

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590931

研究課題名(和文)細胞膜有機イオン輸送体および接着分子による新規微生物認識機構の解明と腸炎への関与

研究課題名(英文) Novel roles of transporters and adherent molecules of epithelial membrane in the recognition of bacteria

研究代表者

藤谷 幹浩 (Fujiya, Mikihiro)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80322915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：バシラス菌および新規麦芽乳酸菌の培養上清から腸管上皮バリア機能を増強する活性物質であるcompetence and sporulation factor (CSF)とポリリン酸を同定することに成功した。これらの活性物質は、細胞膜トランスポーターOCTN2およびインテグリンα5β1により腸管上皮に認識され、細胞内に取り込まれることで、腸管障害を改善することが明らかになった。これは、Toll様受容体やNODsなどのパターン認識受容体を介さない、新たな宿主-腸内細菌のコミュニケーションシステムの存在を示唆するとともに、菌由来活性物質を用いた新規腸炎治療開発への足がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：Competence and sporulation factor and polyphosphate were identified as bioactive molecules from the conditioned media of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus brevis* SB88, respectively. These molecules improved the intestinal injury through their transport by OCTN2 and binding to integrin α5β1, respectively. The novel communication systems between the host and bacteria are distinct from the mechanisms mediated by pattern-recognition receptors, such as Toll-like receptors and NODs. These results are therefore expected to positively contribute to the development of new drugs for the treatment of intestinal inflammation using bacteria-derived molecules.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：下部消化管学(小腸、大腸) 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

消化管に生息する800種類を超える腸内細菌は、宿主である哺乳動物の腸管内に生涯にわたって共生し、腸管の恒常性維持に寄与している。その認識機構のひとつとして、菌の構成成分などを認識する toll-like receptors や Nods などのパターン認識受容体(pattern recognition receptors; PRRs)が発見され、NFkBなどの細胞内シグナルの活性化を通じて、上皮の細胞内環境を変化させていることが知られている。しかし、腸内細菌、特にプロバイオティクスの中には、これらの PRRs を介さず作用を発揮するものが多数存在し、新たな細菌認識機構の存在が示唆されていた。我々はバシラス菌が分泌する活性ペプチド (competence and sporulation factor; CSF)が腸管上皮細胞膜の有機イオントランスポーターである OCTN2 を介して上皮細胞内に取り込まれ、これをトリガーとして p38MAPK 経路の活性化や細胞防御蛋白 heat shock proteins (Hsps)が誘導され、細胞保護作用が発揮されることを明らかにした。すなわち、細胞膜トランスポーターによる菌由来活性物質の輸送を通じた、新しい細菌認識機構の存在を初めて証明した(Fujiya M, et al. Cell Host & Microbe, 2007)。さらに、その後の preliminary な研究から、新規乳酸菌由来の活性物質が上皮細胞膜接着分子であるインテグリンを介して、炎症や酸化ストレスに対する腸上皮の防御作用を発揮することを示した。すなわち、腸内細菌の認識機構には、PRRsに加え、細胞膜有機イオントランスポーターやインテグリンなどの細胞表面分子が関係していると考えられる。また、細胞膜トランスポーターである OCTNs や MDR-1、およびインテグリンの遺伝子多型が炎症性腸疾患患者で高率に認められることが知られており(Pelteková VD, Nature, 2004)(van Heel DA, Genes Immun, 2001)、これらの細胞表面分子を介した細菌認識機構の異常と腸管炎症との関連性が強く示唆される。以上から、腸管上皮細胞にはこれら細胞表面分子を介した細菌認識機構が存在すると考えられるが、その詳細な機能や腸管疾患における異常については全く不明である。

2. 研究の目的

- (1) 腸内細菌由来の生理活性物質を同定し、その認識機構を明らかにする。
- (2) これら新規認識機構による細胞内環境の変化を明らかにする。
- (3) 腸管炎症における、これら新規細菌認識機構の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 腸内細菌由来の生理活性物質を同定し、その認識機構を明らかにする。
種々の腸内細菌の培養上清を各種カラムにて分離・精製し、腸管上皮における Hsps

の誘導能や上皮バリア機能の増強作用を同定し、各種細胞表面分子の発現を特異的に抑制した細胞株を作成し、細胞態度の変化から認識機構に関する細胞表面分子を同定する。

(2) これら新規認識機構による細胞内環境の変化を明らかにする。

1.で同定した菌由来活性物質によって腸上皮に誘導される分子、microRNA および液性因子の分泌について網羅的に解析する。各種細胞表面分子の発現抑制モデルを用いこの作用が 1.で示した認識機構により仲介されるか否か明らかにする

(3) 腸管炎症における、これら新規細菌認識機構の役割を明らかにする。

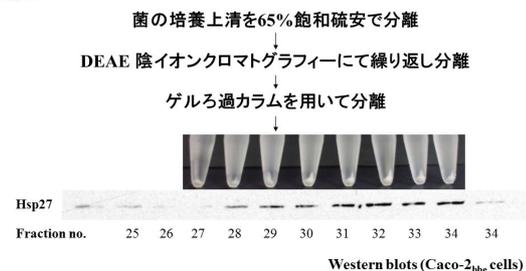
各種腸炎モデルにおいて、1.で明らかにした細菌認識機構に関連する細胞表面分子と病態との関係を明らかにする。

4. 研究成果

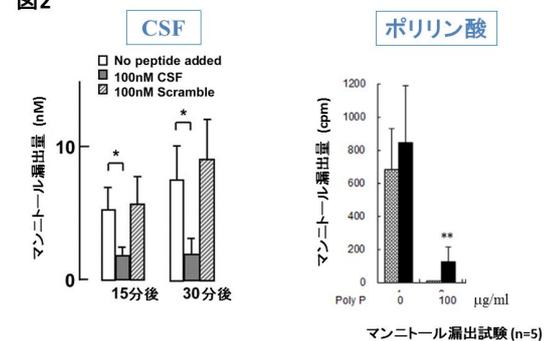
(1) 腸内細菌由来の生理活性物質を同定し、その認識機構を明らかにする。

バシラス菌および新規麦芽乳酸菌 SB88 の培養上清を分離して多数の分画を作製し、Hsp 誘導能を検討した。これを繰り返して、分画を絞り込んだ結果(図1)バシラス菌由来の活性物質 competence and sporulation factor (CSF)および新規麦芽乳酸菌 SB88 由来の活性

図1



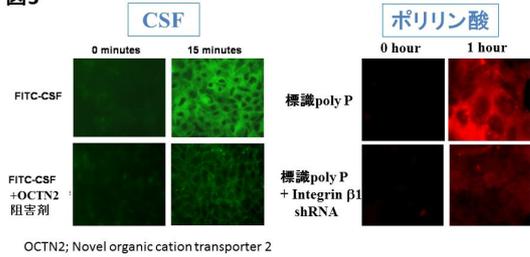
物質ポリリン酸を同定することに成功した。これらの活性物質は腸管上皮細胞のバリア機能を著しく増強させることを、マンニトール漏出試験により明らかにした(図2)。さらに FITC およびポリリン酸結合ペプチドを用いて CSF、ポリリン酸を標識し、大腸上皮由来細胞 Caco2/bbe に添加した。その結果、短時間のうちに、これらの活性物質は細胞内に取り込まれた。さらに、各種細胞表面分子を阻害して同様の試験を行った結果、CSF では



来細胞 Caco2/bbe に添加した。その結果、短時間のうちに、これらの活性物質は細胞内に取り込まれた。さらに、各種細胞表面分子を阻害して同様の試験を行った結果、CSF では

上皮細胞膜トランスポーターOCTN2 阻害によって、ポリリン酸ではインテグリンβ1 阻害によって、この取り込みは低下した(図3)。以上から、バシラス菌および新規麦芽乳酸菌

図3



SB88 由来の活性物質は、腸管バリア機能を増強する作用を持つこと、それぞれ別の新しい認識機構によって宿主腸管上皮に認識されることが示された。

(2) これら新規認識機構による細胞内環境の変化を明らかにする。

これらの新規認識機構が、腸内細菌由来活性物質の生理作用と関係するかどうかについて、それぞれの細胞表面分子の抑制系を用い検討した。その結果、CSFの腸管バリア機能増強作用はOCTN2のsiRNAによって、低下した。また、ポリリン酸の腸管バリア機能増

図4

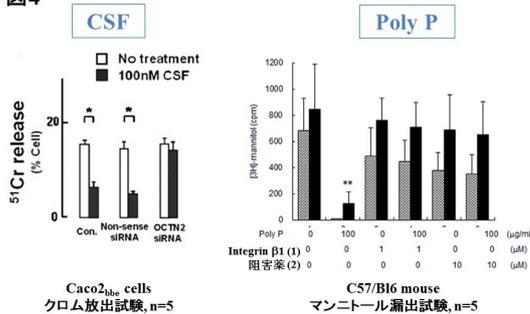
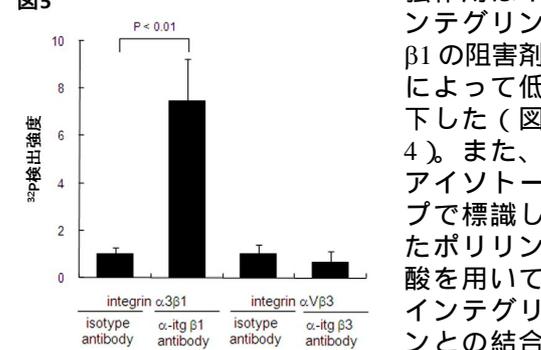


図5



強作用はインテグリンβ1の阻害剤によって低下した(図4)。また、アイソトープで標識したポリリン酸を用いてインテグリンとの結合能力を検討した結果、インテグリンβ1との結合は認められたが、インテグリンβ3との結合能力は無く、この結合はインテグリンβ1 特異的なものであると考えられた(図5)。

(3) 腸管炎症における、これら新規細菌認識機構の役割を明らかにする。

DSS腸炎モデルを用いて、CSFおよびポリリン酸の作用を解析した。その結果、CSFは急性腸炎モデルにおける腸管障害を改善し(図6)、致死的腸炎モデルにおけるマウス生存率を向上した(図7)。CSFの作用を仲介す

ると考えられるOCTN2の発現を検討した結

図6

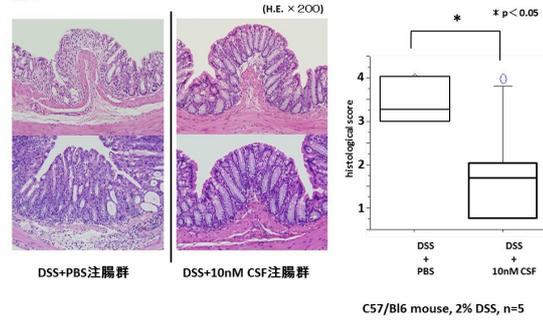
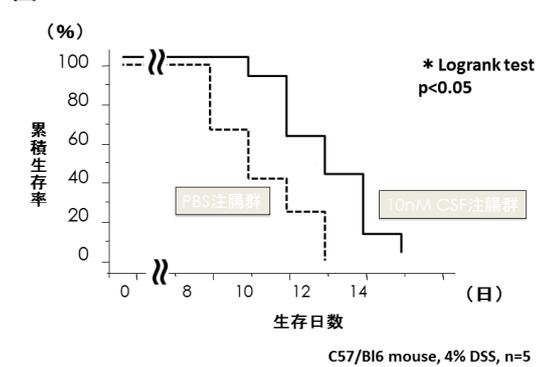
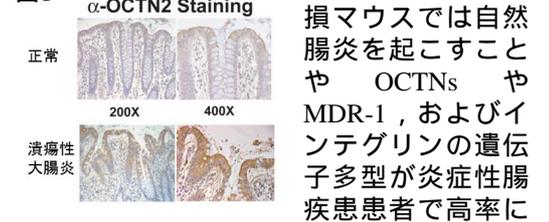


図7



果、健康人の腸管での発現を認め、さらに炎症性腸疾患患者では、発現が亢進していた

図8



(図8) OCTN2欠損マウスでは自然腸炎を起こすことやOCTNsやMDR-1、およびインテグリンの遺伝子多型が炎症性腸疾患患者で高率に認められることが知られている。以上から、CSFは腸炎による腸管障害を改善し、その作用機序にOCTN2の機能が関与しているものと考えられた。また、ポリリン酸も急性腸炎

図9

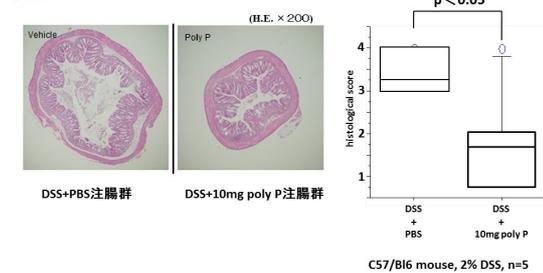
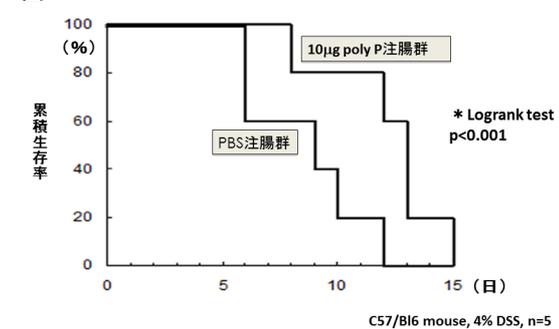


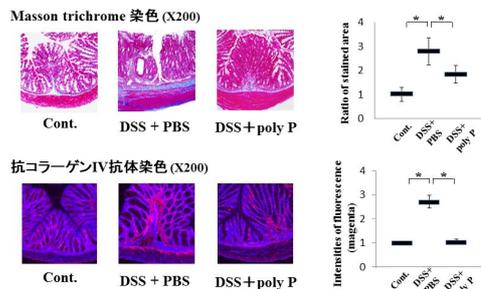
図10



C57/Bl6 mouse, 4% DSS, n=5

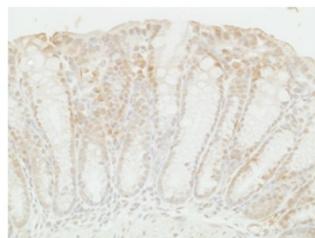
モデル(図9)、致死性腸炎モデル(図10)に対して同様の効果を認め、加えて慢性腸炎モデルにおける線維化の改善効果も認めた(図11)。また、インテグリンβ1が腸管上皮

図11



C57/Bl6 mouse, 2% DSS (慢性腸炎モデル), n=5

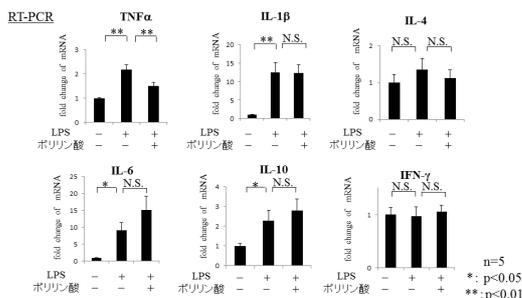
の管腔側に発現していることを確認した(図12)。さらに、マクロファージに分化誘導した免疫担当細胞由来株を大腸菌由来リポ



インテグリンβ1免疫染色(X40)

リサッカライドを用いて炎症状態にし、ポリリン酸で処理した結果、リポポリサッカライドによって誘導された炎症性サイトカイン

が抑制された(図13)。したがって、新規芽乳酸菌 SB88 由来の活性物質であるポリリン酸は、インテグリンβ1を介した腸管上皮障害の改善作用およびマクロファージの TNFα



腸管障害を改善するものと考えられた。

本研究により、腸内細菌の中に活性物質を産生・分泌する菌が存在し、それぞれのユニークな認識機構を介して、腸管障害改善作用を発揮することが明らかになった。この成果は、Toll様受容体などのパターン認識受容体を介さない、新たな宿主-腸内細菌のコミュニケーションシステムの存在を示唆するとともに、菌由来活性物質を用いた新規腸炎治療開発への足がかりとなった。現在、本研究成果を基盤として、他の研究資金を獲得し、前臨床研究を行っている。

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54件)

1. Ueno N, Hasebe T, Kaneko A, Yamamoto M, Wang Y, Fujiya M, Kohgo Y, Kono T, Musch MW, Chang EB. Daikenchuto, a Japanese traditional medicine, blocks DSS-induced intestinal inflammation and damage. *PLoS One* (in press)
2. Fujiya M, et al. Decreased vessel networks and irregular vessel on narrow band imaging are useful findings to distinguish intestinal lymphoma from lymphoid hyperplasia. *Gastrointest Endosc* (in press)
3. Fujiya M, et al. microRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells via the autophagolysosomal degradation of oncogenic heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *Oncogene* (in press)
4. Sawada K, Ohtake T, Hasebe T, Abe M, Tanaka H, Ikuta K, Suzuki Y, Fujiya M, Hasebe C, Kohgo Y. Augmented hepatic Toll-like receptors by fatty acids trigger the pro-inflammatory state of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology Research* (in press)
5. Ichiki K, Ikuta K, Addo L, Tanaka H, Sasaki Y, Shimonaka Y, Sasaki K, Ito S, Shindo M, Ohtake T, Fujiya M, Torimoto Y, Kohgo Y. Up-regulation of iron regulatory hormone hepcidin by interferon α . *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 29(2):387-94, 2014.
6. Fujiya M, et al. Probiotic treatments for induction and maintenance of remission in inflammatory bowel diseases: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin J Gastroenterol* 7(1):1-13, 2014.
7. Sakatani A, Fujiya M, et al. Infliximab extends the duration until the first surgery in patients with Crohn's disease. *Biomed Research International* 2013:879491, 2013.
8. Nata T, Fujiya M, et al. microRNA-146b improves intestinal injury in mouse colitis by activating NF- κ B and improving epithelial barrier function. *Journal of Gene Medicine* 15(6-7):249-60, 2013.
9. Takahashi N, Yoshizaki T, Hiranaka N, Suzuki T, Yui T, Akanuma M, Kanazawa K, Yoshida M, Naito S, Fujiya M, Kohgo Y, Ieko M. Endoplasmic reticulum stress suppresses lipin-1 expression in 3T3-L1 adipocytes. *BBRC* 431(1):25-30, 2013.
10. Fujiya M, Kohgo Y. Image-enhanced endoscopy for the diagnosis of colon neoplasms. *Gastrointest Endosc* 77(1):111-118, 2013
11. Okamoto K, Fujiya M, et al. Competence and sporulation factor derived from Bacillus

- subtilis improves epithelial cell injury in intestinal inflammation via immunomodulation and cytoprotection. *Int J Colorectal Diseases* 27(8):1039-46, 2012.
12. Moriichi K, Fujiya M, et al. Back-to-Back Comparison of Auto-Fluorescence Imaging (AFI) versus High Resolution White Light Colonoscopy for Adenoma Detection. *BMC Gastroenterology* 12(1):75, 2012.
 13. Konno Y, Ashida T, Inaba Y, Ito T, Tanabe H, Maemoto A, Ayabe T, Mizukami Y, Fujiya M, Kohgo Y. Isoleucine, an essential amino acid, induces the expression of human b-defensin 2 through the activation of the G-protein coupled receptor-ERK pathway in the intestinal epithelia. *Food and Nutrition Sciences* 3(4):548-555, 2012.
 14. Wakita Y, Shimizu C, Nakakita Y, Kaneda H, Kanda H, Segawa S, Shigyou T, Ohtake T, Fujiya M, Kohgo Y. Effect of Lactobacillus brevis SBC8803 on Gamma-Glutamyl Transferase in Japanese Habitual Drinkers: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Food and Nutrition Sciences* 3(5):678-684, 2012.
 15. Tanaka H, Li Z, Ikuta K, Addo L, Akutsu H, Nakamura M, Sasaki K, Ohtake T, Fujiya M, et al. Iron Uptake Facilitator LS081 Induces The Degradation of Hypoxia Inducible Factor-1 and Functions as Anti-Cancer Agent in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Science* 103(4):767-74, 2012.
 16. Watari J, Moriichi K, Tanabe H, Kashima S, Nomura Y, Fujiya M, et al. Biomarkers predicting development of metachronous after endoscopic resection: an analysis of molecular pathology of Helicobacter pylori eradication. *Int J Cancer* 130(10):2349-58, 2012.
 17. Moriichi K, Fujiya M, et al. Autofluorescence imaging and the quantitative intensity of fluorescence for evaluating the dysplastic grade of colonic neoplasms. *Int J Colorectal Diseases* 27 (3): 325-330, 2012.
 18. Takahashi N, Yoshizaki T, Hiranaka N, Suzuki T, Yui T, Akanuma M, Oka K, Kanazawa K, Yoshida M, Naito S, Fujiya M, Kohgo Y, Ieko M. Suppression of lipin-1 expression increases monocyte chemoattractant protein-1 expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 11;415(1):200-5, 2011.
 19. Ueno N, Fujiya M, et al. Heat-killed body of Lactobacillus brevis SBC8803 ameliorates intestinal injury in a murine model of colitis by enhancing the intestinal barrier function. *Inflammatory Bowel Diseases* 17(11):2235-50, 2011.
 20. Sato R, Fujiya M, et al. The diagnostic accuracy of high-resolution endoscopy, autofluorescence imaging and narrow-band imaging for differentially diagnosing colon adenoma. *Endoscopy* 43(10):862-8, 2011.
 21. Kashima S, Nata T, Fujiya M, et al. Obscure gastrointestinal bleeding from vascular lesions formed by venous and lymphatic congestion due to post-operative adhesion and subsequent mesenteric torsion 50 years after appendectomy. *Gut* 60 (10):1344, 2011.
 22. Segawa S, Fujiya M, et al. Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway. *PloS One* 6 (8): e23278, 2011.
 23. Ueno N, Fujiya M, et al. Endoscopic auto-fluorescence imaging is useful for the differential diagnosis of intestinal lymphomas resembling lymphoid hyperplasia. *J Clin Gastroenterol* 45(6):507-13, 2011.
 24. Fujiya M, et al. Cytokine Regulation of OCTN2 Expression and Activity in Small and Large Intestine. *Inflammatory Bowel Diseases* 17(4):907-16, 2011.
 25. Kono T, Ashida T, Ebisawa Y, Chisato N, Okamoto K, Katsuno H, Maeda K, Fujiya M, Kohgo Y, Furukawa H. A New Antimesenteric Functional End-to-End Handsewn Anastomosis: Surgical Prevention of Anastomotic Recurrence in Crohn's Disease. *Dis Colon Rectum* 54(5):586-92, 2011.
- 〔学会発表〕(計 30 件)
1. Ueno N, Fujiya M, et al. Long-term oral dietary administration of a new probiotic, Lactobacillus brevis SBC8803, alters gut the microbiota and ameliorates DSS-induced colitis in mice. DDW 2014 (AGA), Chicago 2014.05.06.
 2. Fujiya M, et al. A probiotic-derived polyphosphate improves chronic inflammation and fibrosis via caveolin-dependent endocytosis. GI Research Academy 2013, Kyoto 2013.06.28.
 3. Fujiya M, et al. A polyphosphate derived from Lactobacillus brevis improves the intestinal barrier function and injury in acute and chronic experimental colitis. 13th International Conference of FFC, Kyoto 2013.05.11.
 4. Konishi H, Fujiya M, et al. A probiotic-derived polyphosphate improves chronic inflammation and fibrosis via caveolin-dependent endocytosis. DDW 2013 (AGA), Orland 2013.05.21.
 5. Sakatani A, Fujiya M, et al.

- Probiotic-derived polyphosphate inhibits colon cancer progression through the inactivation of the ERK pathway and the induction of cancer cell apoptosis. DDW 2013 (AGA), Orland 2013.05.21.
6. Inaba Y, Fujiya M, Kohgo Y. The novel probiotic function through activation of intestinal epithelial autophagy. The novel probiotic function through activation of intestinal epithelial autophagy. 16th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2013), Vancouver 2013.07.17.
 7. Fujiya M, et al. Polyphosphate derived from Lactobacillus contributes to the maintenance of intestinal homeostasis and the improvement of intestinal injury in experimental colitis. 10th Asian IBD Symposium, Seoul 2012.11.03.
 8. Fujiya M, et al. Polyphosphate is a novel active molecule derived from Lactobacillus brevis that contributes to the maintenance of intestinal homeostasis and the improvement of intestinal injury in acute and chronic experimental colitis. DDW 2012 (AGA), San Diego 2012.05.20.
 9. Inaba Y, Fujiya M, Musch MW, Boone D, Kohgo Y, Chang EB. Activation of Intestinal Epithelial Autophagy as a Potential and Novel Mechanism of Probiotic Action in the Gut. 7th Congress of ECCO, Barcelona 2012.02.16.
 10. Segawa S, Fujiya M, et al. Lactobacillus brevis Culture Supernatant Induces Cytoprotective Small Heat Shock Protein HSP27 and Increase Intestinal Barrier Function by Activating the p38 MAPK Pathway. 15th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2011), Paris 2011.07.05.

〔図書〕(計2件)

1. Tanabe H, Fujiya M, Kohgo Y. Trypsin acts as an activating enzyme in gut innate immunity, *Trypsin: Structure, Biosynthesis and Functions* Trypsin: Structure, Biosynthesis and Functions, edited by Kirk Weaver and Clayton Kelly. Hauppauge (NY): Nova Science Publishers Inc., 2012, 133-139. (ISBN 978-1-61942-319-0)
2. Fujiya M, Moriichi K, Ueno N, Saitoh Y, Kohgo Y. Autofluorescence imaging for diagnosing intestinal disorders. *Colonocopy/Book 1*, Edited by Paul Miskovitz, InTech, Rijeka (Croatia), 2011.

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称：腸管保護剤

発明者：高後 裕，藤谷幹浩，上野伸展，瀬川修一，小林直之
 権利者：旭川医科大学
 種類：特許
 番号：PCT/JP2011/057689
 出願年月日：2011年3月28日
 国内外の別：国外

取得状況 (計2件)

名称：消化器癌に対する抗腫瘍剤
 発明者：高後 裕、藤谷幹浩、岡本耕太郎
 権利者：旭川医科大学
 種類：特許
 番号：特許第5190849号
 取得年月日：2013年2月8日
 国内外の別：国内

名称：腸管保護剤
 発明者：高後 裕，藤谷幹浩，上野伸展，瀬川修一，小林直之
 権利者：旭川医科大学
 種類：特許
 番号：特許第5526320号
 取得年月日：2014年4月15日
 国内外の別：国内

〔その他〕

6. 研究組織
 (1)研究代表者
 藤谷幹浩 (FUJIYA Mikihiro)
 旭川医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：80322915

(2)研究分担者
 大竹孝明 (Ohtake Takaaki)
 旭川医科大学・医学部・講師
 研究者番号：10359490