

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 6月 7日現在

機関番号：82111
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23780274
 研究課題名（和文）乳酸菌による腸管神経・上皮間クロストーク調節の解明と消化管疾病予防への応用戦略
 研究課題名（英文）Elucidation of modulation of crosstalk between enteric nervous system and intestinal epithelium by the stimulation with lactic acid bacteria
 研究代表者
 遠野 雅徳（TOHNO MASANORI）
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜飼養技術研究領域・研究員
 研究者番号：50547718

研究成果の概要（和文）：ストレスを感じた人や家畜において、腸内細菌叢が悪化し、腸管の神経機能が破綻してしまう例が知られています。本研究では、これらの問題改善に向けて、乳酸菌由来成分と腸管神経の相互作用について検討しました。本研究により、乳酸菌由来成分でもある細胞壁成分に腸管神経調節作用が認められました。今後、これらの成果を基礎として、プロバイオティクスを活用した創薬や機能性食品・飼料創成が期待できます。

研究成果の概要（英文）：Disruption of the intestinal microflora balance and the function of enteric nervous system are caused by feeling stress in human and livestock. The purpose of this study was to elucidate the modulation of crosstalk between enteric nervous system and intestinal epithelium by the stimulation with lactic acid bacteria. We found that low-molecular peptidoglycan fragments, muramyl dipeptide, had an ability to modulate the function of enteric nervous system. The present study could help in the development of new physiologically functional probiotic foods, feeds and drugs contributing to modulation of enteric nervous system.

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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：乳酸菌、プロバイオティクス、消化管生理、腸管神経

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、過敏性腸症候群（通称 IBS）などの機能性消化管障害の罹患率は、日本を含む先進国で成人の 11～20%、中高校生の 6～14% に激増しており、消化器診療中、最大頻度となっている。増大する医療費問題と同時に、腹痛や下痢症状等による患者の Quality of Life への損害は極めて深刻である。本疾病の原因として、腸内細菌叢の悪化やストレスによる脳腸相関を介した機能異常が指摘されており、罹患者が急増している。

(2) 下痢は全世界において発生頻度第 2 位の疾患であり、原因として、腸内細菌叢の悪化や腸管神経支配下の腸管上皮細胞における水分分泌機構の異常が指摘されている。畜産分野でも、下痢等の消化管異常による経済的損失、家畜健全育成・家畜福祉問題が深刻である。以上の社会背景・ニーズの中で、プロバイオティクスの応用を詳細に追究すべきであると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトや家畜に激増するストレス性の消化管機能障害・下痢の予防改善に向けて、本疾病の一破綻作用点である腸管神経-上皮間クロストークに着目する。本クロストークと乳酸菌との相互作用における成分・機能・機構の解明を目指す。プロバイオティクス研究では未解明である「腸管神経との相互作用」の追究により、罹患率が成人の約5人に1人である本疾病に対して、予防に寄与するプロバイオティクス機能素材の開発基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学的手法による近位及び遠位結腸における Calcitonin gene-related peptide (CGRP) 陽性腸管神経の解析

BALB/c マウス (雄、8-10 週齢) より近位及び遠位結腸を摘出し、ザンボニ液により組織固定後、抗 CGRP 抗体を用いた免疫染色により、その組織局在を検討した。

(2) 乳酸菌およびその由来成分刺激による腸管神経-上皮間クロストーク調節評価系の構築

齧歯類腸管を用いた ussing chamber (培養チャンパー) 法を基盤として、ボルテージクランプアンプ (電流測定器) による測定法と、乳酸菌及びその由来成分刺激のための組織培養法を両立させた。本系には、ストレス電気シグナルモデルとしての電気刺激装置を設置した。

本研究では、プロバイオティクス乳酸菌由来成分による腸管神経調節作用のモデル評価として、細菌の細胞壁に見出される可溶性ペプチドグリカン断片である muramyl dipeptide (MDP) に着目した。その際、神経・イオンチャネル等の遮断薬を併用することにより、MDP の本クロストークにおける調節作用点について薬理的に追究した。また、ヒトや家畜に対して有効なプロバイオティクス乳酸菌株の候補として、各種植物由来乳酸菌を分離し、生理・生化学的性状解析及び 16S rRNA 遺伝子塩基配列解析により、分離菌株の同定を行った。

(3) MDP 認識関連分子である nucleotide-binding domain-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) の組織発現解析とその発現誘導解析

MDP 認識関連分子の中でも、腸管神経に発現するインターロイキン 1 beta (IL-1beta) 受容体のリガンドである IL-1beta の活性化に重要な NLRP3 について、齧歯類の他に家畜

である豚をモデルとして、各種組織における発現をリアルタイム PCR 法により検討した。また、MDP 等の微生物由来成分に加えて各種乳酸菌株 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 及び *Lactobacillus gasseri*) により刺激後の NLRP3 の発現誘導を検討した。

4. 研究成果

(1) プロバイオティクス乳酸菌やその構成成分と腸管神経との相互作用の検討に先立ち、消化管における腸管神経の局在を明確化するため、齧歯類の近位及び遠位結腸における CGRP 陽性腸管神経の局在を検討した。マウス近位及び遠位結腸の粘膜固有層、粘膜下神経層及び筋層に CGRP 陽性腸管神経が存在し、その一部は管腔側の腸管上皮細胞直下まで局在していることが認められた (図 1)。

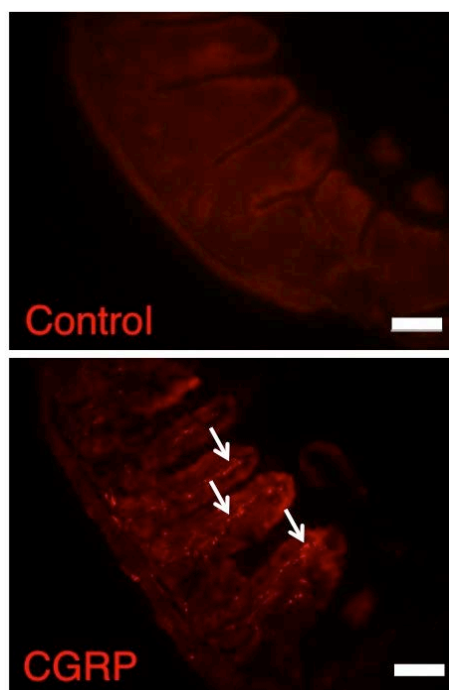


図 1. マウス近位結腸における CGRP 陽性腸管神経 (赤色) の免疫組織学的解析。倍率 200 倍。スケールバーは 100 μm 。矢印は CGRP 陽性の腸管神経線維を示す。

以上のことから、経口摂取後のプロバイオティクス乳酸菌やその構成成分が、腸管上皮層に存在する取り込み細胞である M 細胞や樹状細胞突起により消化管上皮から生体内に取り込まれた後、腸管上皮細胞直下の腸管神経線維と直接相互作用する可能性が考えられた。

(2) マウス近位及び遠位結腸 (各実験区 n=8) を摘出し、保温 (37°C) および酸素化 (95% O_2 , 5% CO_2) 処理 Krebs 溶液と培養チャンパーを

用いた短絡電流法により、供試腸管部位を組織培養した。本培養系に、電気シグナルモデルとしての電気刺激装置とボルテージクランプアンプを設置し、可溶性ペプチドグリカン断片であるMDPを粘膜側から刺激し、その後の電氣的活動変化を測定した。すなわち、近位及び遠位結腸粘膜側よりMDP(D-D isomer、L-L isomer及びD-L isomer、10及び50 ug/mL)刺激を実施後、180分間培養した。本刺激時間中、30分間隔で電気刺激装置による全神経刺激(50V、20Hz、5秒)を実施した。

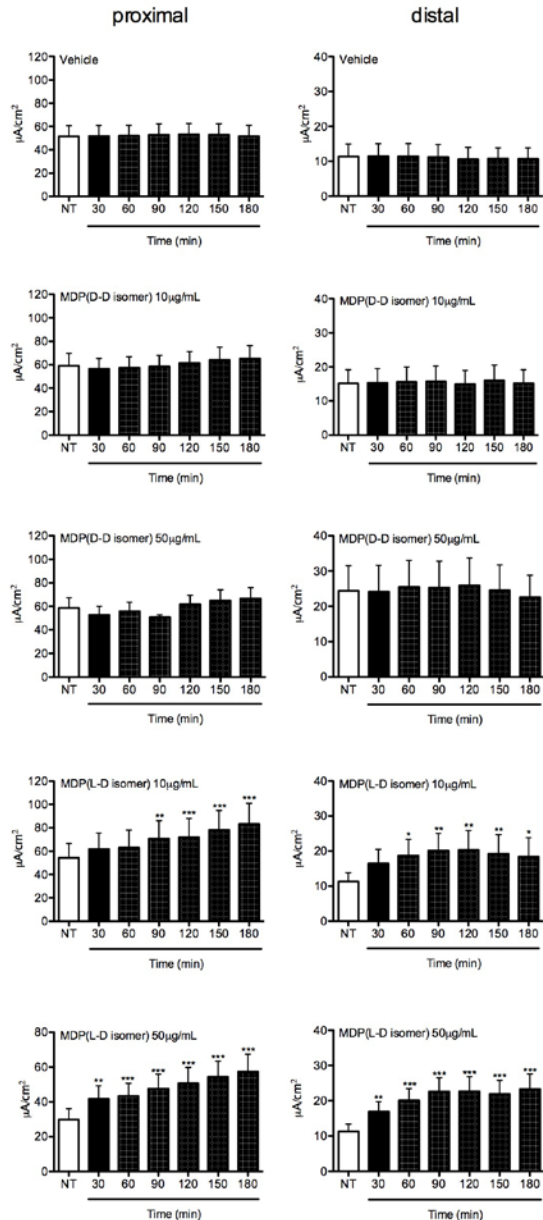


図2. マウス近位及び遠位結腸におけるMDP添加後の全神経刺激による短絡電流変化。マウス近位(proximal)及び遠位(distal)結腸におけるMDP添加区(D-D isomer、L-L isomer及びD-L isomer、10及び50 ug/mL)及び無添加区(vehicle)の全神経刺激後の短絡電流

変化。*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 及び* $p < 0.05$ 。

本系を用いて、乳酸菌の細胞壁成分でもあるD-L isomer MDPによる齧歯類近位及び遠位結腸粘膜側への刺激を実施し、その後全腸管神経刺激をしたところ、経時的な短絡電流の顕著な上昇が認められた。また、本作用は免疫刺激能の高い活性体であるL-L isomer MDPで認められる一方、非活性体であるD-D isomer MDPには認められなかった(図2)。

このMDPによる短絡電流の上昇は、テトロドトキシンの添加により、完全に消失することが認められており、乳酸菌等の微生物由来成分であるMDPに腸管神経調節作用が明らかとなった。

(3) 我々の先行研究において、自然免疫系受容体を中心とするMDP認識関連分子のマウス近位及び遠位結腸における組織発現をRT-PCR法により解析した結果、認識関連分子であるnucleotide-binding oligomerization domain-2(NOD2)、NLRP3、P2X7 receptor(P2X7R)及びpannexin-1の遺伝子発現を見出している。本研究では、MDP認識シグナル下流においてIL-1 β の活性化に重要な役割を果たすNLRP3の各組織における定量発現解析を家畜である豚をモデル動物として実施した。

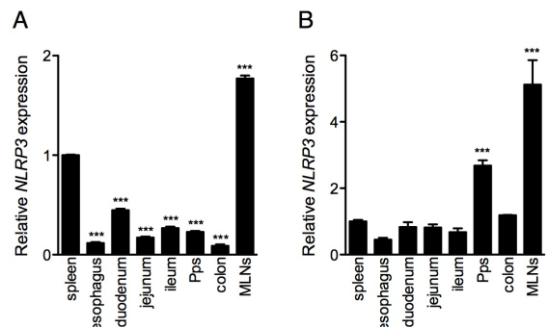


図3. リアルタイムPCR法によるNLRP3の組織発現解析(A、初生豚；B、成豚)。各組織におけるベータアクチン遺伝子発現量による両タンパク質遺伝子発現量の補正值を示す。脾臓(spleen)、食道(esophagus)、十二指腸(duodenum)、空腸(jejunum)、回腸(ileum)、パイエル板(Pps)、大腸(colon)、腸間膜リンパ節(MLNs)。*** $p < 0.001$ 。

その結果、NLRP3は、出生直後の初生および成豚のすべての供試組織において発現していることが明らかとなった。初生豚において、結腸を含む各種消化管組織におけるNLRP3遺伝子の発現は、脾臓や腸間膜リンパ節に比べて顕著に弱いですが、検出可能レベルで十分に発現していることが認められた。成豚において、NLRP3遺伝子の発現は、各種消化

管組織において強く発現していることが明らかとなり、特に腸管免疫系の組織であるパイエル板及び腸間膜リンパ節に顕著に発現が認められた。成熟期において、食道を除く消化管組織における NLRP3 発現量は、脾臓における発現量と同等であることから、成長過程における外来抗原や腸内細菌叢の発達などにより、消化管組織における本受容体の発現が増強されることが示唆され、MDP の腸管神経調節作用に寄与していることが考えられた (図 3)。

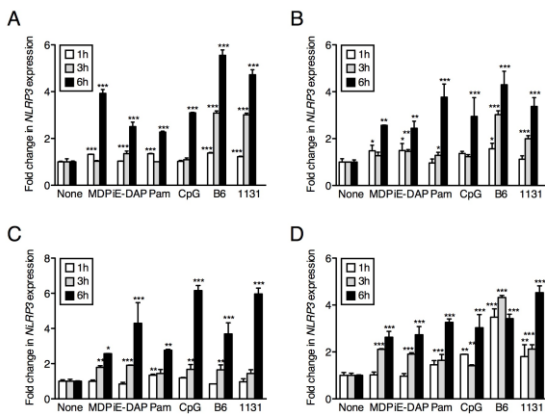


図 4. 初生及び成豚の腸間膜リンパ節及び回腸パイエル板由来細胞における NLRP3 の発現誘導 (A、初生豚の腸間膜リンパ節; B、初生豚のパイエル板; C、成豚の腸間膜リンパ節; D、成豚のパイエル板)。各組織より調製した細胞を MDP (50ug/mL)、細胞壁リポペプチド Pam3Cys4 (1ng/mL)、CpG DNA (1uM) 並びに乳酸菌体として *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NIAI B6 (100ug/mL) 及び *Lactobacillus gasserii* JCM1131^T (100ug/mL) で 1、3、6 時間刺激した。*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 及び * $p < 0.05$ (対無添加区における発現量)。

微生物由来成分である細胞壁リポペプチド、MDP 及び DNA 成分刺激により、初生および成豚の腸管において NLRP3 遺伝子の発現が誘導されることが明らかとなった。また、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NIAI B6 と *Lactobacillus gasserii* JCM1131^T の乳酸菌体刺激により、NLRP3 遺伝子の発現が誘導されたことから、腸管において、プロバイオティック乳酸菌が NLRP3 受容体を介する MDP 認識機構の成立と MDP による腸管神経調節作用に寄与することが示唆された。

(4) 腸管神経とも相互作用するヒトや家畜に対して有効なプロバイオティック乳酸菌株の候補として、各種植物由来乳酸菌を分離した。その結果、日本人とも馴染みの深い米

より *Weissella* 属及び *Lactobacillus* 属新種乳酸菌を発見し、それぞれ *Weissella oryzae* 及び *Lactobacillus oryzae* と命名した。また、牧草であるチモシーサイレージより、*Lactobacillus* 属新種乳酸菌として *Lactobacillus hokkaidonensis* を発見した。生化学的解析及び系統分類学的解析により、これらの乳酸菌はその細胞壁構造に MDP を含むことが推定されることから、今後、MDP 等の微生物成分のみならずこれらの新種乳酸菌体を供試し、菌体レベルでの本作用点における本機能・機構の解明を目指すことにより、プロバイオティクスを活用した創薬や機能性食品・飼料の開発に繋がると考えられる。

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 4 件)

- ① M. Tohno, M. Kitahara, T. Irisawa, H. Inoue, R. Uegaki, M. Ohkuma, K. Tajima, *Lactobacillus oryzae* sp. nov., isolated from fermented rice grain (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 10.1099/ijs.1090.048918-048910, 査読有。
- ② M. Tohno, M. Kitahara, R. Uegaki, T. Irisawa, M. Ohkuma, K. Tajima, *Lactobacillus hokkaidonensis* sp. nov., isolated from timothy grass (*Phleum pratense* L.) silage in Hokkaido, Japan, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 10.1099/ijs.1090.047027-047020, 査読有。
- ③ M. Tohno, M. Kitahara, H. Inoue, R. Uegaki, T. Irisawa, M. Ohkuma, K. Tajima, *Weissella oryzae* sp. nov., isolated from fermented rice grains, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 1417-1420, 2013, 査読有。
- ④ M. Tohno, T. Shimosato, H. Aso, H. Kitazawa. Immunobiotic *Lactobacillus* strains augment NLRP3 expression in newborn and adult porcine gut-associated lymphoid tissues, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144, 410-416, 2011, 査読有。

[学会発表] (計 1 件)

- ① 遠野雅徳、下里剛士、麻生久、北澤春樹、腸管免疫系におけるイムノバイオティック乳酸菌による NLRP3 受容体の発現増強、日本畜産学会第 114 回大会、2011 年 7 月 28 日、青森県。

[その他]

ホームページ等

<http://www.naro.affrc.go.jp/nilgs/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠野 雅徳 (TOHNO MASANORI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構畜産草地研究所・家畜飼養技術研究領
域・研究員

研究者番号：50547718