

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2016

課題番号：23590954

研究課題名(和文)ふなずし由来新規ラクトバシラス属菌が有する強力な抗炎症効果の作用機序

研究課題名(英文)The mechanism of action of strong anti-inflammatory effects in novel Lactobacillus probiotic strains isolated from Japanese "Funazushi"

研究代表者

岡田 義清 (Okada, Yoshikiyo)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・内科学・助教)

研究者番号：90531137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、伝統的発酵食品である「ふなずし」より新規ラクトバシラス属菌菌株を2株、単離した。本菌株は、DSS大腸炎モデルマウスにおいて、一般的なプロバイオティクスである *Lactobacillus gasseri*(LG)を上回る抗炎症作用を有していた。本菌株は樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞に直接的に作用することでユニークな形質変化を惹起し、大腸固有粘膜層におけるTreg細胞を増加させることで、LGより強い抗炎症作用を示すことが示唆された。以上より、日本の伝統的発酵食品は、従来のプロバイオティクスに比し強い抗炎症作用を有する未知のプロバイオティクスの有力な単離源となり得る事が示された。

研究成果の概要(英文)：We isolated novel *Lactobacillus* probiotic strains from "Funazushi" that is known to Japanese traditional fermented foods. Those strains showed strong anti-inflammatory effects on DSS-induced colitis than those of *L.gasseri*, conventional type of probiotics. Our data also suggest that a stronger anti-inflammatory effects of those strains on DSS-induced colitis are initiated by the phenotypic change in intestinal dendritic cells characterized high α 8-integrin expression, leading to induce Tregs through induction of active-form of TGF- β mediated by those DCs. Our results demonstrated that Japanese traditional fermented foods such as "Funazushi" are valuable source for probiotics that has strong anti-inflammatory effects compared to conventional type of probiotics.

研究分野：消化器内科学

キーワード：発酵食品 プロバイオティクス 抗炎症作用 炎症性腸疾患 樹状細胞 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎およびクローン病を代表とする疾患で、いずれも腸管に原因不明の炎症が惹起される。近年、炎症性腸疾患の予防・治療として、生体に有用な生きた微生物(プロバイオティクス)が注目されている。現在、実験動物モデルおよび臨床試験に供されているプロバイオティクスの単離源は、ヒトや動物の消化管もしくは乳製品由来のラクトバシラス属菌やビフィドバクテリウム属菌が一般的であり他の単離源は、ほとんど知られていない。乳製品以外にラクトバシラス属菌を含有する食品として、味噌、醤油、漬物などの日本の伝統的発酵食品が知られている。

申請者らは、滋賀県の伝統的発酵食品「ふなずし」を常食すると下痢症が改善されるなど、免疫系に影響を及ぼしていると推察される民間伝承の存在に着目し、ふなずし中にはヒトや動物の消化管もしくは乳製品由来のプロバイオティクスよりも、優れた抗炎症効果を持つラクトバシラス属菌が存在するという仮説を立て、新規菌株の探索を以下のように実施した。

ふなずしを細粉した後に乳酸菌選択培地上にて培養し、コロニーを得た。得られたコロニーを、LPSで刺激したマクロファージ系株化細胞に作用させ、炎症性サイトカインの分泌量を測定することにより、抗炎症作用を評価しスクリーニングを行った。500株以上のスクリーニングを実施した結果、きわめて強い抗炎症作用を有する新規ラクトバシラス属菌を2株単離することができた。単離された2株において、16SrRNA配列による遺伝学的分類とその生物学性状を精査したところ、*Lactobacillus buchneri* および *L. buchneri* にきわめて近縁な菌種とそれぞれが同定された。

(Okada.Y et al. Gastroenterology 2008 134 4(suppl.1) A-362)(特許公開番号 2010-099024)

2. 研究の目的

前述のように、ふなずし由来新規ラクトバシラス属菌株は優れた抗炎症効果を有することが判明したが、その作用機序については不明である。一般的なプロバイオティクスの作用機序は、そのほとんどが、短鎖脂肪酸などのプロバイオティクスによる代謝産物によるものや腸内環境の改善作用に着目しており宿主免疫系への影響は、あまり検討されていない。

本研究の目的は、大腸炎症時において、ふなずし由来新規ラクトバシラス属菌株が宿主免疫系へいかなる影響をおよぼすか精査することで、抗炎症効果の作用機序を明らかにし、さらに炎症性腸疾患治療への実際の

応用を考えることである。

3. 研究の方法

ふなずし由来新規ラクトバシラス属菌を C57BL/6 系マウスに 7 日間、経胃投与した。比較対象として、ヒト腸管由来であるプロバイオティクス株 *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323(以下、LG と表記)を同様に投与した。続いて飲用水を 5%DSS 水溶液に交換し、7 日間自由飲水させた(DSS 大腸炎モデルマウス)。菌の投与は DSS 水溶液期間中も継続した。体重変化、腸炎スコア、大腸の組織学的検討および炎症性サイトカインの mRNA 発現の定量により、抗炎症作用の評価を行った。これに加えて、大腸組織中の制御性 T 細胞数および腸間膜リンパ節中の樹状細胞を単離し、各種のサイトカイン産生などを検討した。また、*in vitro* の試験として、ふなずし由来新規ラクトバシラス属菌をマウス骨髄由来樹状細胞(BMDCs)に作用させ、各種サイトカインなどに対する影響を検討した。さらに、作用させた BMDCs を DSS 大腸炎モデルマウスに移入し、抗炎症作用を評価した。

4. 研究成果

ふなずし由来新規ラクトバシラス属菌は、DSS 大腸炎モデルマウスに対して、従来のプロバイオティクスである LG に比し、高い抗炎症作用を有することが確認され、大腸組織中には多くの制御性 T 細胞が誘導されていた。この抗炎症作用は生菌の投与の他に、熱処理した死菌の投与でも同等の効果が認められた。したがって、ふなずし由来新規ラクトバシラス属菌は、これまでプロバイオティクスの作用機序として提唱されている生きたプロバイオティクス株による代謝産物(短鎖脂肪酸など)や腸内細菌叢の改善によるものではなく、菌体成分そのものが直接的に作用し、DSS 大腸炎に抗炎症作用を発揮すると考えられた。

ふなずし由来新規ラクトバシラス属菌の抗炎症作用の作用機序をさらに調べるための *in vitro* 試験では、菌体成分そのものが直接的に作用し、特徴的な形態変化である beta8 インテグリンの強い発現を惹起する事が判明した。発現した beta8 インテグリンは、潜在型 TGF-beta を活性化型 TGF-beta に変換することが報告されている(Gastroenterology. 2011;141(5):1802-12.)。我々のデータにおいても、ふなずし由来新規ラクトバシラス属菌は従来のプロバイオティクスである LG に比し、培養上清中に高濃度の活性化型 TGF-beta を分泌させた。さらに、ナイーブ T 細胞とふなずし由来新規ラクトバシラス属菌を作用させた BMDCs を共培養することで、従来のプロバイオティクスである LG に比し効率的に制御性 T 細胞が誘導された。また、ふなずし由来新規ラクトバシラス属菌を作

用させた BMDCs を DSS 大腸炎モデルマウスに移入したところ、投与と同等の強い抗炎症作用が認められた (Okada.Y et al. J Gastroenterol. 2017, In press 査読あり)。

本研究で用いたふなずし由来新規ラクトバシルス属菌は、日本を含むアジア各国で認められる伝統的な発酵食品の、なれ寿司の一種である「ふなずし」(Jpn. J. Food Microbiol., 28(1), 9-15, 2011)が単離源の新規単離株である。よって、単離源であるふなずしを食する食生活を介して、炎症性腸疾患を始めとする炎症疾患の予防・治療を習慣的に行うことが可能となるだけでなく、安全性が高く産業ベースへの移行が容易である等のメリットも多い。これらは、薬剤療法を中心とする従来までの炎症性腸疾患の予防・治療法にはない新たな「治療用食品」の概念が考えられる。

独特の匂いと風味を有するふなずしを始めとする各種の伝統的な発酵食品は、かつては一般的な滋養・保存食として継承され、日常的に日本人の腸管に取り入れられてきたと考えられる。ところが、食生活の欧米化と経済発展によって多種多様な食品を選択できる現代においては、喫食する機会は激減した (日本家政学会誌 Vol. 63 No. 11 737 ~ 744, 2012)。それに反する動きで、潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患の患者数は増加の一途を辿っている (J Gastroenterol. 2009;44(7):659-65)。伝統的発酵食品の摂取量と炎症性腸疾患の患者数増加を裏付ける科学的エビデンスは、現在までのところ報告されていない。しかしながら、本研究において、ふなずし中より強力な抗炎症作用を有するラクトバシルス属菌が単離され、さらにそれらがユニークな作用機序を有する事が判明した事実は、今後の日本人の食生活と炎症性腸疾患の関わりについて考察を深める一要因となり得る。

また、従来のプロバイオティクスはヒト・動物の腸管や乳製品が主な単離源であったが、本研究は、これらの単離源に加えて伝統的発酵食品が強力な抗炎症作用を有する新規プロバイオティクス株の有力な単離源であることを示した。我が国では、ふなずしの他に多種多数の伝統的発酵食品が存在する。今後、新たな機能・効能を有するプロバイオティクス株の発見が期待できる。

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2件)

1. Yoshikiyo Okada, Yoshikazu Tsuzuki, Takajo Takeshi, Hirotaka Furuhashi, Masaaki Higashiyama, Chikako Watanabe, Kazuhiko Shirakabe, Chie Kurihara,

Shunsuke Komoto, Kengo Tomita, Shigeaki Nagao, Soichiro Miura and Ryota Hokari. A novel probiotics isolated from Japanese traditional fermented foods, "Funazushi", attenuates DSS-induced colitis through increasing the induction of high integrin α v/ β 8 expressing dendritic cells. J Gastroenterol. 2017, In press 査読あり

2. 岡田義清、都築義和、佐藤宏和、成松和幸、安武優一、穂苅量太、富田謙吾、栗原千枝、高本俊介、渡辺知佳子、永尾重昭、三浦総一郎: ふなずし由来新規ラクトバチラス属菌が有する強力な大腸炎抑制の作用機序. 消化器と免疫 50 42-43

[学会発表](計9件)

1. 岡田義清、都築義和、安武優一、丸田紘史、好川謙一、富田謙吾、栗原千枝、高本俊介、渡辺知佳子、永尾重昭、三浦総一郎、穂苅量太: 伝統的発酵食品由来プロバイオティクスの DSS 腸炎に対する抗炎症作用の検討. 第 11 回日本消化管学会総会学術集会 2015.02.13-02.14, 東京

2. 岡田義清、都築義和、安武優一、丸田紘史、好川謙一、富田謙吾、栗原千枝、高本俊介、渡辺知佳子、永尾重昭、三浦総一郎、穂苅量太: 伝統的発酵食品中に存在するプロバイオティクスの大腸炎治療への応用とその作用機序. 第 45 回日本消化吸収学会総会 2014.11.22, 東京

3. Yoshikiyo Okada, Yoshikazu Tsuzuki, Hirokazu Sato, Kazuyuki Narimatsu, Yuichi Yasutake, Koji Maruta, Kengo Tomita, Chikako Watanabe, Shunsuke Komoto, Chie Kurihara, Shingo Usui, Shigeaki Nagao, Soichiro Miura and Ryota Hokari: A novel probiotics isolated from Japanese "Funazushi" potently exerts a therapeutic effect on DSS-induced colitis. 第 56 回日本消化器病学会大会(JDDW2014) 2014.10.23-10.26, 神戸

4. 岡田義清、都築義和、三浦総一郎: 伝統的発酵食品ふなずし由来新規プロバイオティクスの樹状細胞を介した大腸炎抑制機序. 第 44 回日本消化吸収学会総会、第 21 回日本消化器病週間内合同企画 JDDW2013 Tokyo 2013.10.09-10.12, 東京

5. 岡田義清、都築義和、佐藤宏和、成松和幸、安武優一、穂苅量太、富田謙吾、栗原千枝、高本俊介、渡辺知佳子、永尾重昭、三浦総一郎: ふなずし由来新規ラクトバチラス属菌が有する強力な大腸炎抑制の作用機序.

6. Yoshikiyo Okada, Yoshikazu Tsuzuki, Hirokazu Sato, Kazuyuki Narimatsu, Yuichi Yasutake, Ryota Hokari, Kengo Tomita, Chie Kurihara, Shunsuke Komoto, Chikako Watanabe, Atsushi Kawaguchi, Shigeaki Nagao, Soichiro Miura: Probiotics isolated from Funazushi modulates NK-1R expression in colonic epithelial cells in vitro and attenuated DSS-induced colitis. Falk Symposium 188 2013.06.07-06.08, ドイツ、シュツットガルト

7. 岡田義清、三浦総一郎: ふなずし由来新規ラクトバシルス属菌のDSS大腸炎抑制機序. 日本食品免疫学会 2012.10.16-10.17, 東京

8. Yoshikiyo Okada, Yoshikazu Tsuzuki, Ryota Hokari, Soichiro Miura et al.: A novel vegetable-derived probiotics (VDP) exerts a therapeutic effect on DSS induced colitis possibly mediated by IL-27 producing CD11c+ dendritic cells. 米国消化器病学会週間(DDW2012) 2012.05.19-5.22, 米国、サンディエゴ

9. Yoshikiyo Okada, Yoshikazu Tsuzuki, Ryota Hokari, Soichiro Miura et al.: A novel vegetable-derived probiotics (VDP) modulates proinflammatory cytokines and substance P expression on colonic tissue and attenuated DSS-induced " colitis. 米国消化器病学会週間(DDW2011) 2011.5.11, 米国、シカゴ

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田 義清 (Yoshikiyo Okada)
防衛医科大学・内科学講座・助教
研究者番号：90531137

(2)連携研究者

穂苅 量太 (Ryota Hokari)
防衛医科大学・内科学講座・教授
研究者番号：90255464

三浦 総一郎 (Soichiro Miura)
防衛医科大学・学校長
研究者番号：50138012

(4)研究協力者

都築 義和 (Yoshikazu Tsuzuki)
埼玉医科大学・消化管内科
研究者番号：10236929