することが示唆された。T-RFLP 法による細菌叢解析の結果 (9日目)、健常群、腸炎重篤化群 (DSS alone, DSS + MNZ, DSS + PMB)、重篤化抑制群 (DSS + VCM) で大きく細菌叢が異なっていた。健常群では、*Allobaculum stercoricanis* が優占化していたが、大腸炎の進行とともに減少し、重篤化群は *Bacteroides acidofaciens* が優占種として特定された。さらに、重篤化抑制群では、*B. acidofaciens* が除菌されており、*E. coli* と *Proteus mirabilis* が顕在化していた。また、¹H-NMR による糞便中代謝産物の解析によって、健常群・重篤化阻止群と重篤化抑制群との間で、明確に異なる代謝産物プロファイルであることが明らかとなった。腸炎緩解群では有機酸やアミノ酸 (グリシン、セリン)、アミノ酸代謝物、糖および糖アルコール、糖代謝物、脂質代謝物が多く、腸炎重篤化群では短鎖脂肪酸、アミノ酸代謝物 (タウリン)、糖アルコール、アミン類が多いという傾向が見られた。ただし、代謝物をより正確な同定を行うためには、NMR 以外の分析手法を用いて、精査する必要がある。

(4) 腸炎寛解移行期における腸内環境変化

の評価

現在までに、腸炎の寛解移行期における腸内環境（細菌群集構造あるいは腸管内代謝物）の動態に関する知見は乏しい。そこで、腸炎モデルマウスの大腸内に起こる一連の環境因子と細菌群集の動態を解析し、腸炎寛解過程に重要な役割を担う細菌群集あるいは代謝産物の特定を試みた。本研究では、大腸炎の自然寛解過程を解析できる DSS 誘導性大腸炎モデルを用いて、正常期、腸炎進行期、腸炎寛解期の各フェーズの大腸内のメタ 16S rRNA ライブラリー解析およびメタボローム解析を行った。IonPGM シーケンサーを用いたメタ 16S rRNA 解析の結果、いずれのステージにおいても Lactobacillaceae 科細菌が最優占であったが、腸炎の進行に伴い、Bacteroidaceae 科や Erycipelotrichaceae 科の細菌が増加することが明らかとなった。一方、腸炎寛解移行期では、*Lactobacillus murinus* が顕著に増加していた。¹H-NMR を用いたメタボローム解析の結果、細菌叢解析の結果と同様、腸炎進行期と腸炎寛解期で代謝物プロファイルが異なっていた。とくに、腸炎進行期から腸炎寛解期への遷移に伴い顕著に乳酸とコハク酸が増加していることを特定した。また、腸炎寛解モデルマウスから単離に成功した *L. murinus* と *B. acidifaciens* は、それぞれコハク酸と乳酸産生能を持つことがわかった。しかしながら、腸炎寛解期において乳酸の増加と乳酸菌(Lactobacillaceae 科)の顕在化は相関するものの、コハク酸の産生主である *Bacteroides* 属細菌は減少傾向であった。そこでコハク酸量と正の相関を持つ細菌を統計学的に検索したところ、*L. intestinalis* が腸炎寛解期におけるコハク酸産生に関連している可能性が示唆された。今後、本研究でスクリーニングした細菌や代謝物が腸管炎症や腸管上皮細胞増殖に果たす影響を詳細に検証していくことで、腸炎寛解における腸内細菌と宿主のクロストークの解明への一助となることが期待される。

(5) 腸上皮細胞動態のシミュレーター構築

構築した数理モデルを用いて、過去に報告されているヒト結腸陰窩内増殖細胞(BrdU+)分布の実験データ(Potten et al. 1992 Gut)へのフィッティングを試みた。その結果、幹細胞が陰窩下部領域で確率的に対称分裂または非対称分裂し、有限回数分裂後に成熟細胞になるというシンプルなシナリオにより、実験データへの定量的なフィッティングに成功した。また実験的に観察されている陰窩のモノクローナル化も定性的に再現できた。本シナリオ、およびフィッティングによって見積もられたパラメーター値（幹細胞対称分裂確率、幹細胞領域、幹細胞数）は、報告されている文献の内容と定性的・定量的に比較して妥当なものであり、本モデルが大腸陰窩における細胞の増殖分化機構を模倣するシミュレーターの基盤となり得ることを示唆し

た。

さらに本モデルを基盤として、アポトーシスのダイナミクスを導入したモデルを構築し、放射線照射後のアポトーシス細胞の陰窩内分布の時間的・空間的分布の実験データ(Marshman et al. 2001 J. Pathol.)を定量的に再現することに成功した。その際、幹細胞、および増殖細胞の世代毎に、アポトーシスを起こす確率が異なることが示唆された。

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 2 件)

Chen-Yu Hsieh, Toshifumi Osaka, Eri Moriyama, Yasuhiro Date, Jun Kikuchi, Satoshi Tsuneda, Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*, 査読有, Vol. 3, No. 3, 2015, e12327. DOI: 10.14814/phy2.12327

Yuki Kagawa, Noriko Horita, Hideki Taniguchi, Satoshi Tsuneda, Modeling of stem cell dynamics in human colonic crypts in silico, 査読有, Vol. 49, No. 2, 2014, 263-269. DOI 10.1007/s00535-013-0887-x

[学会発表](計 17 件)

森山恵里, 大坂利文, 伊達康博, 菊地淳, 常田聡, DSS 腸炎の寛解誘導に関わる腸管内細菌代謝物動態の解析, 第 66 回日本生物工学会大会, 2014 年 9 月 11 日, 札幌.

大坂利文, 謝鎮宇, 森山恵里, 伊達康博, 菊地淳, 常田聡, 腸内細菌による腸管上皮バリア機能の強化・修復, 第 18 回腸内細菌学会, 2014 年 6 月 11 日, 東京.

大坂利文, 松浦諒, 常田聡, 腸内細菌代謝産物を介した大腸上皮細胞の炎症応答抑制, 第 17 回腸内細菌学会, 第 17 回腸内細菌学会, 2013 年 6 月 13 日, 東京.

三木硬介, 大坂利文, 伊達康博, 菊地淳, 常田聡, 腸炎の病態形成に寄与する腸内環境因子の探索, 第 63 回日本生物工学会, 2011 年 9 月 23 日, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

常田 聡 (Tsuneda, Satoshi)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号: 30281645

(2) 連携研究者

大坂 利文 (Osaka, Toshifumi)
早稲田大学・理工学研究所・招聘研究員
研究者番号: 70514470

加川 友己 (Kagawa, Yuki)
早稲田大学・ナノ理工学研究機構・研究員
研究者番号: 90409649