

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860490

研究課題名(和文)新規麦芽乳酸菌由来活性物質による腸内細菌叢変化と過敏性腸症候群への臨床応用

研究課題名(英文)The alteration of microbiota and the efficiency of treatment for IBS model mice by the novel probiotics, *Lactobacillus brevis* SB88

研究代表者

上野 伸展 (Ueno, Nobuhiro)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：30436000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、SB88死菌投与による腸内細菌叢の変化、IBSマウスモデルにおける治療効果を明らかにすることで、IBSに対する新規治療法開発の基盤的成果を得ることを目的とした。結果としてSB88死菌をマウスに投与することで腸内細菌叢を変化させることが明らかとなった、また腸内細菌層が変化したマウスほど抗炎症効果を強く発現することが明らかとなったがIBSモデルマウスへの有効性は残念ながら確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the alteration of microbiota of mice and the efficacy for the treatment of IBS model mice by the oral administration of heat-killed of *L.brevis* SB88. In result, heat-killed of *L. brevis* SB88 altered the microbiota of SPF mice after 28days oral administration. And it suppressed the expression of inflammatory cytokine of the epithelium cells in mice intestine, especially the mice which has been altered microbiota. Although it does not have strong effect for the IBS model mice.

研究分野：腸内細菌叢

キーワード：プロバイオティクス 過敏性腸症候群

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の消化管には約 1000 種類の細菌が共生し腸内細菌叢を形成している。腸内細菌叢は栄養素の代謝や腸管防御機構の増強、嫌気性代謝、血管新生、腸管リンパ組織の発達など腸管の恒常性維持に必須の役割を果たしている(Hooper LV, et al.Science:2001)。近年、腸内細菌叢の異常は多くの消化器の炎症性、腫瘍性疾患に関与していることが明らかにされつつある(A.Macpherson et al. Nature Reviews Immunology:2005)。一方、本邦において機能性消化管傷害(Functional gastrointestinal disorders; FGIDs)の患者が増加し、その予備群を含めると 3000 万人の有症状者が存在するとされる。FGIDsの代表的傷害である過敏性腸症候群(Irritable bowel disease; IBS)の病態として脳腸相関や疼痛閾値の低下に加え、感染性腸炎発症後に誘発される感染性腸炎後 IBS(post-infectious IBS; PI-IBS)などが知られている(Gwee KA et al. Lancet. 1996, Tana C et al. Neurogastroenterol Motil. 2010)。また、IBS 患者では小腸における細菌数の増加や大腸での Bifidobacterium の減少、下痢型における Lactobacillus の減少、便秘型での Veillonella の増加などが報告されているが、これらの腸内細菌叢の異常と IBS 病態との関連性については全く分かっていない。一方、動物実験により、IL-18 の長期間の腸管暴露が平滑筋細胞の過剰な増殖と筋層の肥厚をきたし、筋層間神経叢の神経細胞が減少することで消化管運動の異常を引き起こすことが明らかにされている(Kindt S et al. Neurogastroenterol Motil, 2009)。さらに最近になって、IBS の発症に toll-like receptor 9(TLR9)遺伝子、細胞接着分子である E-cadherin-1(CHD1)遺伝子、interleukin-6(IL-6)遺伝子の多型が関係していることが報告された(Villani AC et al. Gastroenterology, 2010)。以上をまとめると、IBS の発症には、腸内細菌叢の異常、IL-1b の過剰発現に起因する筋層間神経叢の障害、TLR9 や E-cadherin、IL-6 の機能異常が関係していることが示唆される。

これまでに私はプロバイオティクスの一種である新規麦芽乳酸菌(Lactobacillus brevis SBC8803; SB88 と略す)の死菌体および本菌由来の腸管保護活性物質であるポリリン酸が、マウス腸管上皮の p38-MAPK を活性化して Heat Shock Proteins(HSPs)を発現誘導し、腸管上皮のバリア機能を著明に増強すること、Dextran sulfate sodium(DSS)誘発性腸炎による炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-18、IL-6)発現を有意に抑制することを明らかにしてきた(N Ueno ,IBD,2011)(S Segawa,N Ueno,PLoS One,2011)。

本研究では、SB88 死菌および菌由来ポリリン酸による腸内細菌叢の改善作用、各種サイトカイン発現の調節作用、タイトジャンクション関連分子の誘導作用を解析し、IBS モデルにおける治療効果を明らかにすることで、IBS に対する新規治療法開発の基盤的成果を得ることを目的とした。

2. 研究の目的

- ①SB88 死菌および菌由来活性物質ポリリン酸投与による SPF マウスおよび IBS モデルマウスにおける腸内細菌叢の変化を解明する
- ②SB88 死菌および菌由来活性物質ポリリン酸投与による SPF マウスおよび IBS モデルマウスにおける炎症関連サイトカインや腸上皮バリア関連分子の発現を解明する
- ③SB88 死菌およびポリリン酸の IBS モデルに対する有効性を明らかにする

3. 研究の方法

- ① IBS モデルマウスの作成
 - ✓ T.Spiralis 感染モデル: SPF-NIH swiss マウスに対して経口的に 350-400 T.spiralis に調整した T.spiralis 幼虫を胃内に直接投与する。T.spiralis 感染後 60~90 日後のマウスを IBS モデルとして使用する。(Kalia N et al. Gut 2008)
 - ✓ 拘束ストレスモデル: C57Bl/6 マウスに対して空気穴をあけた直径 28 mm の 50 ml ファルコンチューブにマウスを 4 時間保定する。マウスはチューブ内で前後に移動することは可能だが体の向きを変えることはできないため強いストレスを負荷することが出来る。(Disyruutti E,PLoS One,2013)
 - ✓ TNBS(trinitrobenzene sulfonic acid)慢性腸炎モデル: SD ラットに対して中用量 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid(50mg/ml)とエタノールを注腸投与し、腸炎惹起後 5 日から 14 日目のマウスを用いる。(Adam B,J Gastroenterol,2013)
- ② サンプルの回収と DNA 抽出

SB88 死菌もしくはポリリン酸を一定期間混餌投与し経時的に便を回収する。一定期間投与を行ったマウスは屠殺し盲腸内容物を回収する、さらにバイオフィーム解析を行うために空腸、回腸、近位大腸、遠位大腸粘膜を回収する。それぞれのサンプルから DNA を抽出する。DNA 抽出はビーズ破砕法とフェノール・クロロホルム法から行い、以下の検討に用いる。
- ③ 腸内細菌叢解析

T-RFLP 法(Terminal restriction fragment length polymorphism)
全てのバクテリアにおいて共通に保存され

ている 16s-rRNA 領域 DNA を選択的に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。得られたデータを主成分解析法で解析する。主成分解析法は数学的解析方法であり似た腸内細菌叢をもつサンプルが各々近くにプロットされる。

次世代シーケンサを用いたメタゲノム解析による菌種の同定

全てのサンプルのシーケンスを行うことは経費と時間の面から困難であると考えられるために T-RFLP 法を用いて腸内細菌叢が変化している可能性がより高いサンプルを選別し検討に使用する。Ion torrent による細菌叢解析は通常検出限界以下となるマイナーな菌群へのアプローチができ、クローンライブラリー法より圧倒的に多くのデータを得ることができる。16s-rRNA の DNA 抽出及び PCR 増幅行程までは T-RFLP 法と同様である。PCR 産物は市販のキットを用いて精製し濃度を測定する。10 種類のライブラリーを等量ずつ混合した溶液の一部を分取してエマルジョン PCR を行う。ゲノムシーケンサは半導体チップを作成し DNA ポリメラーゼによってクヌクレオチドが取り込まれる際放出される水素イオンを検出し塩基を読みとり解析を行う。各サンプルのシーケンスデータを専用の解析ソフトウェアを用いて菌種の同定を Genus、Species レベルまで解明する。

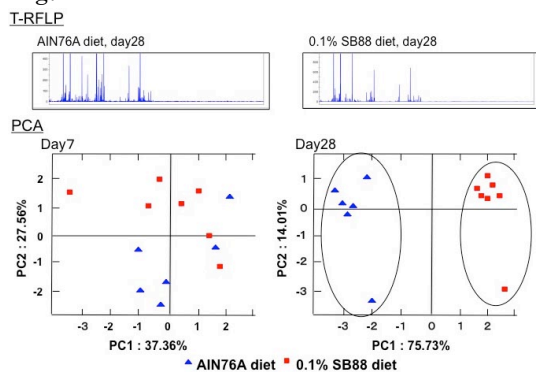
④ 関連分子発現変化の網羅的解析

SB88 死菌(ポリリン酸)混餌投与後の正常 SPF(IBS モデル)マウスの腸管上皮細胞の関連分子発現変化を RNA-seq によって網羅的に解析する。網羅的解析には腸管上皮より total RNA を抽出し市販のキットを用いて精製した後に速やかに使用する。半導体チップを作成し次世代シーケンサを用い塩基配列を同定し、専用の解析ソフトウェアを用いて比較検討する。

4. 研究成果

①SB88死菌を28日間混餌投与することでマウス腸内細菌叢が変化することが確認できた。

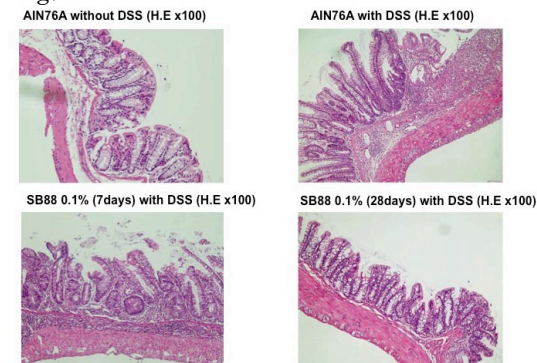
Fig.1



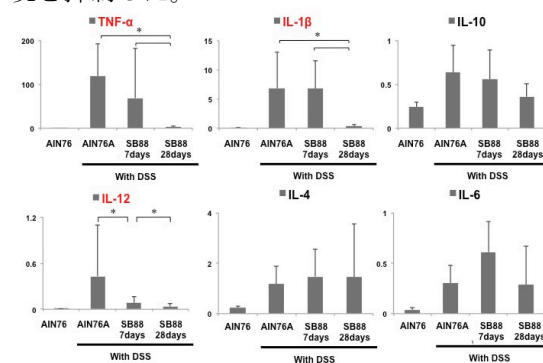
SB88 死菌混餌投与後 28 日後の解析結果である PCA1(第一主成分: X 軸)で 2 群に分けられており腸内細菌叢の強い変化を示す結果となっている。またこの変化は短期間投与(28 日以下)では認められなかった。変化した菌種については現在も解析を進めている。

②IBS モデルでは SB88 死菌投与による有効性は確認できなかったが、腸内細菌叢を変化させたマウスは慢性腸炎モデルの腸炎は改善した。

Fig.2



③腸管上皮における炎症性サイトカイン発現を抑制した。



以上の結果、IBS モデルにおける SB88 死菌投与による有効性が確認できなかったが、炎症性サイトカイン発現を抑制していたことから、SB88 死菌の有効成分であるポリリン酸が腸管に有効濃度で届いていない可能性が考えられた。そのためより有効に SB88 死菌の活性成分であるポリリン酸を腸管内に到達させるためにポリリン酸の有効発現のメカニズム解析へと移行した。

④ポリリン酸は腸管上皮細胞における TGF- β 1 の発現を抑制し、線維化を抑制することが明らかとなった。

⑤ポリリン酸は、腸管上皮細胞に対しては IL-1 β の発現抑制作用、マクロファージに対しては TNF α の発現抑制作用を発揮し、炎症を抑制することを明らかとした。

(Kashima S, Ueno N et al. Translational Research.2015.)

⑥ポリリン酸は、integrin β 1 との結合によって腸管上皮に認識され、caveolin 依存性のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることが明らかになった。

⑦High-throughput sequencing 解析にてポリリン酸投与により有意に発現量が変化

する遺伝子を検討し、バリア機能増強作用に関連する TNFAIP3、TMS64、DUSP2 を候補分子として同定した。
(Tanaka K, Ueno N et al. Biochem Bioph Res Co.2015)

本研究では、SB88 死菌による腸内細菌叢の改善作用、IBS マウスモデルにおける治療効果を明らかにすることで、IBS に対する新規治療法開発の基盤的成果を得ることを目的とした。結果として SB88 死菌をマウスに投与することで腸内細菌叢を変化させることが明らかとなった、また腸内細菌層が変化したマウスほど抗炎症効果を強く発現することが明らかとなったか IBS モデルマウスへの直接的な有効性は残念ながら確認できなかった。原因として SB88 死菌体そのものでは十分な有効量のポリリン酸が腸管内へと到達していないことが考えられた。ポリリン酸には抗炎症作用、抗線維化作用が確認でき、腸管上皮への取り込みのメカニズムの一部も明らかとなったことから、今後はポリリン酸そのものを腸溶剤カプセルとして投与することで IBS モデルマウスへの有効性を見出していきたいと考えている。今後も研究は継続していく予定である。

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 Tanaka K, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Sasajima J, Moriichi K, Ikuta K, Tanabe H, Kohgo Y. Probiotic-derived polyphosphate improves the intestinal barrier function through the caveolin-dependent endocytic pathway. Biochem Bioph Res Co. 467(3),541-548. 2015
- ② Kashima S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Ikuta K, Ohtake T, Kohgo Y. Polyphosphate, an active molecule derived from probiotic Lactobacillus brevis, improves the fibrosis in murine colitis. Translational Research.166(2):163-175, 2015.
- ③ Ueno N, Hasebe T, Kaneko A, Yamamoto M, Wang Y, Fujiya M, Kohgo Y, Kono T, Musch MW, Chang EB. TU-100 (Daikenchuto) and Ginger Ameliorate Anti-CD3 Antibody Induced T Cell-Mediated Murine Enteritis: Microbe-Independent Effects Involving Akt and NF-κB Suppression. PloS One. 23;9(5):e97456,2014.

- ④ Fujiya M, Ueno N, Kohgo Y. 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.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 上野 伸展、Long-term oral dietary administration of a new probiotic, *Lactobacillus brevis* SBC8803, alters gut the microbiota and ameliorates DSS-induced colitis in mice、アメリカ消化器病週間(DDW2014)、2014年5月5日、Chicago(USA)
- ② 上野 伸展、Oral dietary administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 alters the gut microbiome and ameliorates experimental colitis in mice、CCFA、2014年12月5日、Orlando(USA)
- ③ 上野 伸展、新規麦芽乳酸菌 (*Lactobacillus brevis* SBC8803)死菌による腸内細菌叢の変化と抗炎症作用に関する検討、第100回日本消化器病学会総会、2015年4月24日、東京
- ④ 上野 伸展、菌由来の活性物質であるポリリン酸を用いた新規炎症性腸疾患治療薬の開発、第102回日本消化器病学会総会、2016年4月23日、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

上野 伸展 (UENO, NOBUHIRO)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：30436000