

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：33937

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870499

研究課題名(和文) 運動による腸管免疫の変化：抗菌ペプチドdefensinと腸内細菌叢の関係

研究課題名(英文) The change of gut immunity by exercise: the relationship between the antimicrobial peptide "defensin" and the gut microbiota.

研究代表者

谷村 祐子 (Tanimura, Yuko)

愛知東邦大学・人間健康学部・助教

研究者番号：90551458

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)：本研究の目的は、どのような運動が抗菌ペプチド cryptdin と腸内細菌叢を変化させるか、腸内細菌叢の変化が cryptdin の変化に与えるかを検討することである。16週間の自発運動において、小腸の cryptdin 4 の発現の低下が認められた。一方で、食物繊維負荷では、cryptdin 4 の発現に影響は認められなかった。腸内細菌叢の変化は、運動や食物繊維の両方で、差異が認められた。しかしながら、その変化は cryptdin 4 の発現に、関係性は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of the current study was to examine how exercise changes the antimicrobial peptides "cryptdin" (known as cryptdin in mice), as well as the microbiota in the gut of mice, to determine how a change to the microbiota affects the expression of cryptdin in the gastrointestinal tract. Our results showed that cryptdin-4 expression in the small intestine decreased with sixteen weeks of voluntary wheel exercise, while a high-fiber diet had no effect. Although exercise and a high-fiber diet affected a change in the microbiota, this change did not affect the expression of cryptdin 4 in the small intestine.

研究分野：運動免疫学

キーワード：自発運動 デフェンシン 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

身体活動量によって消化器疾患に及ぼす影響は異なる (Peter *et al.* Gut, 2001). トライアスロンやマラソンなどの激しい運動は、腹痛・下痢・血便などの様々な消化器症状きたす一方で、高い身体活動量や、低強度のトレーニングは大腸がんの発症リスクが低い (Aoi *et al.* Gut, 2013). 運動は、強度依存的に消化管血流量の低下 (虚血) を引き起こし、運動後にはその血流量は回復する (再灌流). その結果、酸化ストレスの増大、細胞透過性の亢進、腸管上皮細胞の部分的傷害を誘発し、グラム陰性細菌由来リポ多糖の血中濃度が増加する (Bosenberg *et al.*, J Appl Physiol. 1988). このことは、腸管粘膜のバリアが破壊されて細菌の侵入を容易にし、腸は異物の侵入に対して、一種の炎症状態を引き起こす。こうした炎症が、激運動後の下痢などの消化器病態を誘起している可能性がある。

申請者は**運動と抗菌ペプチドである defensin に着目し研究を進めてきた**。

α -defensin (マウスにおける cryptdin) は腸粘膜上皮細胞、特に陰窩に存在するパネート細胞から腸管内に分泌される物質であり、外来菌の除菌メカニズムとして自然免疫応答の中心の役割を担っている。我々は加齢マウスによる運動トレーニングの cryptdin 発現の増加傾向、一過性運動の cryptdin 発現増加といった知見を得ているが限定的な運動であり更なる検討が必要であると考えている。

また、 **α -defensin の発現に腸内細菌叢が影響している**。腸内細菌の除去によって α -defensin の発現は低下するが、乳酸菌の投与によってその発現低下は抑制される (Menendez *et al.*, J Innate Immun. 2013)。近年、腸内細菌叢の変化は代謝や内分泌、免疫など全身に影響を与えることが知られてきた。運動に関しては、自発運動における

ビフィズス菌の増加 (Queipo-Ortun *et al.* PLOS ONE 2013) や腸内細菌の代謝産物である短鎖脂肪酸の増加 (Matsumoto *et al.* Biosci. Biotechnol. Biochem. 2008.) が報告されているのみである。申請者は、一過性運動後の *Firmicutes/Bacteroidetes* の増加や、加齢マウスによる運動トレーニングによる *Firmicutes/Bacteroidetes* の減少 (未発表) といったデータを得ているものの**腸内細菌叢の変化と運動に着目した研究自体が少なく、菌叢の動きに一定の見解が得られていないのが現状**である。

2. 研究の目的

本研究の目的はどのような運動が抗菌ペプチド α -defensin と腸内細菌叢を変化させるか、腸内細菌叢の変化が運動による α -defensin の変化に關与するかを検討することである。

3. 研究の方法

(1) 4週間の自発運動による腸内細菌叢の変化

6週齢の雄性 Balb/c マウスを用いた。2週間の順化後、ランニングホイールをケージ内に入れて飼育する運動群と何も入れないケージに入れて飼育するコントロール群に分けて、4週間飼育した。その後、新鮮便を採取し、T-RFLP 解析を実施した。さらに DSS を1週間投与後の腸の遺伝子発現を RT-PCR 法にて調べた。

(2) 16週間の自発運動による腸内細菌叢の変化

6週齢の雄性 Balb/c マウスを用いた。2週間の順化後、ランニングホイールをケージ内に入れて飼育する運動群と何も入れないケージに入れて飼育するコントロール群に分けて、16週間飼育した。その後、4週間毎に新鮮便を採取し、T-RFLP 解析・及び

MiSeq 解析を実施した。

(3) 16週間の自発運動と繊維食による腸内細菌叢と defensin の関係

6週齢の雄性 Balb/c マウスを用い、次の5群に分けた[AIN93G 摂取群 (CON 群)、高脂肪食群 (HFD 群)、高脂肪食 + セルロース 10% 負荷群 (HFD + C 群)、高脂肪食 + 運動群 (HFD + E 群)、そして高脂肪食 + セルロース 10% 負荷 + 運動群 (HFD + CE 群)]。2週間の順化後、食餌・運動の介入を16週間実施した。運動はケージ内にライニングホールを設置する自発運動を用いた。サンプル採取として、4週間毎に新鮮便を採取し、MiSeq 解析を実施した。また、16週間の介入後は、血液・組織を採取し、組織は RT-PCR 法にて各遺伝子発現を調べた。

4. 研究成果

(1) 1か月の自発運動では、腸内細菌叢の変化は認められなかった。その後の DSS 腸炎の発症に対して、大腸の cryptdin-4 は有意な差が認められなかったが、小腸の cryptdin-4 は運動群で有意に低下した。しかし、TNF- α 、IFN γ 、KC などの炎症性の遺伝子や腸のバリア機能に關与する α -chain などの遺伝子に群間の差は認められなかった。

(2) 4か月間の自発運動では、4か月目に2群間腸内細菌叢の差異が有意に認められた(図1)。また、運動量と *Lactobacillus* 属に正の相関関係が認められた。T-RFLP 解析で4か月目に腸内細菌叢の差異が検出できたので、MiSeq 解析によって詳細な検討を行った。KEGG Pathway では主としてエネルギー関係のパラメータに2群間の差異が認められた。

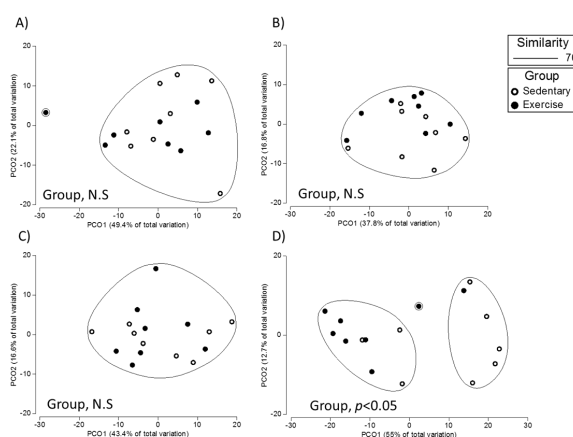


図1. T-RFLP解析による非運動群 (○) と運動群 (●) のPCOプロット。

(3) MiSeq 解析による腸内細菌叢の解析で、5群間に有意な違いが認められた(図2、PERMANOVA)。また、多様性についても、繊維量が多いほど、菌種が少なくなる傾向にあり、菌種の均等度については、運動している方が、不均等になる傾向が示された。

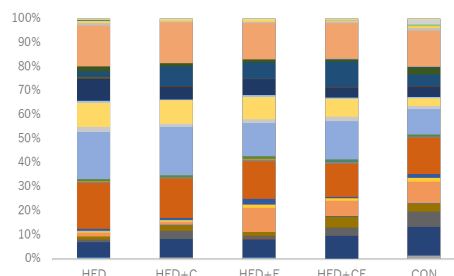


図2. 各群の属レベルにおける腸内細菌叢

また、大腸の cryptdin-4 は群間に有意な差が認められなかったが、小腸の cryptdin-4 は HFD + E 群で HFD 群に対して有意な低下が認められた。

一方で、血液性状や組織重量に関しては HFD より HFD + CE で、高脂肪食による代謝異常の改善が見られた。

以上のことから、運動自体に腸内細菌叢を変化させることが示唆された。また、運動トレーニングによって小腸の cryptdin-4 の発現が小さくなることが示唆された。しかし、その両者の関係性を特定することはできなかった。しかしながら、ある特定の

菌種の増減が difensin の発現に影響しているという先行研究 (Danmei *et al.* Frontier Physio 2016) もあるため、腸内細菌叢の変化だけではなく、菌種にも着目して今後の研究を進めていきたい。

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

谷村祐子, 青井渉, 内藤裕二, 高木智久, 水島かつら, 東村泰希, 吉川敏一. 運動による腸への刺激. 第 69 回日本体力医学会大会. 2014. 長崎大学 (長崎)

Tanimura Y, Aoi W, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Higashimura Y, Yoshikawa T. The effect of voluntary exercise on the composition of gut microbiota in mice. 20th annual congress of the European College of Sport Science. 2015. Malmö (Sweden)

谷村祐子, 青井渉, 井上亮, 内藤裕二, 高木智久, 水島かつら, 吉川敏一. マウスの習慣的な自発運動は腸内細菌叢を変化させる. 第 22 回 Hindgut Club Japan シンポジウム. 2016. 専修大学神田キャンパス (東京)

[図書](計 1 件)

谷村祐子. “健康に生きる鍵 腸内環境の視点から”. 長寿社会を生きる 地域の健康づくりを目指して. 愛知東邦大学 地域創造研究所編. 東京, 有限会社 唯学書房, 2017, p44-60.

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷村 祐子 (Yuko Tanimura)

愛知東邦大学・人間健康学部・助教

研究者番号: 90551458