

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460956

研究課題名(和文) 腸炎モデルおよびヒト初代培養細胞を用いた菌由来活性物質の腸管保護メカニズムの解析

研究課題名(英文) An analysis of the mechanisms through which bacteria-derived bioactive molecules protect the intestine in enteritis models and primary cultured cells

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：プロバイオティクス由来のCSFおよびポリリン酸は腸管バリア機能の改善作用を持つことを報告してきた。本研究ではその作用機序について検討した結果、CSFは有機イオントランスポーターにより上皮細胞に取り込まれ、炎症下の上皮細胞で過剰に発現するIL-6、7、CXCL-1などの炎症関連サイトカインを抑制した。ポリリン酸は腸管上皮のインテグリン α 1、カベオリン-1と複合体を形成しエンドサイトーシスにて細胞内へととりこまれ、p38 MAPK経路を活性化して腸管バリア機能を増強すると考えられた。これらの研究成果により、プロバイオティクス由来物質を用いた新規治療薬開発の基盤的成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We previously proposed that probiotic-derived CSF and polyphosphate have protective effects in the intestine. This study investigated the functional mechanisms of these molecules. CSF was transported by OCTN2 and decreased the expression of inflammation-related cytokines, including IL-6, 7 and CXCL-1. Polyphosphate formed a complex with integrin α 1 and caveolin-1 which was taken by endocytosis. It then activated p38 MAPK and augmented the intestinal barrier function, leading to the improvement of intestinal injury in a mouse model of enteritis. These results provide the detailed mechanisms of how probiotic-derived molecules protect the intestine and may contribute to the development of new drugs after the completion of preclinical and clinical studies.

研究分野：消化器内科

キーワード：腸内細菌 プロバイオティクス 炎症性腸疾患 消化器癌

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の消化管には 1000 種類を超える細菌が腸内細菌叢を形成しており腸管の恒常性維持に必須の役割を果たしている。一方、宿主に有益な作用を持つ微生物はプロバイオティクスと呼ばれ、健康増進や各種疾患への治療効果が示唆されているがその詳細なメカニズムについては不明な点が多かった。我々はこれまでに、プロバイオティクスの腸管保護作用は菌が分泌する特定の生理活性物質によって仲介されることを明らかにし、さらに詳細な菌培養上清の解析から、バシラス菌由来の competence and sporulation factor (以下 CSF) が腸管保護活性物質であることを明らかにした。これは、菌由来の腸管保護活性物質を同定した世界初の研究成果であった。その後、この技術シーズを用いて新規乳酸菌から腸管保護活性物質ポリリン酸を同定することにも成功した。これら 2 種類の菌由来物質は、腸管バリア障害を増強すること、腸炎マウスの腸管障害を著明に改善することを明らかにした。さらに、CSF は腸管上皮細胞膜トランスポーターである OCTN2 を介して細胞内に輸送されること、ポリリン酸は腸上皮表面のインテグリン 1 と結合し lipid rafts 依存性エンドサイトーシスにより上皮細胞内に取り込まれることを明らかにした。以上の成果から、腸内細菌は菌種ごとに特徴的な分子を分泌し、それぞれに親和性のある腸管上皮細胞膜分子を介して、腸管保護作用や抗炎症作用を発揮することが明らかになった。これらの菌由来活性物質を同定していくことで、新しい宿主 - 腸内細菌の相互作用が明らかになるとともに、これらの菌由来物質を用いた新規治療薬開発へと発展する可能性がある。

2. 研究の目的

(1) CSF およびポリリン酸の腸上皮細胞への直接作用とそのメカニズムの解析

CSF およびポリリン酸を投与した正常および腸炎マウスの腸組織の遺伝子発現を明らかにする。腸管上皮に発現している分子の中で CSF やポリリン酸と結合するものを同定し、その蛋白の発現を特異的に抑制した場合の、これら菌由来物質の腸管保護活性の変化を明らかにする。以上から、CSF およびポリリン酸のそれぞれの作用メカニズムおよび標的分子を明らかにする。

(2) CSF およびポリリン酸による腸内細菌叢の制御と腸管組織への作用解析

正常マウスおよび腸炎モデルマウスに CSF およびポリリン酸を投与し腸内細菌叢の変化を明らかにする。

(3) 初代培養にて樹立したヒト腸細胞株に対する CSF およびポリリン酸の作用とメカニズム解析

正常消化管組織を用い、feeder 細胞と ROCK 阻害剤を組み合わせた新規培養技術 conditional reprogramming 法により初代細

胞を増幅し、継代可能な細胞株を樹立する。この細胞株に CSF およびポリリン酸を投与して、腸管保護作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CSF およびポリリン酸の腸上皮細胞への直接作用とそのメカニズムの解析

CSF およびポリリン酸による遺伝子発現の解析

正常マウス、腸炎マウスの腸管に CSF およびポリリン酸を投与する。細胞および組織中の遺伝子発現の変化を検討する。変化が認められた分子の解析から、CSF およびポリリン酸の作用に関係する細胞内シグナル経路を検討する。正常腸管における腸管保護作用については、摘出腸管をモノクローミン添加により酸化ストレス下におきマンニトール漏出試験にて、腸管バリア機能を解析する。腸炎モデルにおける腸管保護作用については、腸管長、組織学的所見、炎症関連サイトカインの発現で評価する。以上から CSF およびポリリン酸の作用メカニズムに関する遺伝子発現が明らかになる。同様に CSF およびポリリン酸を投与した腸管組織のマイクロ RNA の発現を網羅的に検討する。変化が確認されたマイクロ RNA を siRNA を用いて抑制し、CSF およびポリリン酸の腸管保護作用の変化を検討することで、これら菌由来活性物質の作用メカニズムに関するマイクロ RNA を明らかにする。

CSF およびポリリン酸の標的分子の同定

腸管上皮細胞内での CSF の結合分子を同定する目的で、GST 標識 CSF を合成し腸管上皮細胞のライセートと反応させ、pull-down assay を行う。同定された結合蛋白の発現抑制細胞を作成して、CSF の腸管保護作用の変化を検討し、CSF の標的蛋白を決定する。一方、ポリリン酸は ³²P で標識したポリリン酸を作成し標的蛋白との結合を検討する。

(2) CSF およびポリリン酸による腸内細菌叢の制御と腸管組織への作用解析

正常マウス、腸炎マウスに CSF およびポリリン酸を投与する。便および盲腸内容物から DNA を回収する。全ての細菌で共通配列が保存されている 16s-rRNA 領域 DNA を、ユニバーサルプライマーを用いて PCR で増幅させ、制限酵素 (MspI) を用い断片化し電気泳動パターンから数値化する (T-RFLP 法)。得られたデータを主成分解析法で解析することで、腸内細菌叢の変化の程度を明らかにする。

(3) 初代培養にて樹立したヒト腸細胞株に対する CSF およびポリリン酸の作用とメカニズム解析

腸管組織を feeder 細胞と ROCK 阻害剤を組み合わせた新規培養技術 CR 法により初代細胞を増幅し、継代可能な細胞株を樹立する。この細胞株に CSF やポリリン酸を投与して、酸化ストレスに対するバリア機能の変化を評価する。

4. 研究成果

(1) CSF およびポリリン酸の腸上皮細胞への直接作用とそのメカニズムの解析

CSF およびポリリン酸による遺伝子発現の解析

CSF による遺伝子発現について検討した結果、非炎症下では大きな遺伝子発現の変化を認めなかったが、炎症下では IL-6、7、CXCL-1 などの炎症関連サイトカインの発現を抑制した。この作用に関連する細胞内シグナル伝達系は明らかにできなかった。

ポリリン酸による遺伝子発現解析の結果、p38 MAPK 経路の活性化および Heat shock protein 27 発現誘導が明らかになった。マウス DSS 腸炎モデルでは、ポリリン酸投与により腸管炎症および繊維化が抑制された(図1)。また、腸管組織中の炎症関連分、繊維化関連分子の発現低下を認めた(図2、3)。

図1 マウス DSS 腸炎モデルにおけるポリリン酸の作用

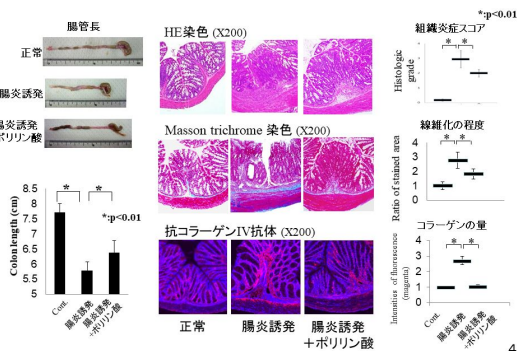


図2 マウス DSS 腸炎でのポリリン酸による炎症関連因子の変化

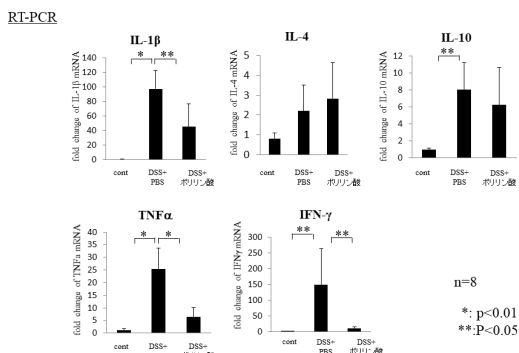
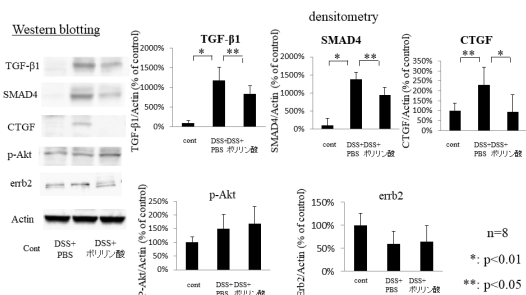


図3 マウス DSS 腸炎でのポリリン酸による繊維化関連因子の変化



引き続き、ポリリン酸の作用について、腸管組織の構成細胞である上皮細胞、マクロファージ、繊維芽細胞に分けて、作用を解析した。その結果、上皮由来 Caco2/bbe 細胞に対

しては、IL-1 および TGF 1 の発現制御が認められ、マクロファージ分化誘導 THP-1 細胞では TNF の発現抑制が認められた。一方、線維芽細胞に対して直接作用は認めなかった。すなわち、ポリリン酸はそれぞれの細胞成分に対して異なった作用を発揮すること、繊維化抑制作用は上皮細胞に過剰に発現した TGF 1 を抑制することで発揮されることが明らかになった。

CSF およびポリリン酸の標的分子の同定

CSF については、有機イオントランスポーター (OCTN2) にて上皮細胞に取り込まれることが明らかになっていたが、さらに新しい認識メカニズムは認めなかった。

ポリリン酸は上皮細胞の Integrin 1 と結合することが分かっていたが、その後の作用メカニズムは不明であった。³²P で標識したポリリン酸を腸管上皮由来 Caco2/bbe 細胞に添加したところ、短時間で細胞内に取り込まれた(図4)。このポリリン酸の取り込みは、Integrin 1 を抑制することによって減少した(図5)。

図4 ポリリン酸の上皮細胞内への取り込み

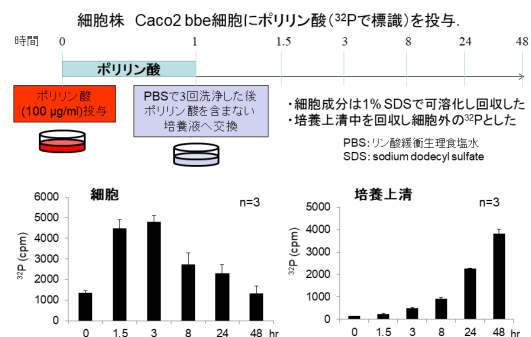


図5 ポリリン酸の上皮細胞内への取り込みに対する Integrin 1 抑制の影響

レンチウイルス発現ベクターを用いCaco2 bbe細胞にshRNAを導入し、integrin β1の発現を抑制した。コントロール群にはscramble RNA(無作為配列)を導入した。

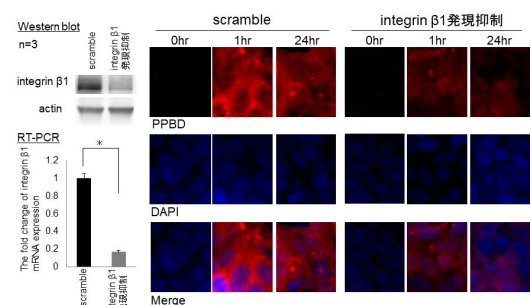
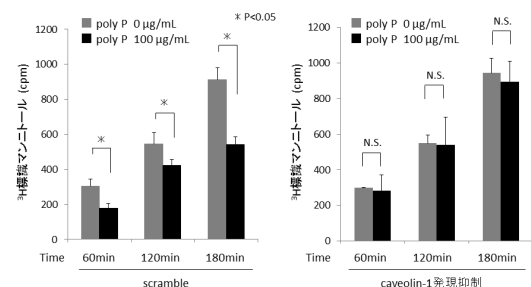


図6 caveolin-1 抑制によるポリリン酸の腸管バリア増強作用の消失

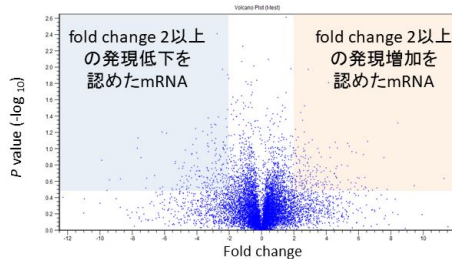
caveolin-1発現抑制Caco2 bbe細胞にポリリン酸(100 μg/mL)を投与。マンニトール漏出試験を行い、細胞バリア機能を評価。(n=3)



また、エンドサイトーシス関連分子である caveolin-1 を抑制するとポリリン酸の取り込みは減少し、腸管バリア機能の増強作用は消失した(図6)。

さらにポリリン酸によって誘導される mRNA を次世代シーケンサーにて網羅的に解析した結果、多数の mRNA で 2 倍以上の発現変化を認めた(図7)。

図7 ポリリン酸によって誘導される mRNA 発現の網羅的解析



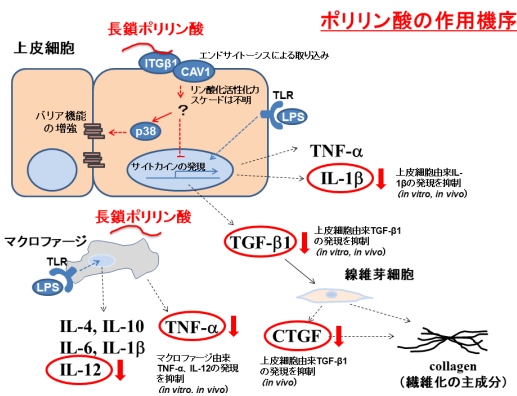
腸管バリア機能、p38 MAPKのリン酸化と関連がある以下の3つmRNAを検討対象として抽出した。

- TNFAIP3 (tumor necrosis factor alpha-induced protein 3)
- TMSβ4 (thymosin beta 4)
- DUSP2 (dual specificity phosphatase 2)

中でも、p38 MAPK 経路によって誘導される TNFAIP3 の発現を Western blotting で確認したところポリリン酸による蛋白レベルでの発現誘導を認めた。この発現誘導は caveolin-1 の抑制にて消失した。

以上の研究成果から、ポリリン酸は腸管上皮の integrin 1、caveolin-1 と複合体を形成しエンドサイトーシスにて細胞内へとりこまれ、p38 MAPK 経路を活性化して腸管バリア機能を増強すると考えられた。また、マクロファージに対しては、TNF の発現を抑制することも明らかになった。ポリリン酸はこれらの機序を介して腸炎改善作用を発揮すると考えられた(図8)。

図8 ポリリン酸の作用機序の概略

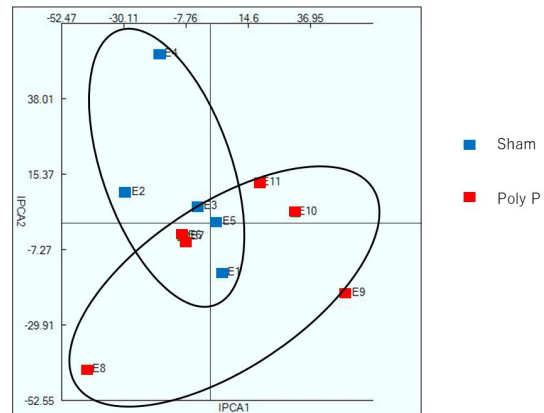


(2) CSF およびポリリン酸による腸内細菌叢の制御と腸管組織への作用解析

重度の腸炎マウスモデルを用いて、ポリリン酸による腸内細菌叢の変化を T-RFLP 法にて検討した。その結果、1 週間後のポリリン酸投与群の腸内細菌叢は非投与群のものと明らかに異なっていた(図9)。今後、腸内細菌叢の変化と腸炎の程度について解析を予

定している。

図9 ポリリン酸投与による腸内細菌叢の変化



(3) 初代培養にて樹立したヒト腸細胞株に対する CSF およびポリリン酸の作用とメカニズム解析

マウス腸管から初代培養細胞株を樹立し、CSF およびポリリン酸の作用を検討したところ、これまでの Caco2/bbe 細胞を用いた検討結果と同様であった。

当初の目的には無かったが、乳酸菌の培養上清から抗腫瘍作用を持つ分子として、フェリクロームの同定に成功した。このフェリクロームは大腸癌細胞、胃癌細胞、膵癌細胞に高い抗腫瘍効果を発揮した。一方、マウス初代培養細胞の増殖には影響しなかった。すなわち、乳酸菌由来フェリクロームは癌細胞に対しては高い抗腫瘍効果を持ち、かつ安全性の高い抗腫瘍薬となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計17件)

Goto T, Fujiya M, et al. An elevated expression of serum exosomal microRNA-191, -21, -451a of pancreatic neoplasm is considered to be efficient diagnostic marker. *BMC Cancer* 18(1):116, 2018.

Tanaka K, Fujiya M, et al. Second-line therapy for Helicobacter pylori eradication causing antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 16(1):54, 2017.

Ijiri M, Fujiya M, et al. Ferrichrome identified from Lactobacillus casei ATCC334 induces apoptosis through its iron binding site in gastric cancer

cells. *Tumor Biology* 39(6): 1010428317711311, 2017.

Hasebe T, Tanaka H, Sawada K, Nakajima S, Ohtake T, Fujiya M, , et al. Bone morphogenetic protein binding endothelial regulator of sinusoidal endothelium induces iron overload in fatty liver mice. *J Gastroenterol* 52(3):341-351, 2017.

Hasebe T, Matsukawa J, Ringus D, Miyoshi J, Hart J, Kaneko A, Yamamoto M, Kono T, Fujiya M, , et al. Daikenchuto (TU-100) Suppresses Tumor Development in the Azoxymethane and APCmin/+ Mouse Models of Experimental Colon Cancer. *Phytotherapy Research* 31(1):90-99, 2017.

Inaba Y, Ueno N, Numata M, Zhu X, Messer JS, Boone DL, Fujiya M, , et al. Soluble bioactive microbial mediators regulate proteasomal degradation and autophagy to protect against inflammation-induced stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 311(4):G634-G647, 2016.

Konishi H, Fujiya M, et al. Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK mediated apoptosis. *Nature Communications* 7:12365, 2016.

Iwama T, Sakatani A, Fujiya M, et al. Increased dosage of infliximab is a potential cause of Pneumocystis carinii pneumonia. *Gut Pathogens* 8:2, 2016.

Hasebe T, Ueno N, Musch WM, Nadimpalli A, Kaneko A, Kaifuchi N, Watanabe J, Yamamoto M, Inaba Y, Kono T, Fujiya M, , et al. Daikenchuto (TU-100) shapes gut microbiota architecture and increases

the production of ginsenoside metabolite compound K. *Pharmacology Research & Perspectives* 4(1):e00215, 2016.

Sakatani A, Fujiya M, et al. Lactobacillus brevis-derived polyphosphate inhibits colon cancer progression through the induction of cell apoptosis. *Anticancer Res* 36(2):591-8, 2016.

Konish H, Fujiya M, et al. microRNA-26a and -584 inhibit the colorectal cancer progression through inhibition of the binding of hnRNP A1-CDK6 mRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 20;467(3):541-8, 2015.

Tanaka K, Fujiya M, et al. Probiotic-derived polyphosphate improves the intestinal barrier function through the caveolin-dependent endocytic pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 27;467(4):847-52, 2015.

Kashima S, Fujiya M, et al. Polyphosphate, an active molecule derived from probiotic Lactobacillus brevis, improves the fibrosis in murine colitis. *Translational Research* 166(2):163-175, 2015.

Ando K, Fujiya M, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 improves the intestinal injury by regulating apoptosis via trefoil factor 2 in mice with anti-CD3-induced enteritis. *Inflammatory Bowel Diseases* 21(7):1541-52, 2015.

Konishi H, Fujiya M, et al. Host-Microbe Interactions via

Membrane Transport Systems. *Environ Microbiol* 17(4):931-7, 2015.

Fujiya M, , et al. microRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells via the autophagolysosomal degradation of oncogenic heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *Oncogene* 33(40):4847-56, 2014.

Ueno N, Hasebe T, Kaneko A, Yamamoto M, Wang Y, Fujiya M, , et al. TU-100 (Daikenchuto) and Ginger Ameliorate Anti-CD3 Antibody Induced T Cell-Mediated Murine Enteritis: Microbe-Independent Effects Involving Akt and NF- B Suppression. *PLoS One* 23;9(5):e97456, 2014.

〔学会発表〕(計3件)

Konishi H, Fujiya M, et al. Ferrichrome, a tumor suppressive molecule derived from *Lactobacillus casei*, inhibits the progression of colorectal cancer via the endoplasmic reticulum stress pathway. DDW 2017 (AGA), Chicago, 2017.

Fujiya M, Kohgo Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) improves the intestinal injury through upregulating trefoil factor 2 in mice with anti-CD3-induced enteritis. GI Research Academy, Tokyo, 2015

Fujiya M, Ueno N, Kohgo Y. Host-microbial interaction in IBD」A novel host-microbial interaction via the uptake of probiotic-derived molecules by intestinal epithelia. JDDW 2014 International session (Workshop 1), Kobe, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称:抗腫瘍剤
発明者:藤谷幹造、小西弘晃、盛一健太郎
権利者:同上
種類:特許
番号:特願 2016-9224
出願年月日:平成28年1月20日
国内外の別:国内

名称:抗腫瘍剤
発明者:藤谷幹造、小西弘晃、盛一健太郎

権利者:同上
種類:特許
番号:PCT/JP2017/1803
出願年月日:平成29年1月19日
国内外の別:国外

取得状況(計3件)

名称:腸管保護剤
発明者:高後 裕, 藤谷幹造, 上野伸展, 瀬川修一, 小林直之
権利者:同上
種類:特許
番号:特許第 5526320 号
出願年月日:平成21年9月4日
取得年月日:平成26年4月25日
国内外の別:国内

名称:腸管保護剤
発明者:高後 裕, 藤谷幹造, 上野伸展, 瀬川修一, 小林直之
権利者:同上
種類:特許
番号:特許第 5660508 号
出願年月日:平成23年3月28日
取得年月日:平成26年12月12日
国内外の別:国内

名称:腸管保護剤
発明者:高後 裕, 藤谷幹造, 上野伸展, 瀬川修一, 小林直之
権利者:同上
種類:特許
番号:特許第 5526320 号
出願年月日:平成23年3月28日
取得年月日:平成28年5月4日
国内外の別:国外

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤谷 幹造 (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

上野 伸展 (UENO, Nobuhiro)
旭川医科大学・医学部・特任講師
研究者番号:30436000

稲場 勇平 (INABA, Yuhei)
旭川医科大学・大学病院・その他
研究者番号:30447099 (H27.3.26 削除)

盛一 健太郎 (MORIICHI, Kentaro)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号:70455715