

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659119

研究課題名（和文）冬眠動物における腸内細菌叢と腸粘膜バリア：新しい共生様式の解明

研究課題名（英文）Gut microbiota and gut mucosal barrier in hibernating animals

研究代表者

園山 慶 (SONOYAMA KEI)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：90241364

研究成果の概要（和文）：冬眠動物における腸内細菌の制御と腸粘膜バリアについて解析した。シリアンハムスターの冬眠個体では小腸管腔内の分泌抗体濃度が高く、感染防御に貢献している可能性が考えられた。実際、冬眠ハムスターでは腸間膜リンパ節への細菌の移行は認められなかった。また免疫組織におけるリンパ球プロファイルの解析の結果、冬眠期においても消化管粘膜における感染防御機能および免疫制御機能が維持されていると推察された。さらに、冬眠ハムスターの小腸粘膜上皮における細胞更新が著しく遅滞しており、それにより細胞寿命の延長にともなう細胞老化が生じていることが推察された。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the control of gut microbiota and gut mucosal barrier in hibernating animals. In hibernating Syrian hamsters, we observed higher concentrations of secretory antibodies in the small intestinal contents, suggesting its contribution to protection against infection. Indeed, no bacteria were observed in the mesenteric lymph node of hibernating hamsters. Analysis of lymphocyte profiles in the immune tissues indicated that ability to protect against infection and to regulate immune function may be maintained in the gut of hibernating hamsters. Furthermore, we found that cell renewal of intestinal epithelium is markedly retarded in hibernating hamsters.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：冬眠、腸内細菌叢、腸粘膜バリア、上皮細胞、シリアンハムスター

1. 研究開始当初の背景

非冬眠動物においては、経口的な栄養摂取を長期間行わないと腸粘膜バリア機能が低下し、腸内細菌の侵入による全身感染の危険が増大する。ところが冬眠動物においては、自発的な長期絶食が行われるにもかかわらず、腸内細菌の侵入により生命が脅かされる機会が増加するという証拠はない。したがって、冬眠動物においては、腸内細菌叢を制御

して日和見感染を防ぐ未知の機構が存在する可能性がある。しかしながら、冬眠動物の腸内細菌叢および腸粘膜バリアについては、これまで調べられてこなかった。

2. 研究の目的

本研究では冬眠動物に特異的な腸内細菌の制御系と腸粘膜バリアを解明することを目的とした。とりわけ、腸管腔内の抗菌・静

菌分子、粘液バリアを形成するムチンおよび分泌型抗体 (S-IgA)、さらに粘膜バリアの最前線である上皮の密着結合に着目し、活動期と冬眠期について以下のような比較を行った。冬眠動物のモデルとして、シリアンハムスターとニホンツキノワグマを用いた。

- (1) 腸内細菌叢の構成
- (2) 腸内の抗菌・静菌活性
- (3) 腸粘膜透過性および腸内細菌の生体内への侵入頻度
- (4) ムチンおよび S-IgA の産生・分泌レベルおよび産生細胞の動態
- (5) 腸粘膜上皮の密着結合の構造および構成タンパクの発現レベル

3. 研究の方法

(1) 実験動物

10 週齢雄性シリアンハムスターを室温 4°C、24 時間暗黒条件で飼育することにより冬眠を誘導し、冬眠開始の約 1 ヶ月後に安楽死させて各種臓器を採取した。対照として活動期の自由摂食群と 96 時間絶食群を設けた。一方、阿仁マタギの里熊牧場 (秋田県北秋田市) で飼育されているツキノワグマを用い、麻酔下で肛門より内視鏡を挿入し、腸内容物および腸粘膜組織を採取した。

(2) 菌叢解析

ツキノワグマ腸内容物より DNA を分離し、細菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく次世代シーケンシングによる菌叢解析に供した。

(3) 抗菌活性

シリアンハムスターの小腸内容物をペーパーディスク法による抗菌活性の測定に供した。供試菌株には、*Salmonella typhimurium* SL-3770、*Staphylococcus aureus* AHU 1142、および *Saccharomyces cerevisiae* AHU 3118 を用いた。

(4) 腸管透過性

シリアンハムスターの回腸を用いて反転サックを作成し、*ex vivo* における西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の透過量を測定した。また、腸間膜リンパ節 (MLN) から RNA を分離して PCR によって細菌の 16S rRNA 遺伝子を検出することにより、MLN への腸内細菌の移行の確認を試みた。

(5) 組織化学

シリアンハムスターの腸管組織から凍結切片およびパラフィン切片を作成し、各種の組織染色を施し、光学顕微鏡およ

び蛍光顕微鏡下で観察を行った。また、走査型および透過型電子顕微鏡による観察も行った。さらに、小腸粘膜上皮の細胞増殖を調べるためにプロモデオキシウリジン (BrdU) パルス実験を行い、免疫染色により腸粘膜組織における BrdU 陽性細胞を検出した。

(6) S-IgA

シリアンハムスターの小腸内容物中の S-IgA 濃度を ELISA により測定した。また、腸粘膜組織の IgA 陽性細胞を蛍光免疫染色により観察した。

(7) フローサイトメトリー

シリアンハムスターの腸粘膜固有層、MLN、脾臓、および肝臓より単核球を分離し、抗体染色を施してフローサイトメトリーによりリンパ球サブセットを解析した。

4. 研究成果

(1) 小腸内の抗菌活性と分泌抗体

シリアンハムスターの冬眠個体および活動個体の小腸管腔内における抗菌活性をペーパーディスク法によって比較したが、*S. typhimurium* SL-3770、*S. aureus* AHU 1142、および *S. cerevisiae* AHU 3118 のいずれに対しても有意な抗菌活性は認められなかった。

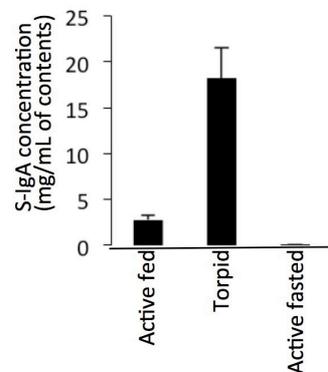


図1 シリアンハムスターの小腸内容物中の S-IgA 濃度

一方、消化管腔における生体防御の中心を担う分泌抗体すなわち S-IgA については、ハムスター小腸内容物中の濃度を ELISA により測定した結果、活動個体に比して冬眠個体で著しい高値を示し、また活動期の絶食個体では自由摂食個体に比して低値を示した (図 1)。そこで小腸粘膜固有層における IgA 産生細胞を免疫組織染色により観察したところ、冬眠個体と活動個体との間に明確な差異は認められなかった (図 2)。そのため、冬眠個体で管腔内の S-IgA 濃度が高い理由としては S-IgA の管腔への分泌の増加と管腔

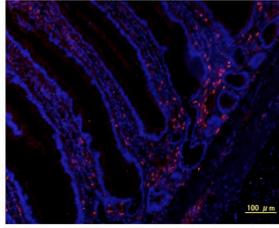


図2 シリアンハムスターの小腸におけるIgA陽性細胞の蛍光免疫染色

内での安定性の増加が考えられる。いずれにしても、冬眠個体における腸管の細菌感染防御にS-IgAの増加が貢献している可能性がある。

(2) 腸管透過性

ハムスター回腸における透過性を *ex vivo* において評価した結果、HRP 透過量は冬眠個体において活動期の自由摂食個体に比較して有意に高く、冬眠時には腸管透過性が亢進することが推察された

(図3)。しかしながら、MLNにおける16S rRNA 遺伝子の検出を試みたところ、冬眠個体および活動個体ともに検出限界以下であり、冬眠中に腸管透過性が亢進するとしても腸内細菌はMLNに移行することはないと考えられた。

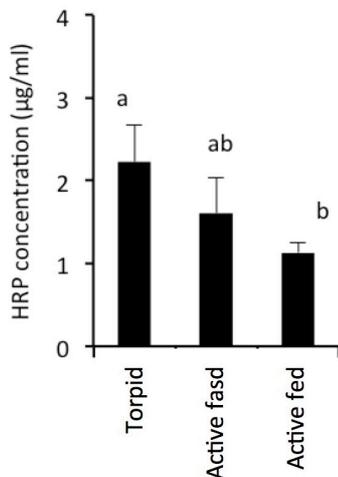


図3 シリアンハムスターの回腸反転サックにおけるHRPの透過量

(3) 免疫組織におけるリンパ球プロファイル

ハムスターの肝臓および脾臓においてB細胞(CD45R⁺細胞)およびナチュラルキラー細胞(NK1.1⁺細胞)の割合が活動個体に比較して冬眠個体でやや高値を示したが、小腸粘膜固有層におけるTh17細胞(CD4⁺RORγt⁺細胞)およびTreg細胞(CD4⁺FoxP3⁺細胞)の割合は冬眠個体と活動個体の間で大差はなかった。これらのことより、冬眠期においても消化管粘膜

における感染防御機能および免疫制御機能が維持されているものと推察した。

(4) 腸粘膜上皮の細胞更新

ハムスターを用いたBrdUパルス実験の結果、小腸粘膜上皮におけるBrdU陽性細胞は、活動個体ではBrdU投与48時間後には既に絨毛上部に到達していたが、冬眠個体では240時間後においても陰窩

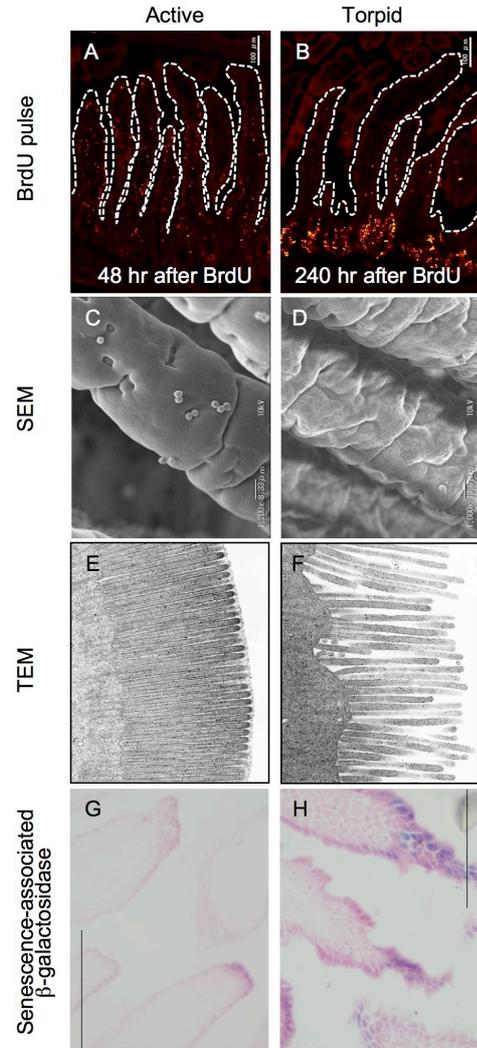


図4 冬眠シリアンハムスターの小腸粘膜上皮における細胞更新の遅滞とそれともなう構造変化

にとどまったままであった(図4A, 4B)。これらのことは、冬眠個体における腸粘膜上皮の細胞更新の著しい遅滞を示唆している。小腸粘膜上皮の微細構造変化を知るために走査型電子顕微鏡観察を行った結果、活動個体では絨毛表面が円滑であったのに対し、冬眠個体では粗雑に見える(図4C, 4D)、透過型電子顕微鏡観察では、上皮細胞膜に存在する微絨毛が活動個体では整然と並び、その表面には糖

衣が観察されたのに対し、冬眠個体では微絨毛の配列が乱雑で、糖衣も明瞭に認められなかった(図 4E, 4F)。以上のことから、冬眠個体の小腸粘膜上皮では、細胞更新が遅滞しているのにもなって、細胞の微細構造の変化も生じていることが示唆された。また、上皮細胞の機能についても解析したところ、冬眠個体では消化酵素活性の上昇や杯細胞におけるムチン糖鎖の変化が見られ、上皮細胞の過成熟が示唆された。さらに、冬眠個体の小腸粘膜では絨毛上部の上皮細胞に細胞老化関連β-ガラクトシダーゼの活性が認められた(図 4G, 4H)。すなわち、冬眠個体の小腸粘膜上皮における細胞更新の遅滞により、細胞寿命の延長にともなう細胞老化が生じるものと推察された。

(5) その他

ツキノワグマ腸内細菌叢を、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく次世代シーケンシングにより解析を進めている。

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)

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 園山 慶、チミジンアナログによる二重標識法を用いた腸上皮細胞移動速度の推定、第 42 回日本栄養・食糧学会北海道支部会、2012 年 10 月 27 日、とちぎプラザ(帯広市)
- (2) Kei Sonoyama, Hypermaturity and senescence of intestinal epithelial cells in hibernating Syrian hamsters, 14th International Hibernation Symposium, 10th August 2012, Semmering (Austria)
- (3) 園山 慶、冬眠シリアンハムスターの腸粘膜上皮の細胞回転停滞により成熟した上皮細胞が増加する、第 66 回日本栄養・食糧学会大会、2012 年 5 月 19 日、東北大学(仙台市)
- (4) 園山 慶、冬眠ハムスターにおけるリンパ球プロファイル、第 66 回日本栄養・食糧学会大会、2012 年 5 月 19 日、東北大学(仙台市)
- (5) 園山 慶、冬眠中のシリアンハムスターの小腸刷子縁膜酵素活性、第 41 回日本栄養・食糧学会北海道支部会、2011 年 10 月 23 日、天使大学(札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

園山 慶 (SONOYAMA KEI)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：90241364

(2) 研究分担者

坪田 敏男 (TSUBOTA TOSHIO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：10207441

滝口 満喜 (TAKIGUCHI MITSUYOSHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：70261336