

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15274

研究課題名(和文) 次世代乳酸菌で惹起される生体内シグナルの同定とその臨床応用

研究課題名(英文) In body signals of next generation Lactobacillus and their clinical application

研究代表者

六反 一仁 (ROKUTAN, Kazuhito)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：10230898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳腸軸は、脳と腸の機能の維持に重要な役割を果たしている。研究代表者は、腸に定着するユニークな乳酸菌CP2305が脳腸相関を介して医学生慢性ストレス反応を緩和することを見出した。本研究は、CP2305の生体内シグナルの解明を目指した。CP2305の菌体成分自身の作用を調べるため、殺菌洗浄したCP2305のストレス緩和作用を人体解剖実習ストレスと医師国家試験ストレスモデルで調べた。殺菌洗浄したCP2305も生菌と同じく、ストレスによる身体・精神症状を緩和して睡眠障害を改善することを見出した。これらの結果から、CP2305の菌体成分が腸上皮細胞の受容体を介して作用する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The bidirectional communication between the brain and the gut, called “the gut-brain axis”, plays a potential role in the maintenance of the brain function and the gut homeostasis. Recently, orally administered probiotics have been shown to modify the gut-brain axis and control the stress response. We reported that a unique *Lactobacillus gasseri* strain CP2305 (CP2305) could relieve stress-associated behaviors in healthy young adults and improve clinical symptoms of IBS. This study aimed to reveal the communication between CP2305 and the gut-brain axis. We tested whether heat-killed, washed CP2305 could exert beneficial effects on medical students under chronically stressful conditions. Administration of paraprobiotic CP2305 significantly ameliorated their stress-related adverse behaviours and improved sleep disturbance. Our results suggest that CP2305 may bind a responsible receptor(s) on intestinal epithelial cells and promote the dispatch of a signal(s) driving the HPA axis.

研究分野：病態生理学

キーワード：次世代乳酸菌 ストレス緩和 睡眠 脳腸軸 生体内シグナル

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸内には生体を構成する細胞の10倍の微生物が常在し、常在微生物の全てのゲノムを合わせるとヒトゲノムの150倍に相当する。このため、腸内微生物叢(microbiota)は“忘れられた臓器”とも考えられている。腸内微生物叢による脳腸関連の調節機構は“Microbiota-Gut-Brain Axis”の概念で捉えられ注目されている。腸内細菌叢が変化すると腸粘膜のバリアー機能を傷害し、軽度の炎症反応をする。また、腸内細菌叢とエネルギー代謝・肥満の関連も注目されている。腸内細菌叢からのシグナルは、迷走神経求心枝や脳室周囲器官に到達したサイトカイン等を介して大脳辺縁系に作用し、ストレス感受性や心理・行動の変化を引き起こすことも明らかにされた。特に、マウス自閉症モデルの治療にプロバイオティクスが有効であることが2013年にCell誌に報告され、これを契機に、腸内細菌叢は“mind-altering microorganisms”と認識されるようになった。

現在、一般外来に押し寄せている高齢者のQOLを妨げる要因は、排便、睡眠、食欲、関節痛である。さらに、高齢者の2人に1人がアルツハイマー型認知症の時代を迎えようとしている。“ぐっすり”“すっきり”“おいしい”を実現し、サクセスフルエイジングを支える手段が求められる。

研究代表者は *Lactobacillus gasseri* CP2305 のヒト試験を2006年から開始した。3か月間の人体解剖実習に取り組む医学科学生の協力を得て、CP2305の double-blinded, placebo-controlled, crossover 試験を行った。CP2305は人体解剖実習時の精神的・身体的ストレスによる腹部症状を緩和し、抑うつを解消し、睡眠を改善した。翌年の死菌(熱処理)を用いた試験でも同じ効果を認めた。さらに、過敏性大腸炎患者34名の臨床治験を行い、CP2305は便の性状、排便回数、腹部症状、睡眠、QOL(IFS-QOL)を改善し、半数の患者でIBSの重症度(IFS-SI)を劇的に改善させた。従来の「経口摂取した乳酸菌は腸に定着しない」という概念を打ち破り、CP2305は、経口摂取後4か月を過ぎても約半数の人の腸に定着していた。CP2305菌体成分が腸上皮細胞に接着し、惹起されたシグナルは迷走神経を介して脳内に伝わること、さらに、トランスクリプトーム解析により、CP2305は抗炎症作用を有することも確認した。従来の乳酸菌とは全く異なる性質もつ次世代乳酸菌を用いた新たな医療法の開発の可能性を示した。

本研究では、腸上皮細胞から迷走神経求心枝にシグナルを惹起するCP2305の菌体成分とその分子機構を解明し、さらに、高齢者を対象にCP2305の睡眠・整腸・食欲増進の作用を確認し、関節痛と認知能に及ぼす効果を検証して乳酸菌とその成分を用いた新たな高齢者医療の開拓を目指した。

2. 研究の目的

本研究は、2年間の研究期間において、(1)乳酸菌CP2305による腸上皮細胞の相互作用を介する菌体成分とそのシグナルの同定

(2)乳酸菌CP2305を用いた高齢者のQOL改善作用の確認を目指した。

CP2305はヒト試験で初めて抗ストレス作用が実証された食品である。CP2305の菌体成分自身が生体内シグナルを惹起することから、乳酸菌を用いた新たな医療法の確立、CP2305菌体成分を標的にした創薬、Japan Brand乳酸菌による世界戦略、新たなコンセプトをもつ家畜飼料の開発などに結びつくことが期待された。

3. 研究の方法

(1)CP2305菌体成分により惹起される宿主細胞応答の被験者試験

乳酸菌ガセリ菌 CP2305 の生体シグナルを惹起する菌体成分の同定を目指した。具体的にはCP2305を加熱殺菌し洗浄した菌体の抗ストレス作用を検証した。医師国家試験受験者69名(男子学生40名、女子学生29名)を2群に分け、毎日CP2305の死菌あるいはプラセボを12週間服用させた。中高年者を対象とした臨床研究も行った。平成27年度に40-60歳代看護師16名と70-90歳代老人18名を対象に、CP2305あるいはプラセボを12週間投与して効果を判定した。さらに、平成28年度に、40-80歳の民間病院職員とボランティア200名を対象に、ガセリ菌CP2305の確認実験を平成28年9月中旬から12週間の飲用実験を行った。

(2)具体的な評価項目とその方法

背景調査ならびに心理状態の評価：GHQ, Zung-SDS, Hospital Anxiety and Depression scale (HADS), State-Trait Anxiety Inventory (STAI), Eating Attitude Test (EAT-26 食生活態度), Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI 睡眠習慣), Health Practice Index (HPI 生活習慣), Japanese Knee Osteoarthritis Measure (JKOM 日本版変形性膝関節症評価表)の質問票により、対象者の背景調査ならびに心理状態の評価をおこなう。70歳以上の被験者に対しては、長谷川式簡易知能評価スケールを実施した。

遺伝子発現の解析：採取した血液よりRNAを抽出し、リアルタイムPCR法にて既に同定しているストレス応答遺伝子ならびにストレス応答 microRNA の発現解析を行う。血清タンパク質ならびに唾液中のタンパク質の解析は、ELISA法を用いて行った。

DNAメチル化解析：採取した全血よりDNAを精製後、MassARRAY system もしくは、Illumina Human Methylation450BeadChip Kitを用いてメチル化網羅的解析を行った。

体内代謝動態への影響：血中アルブミン、総タンパク質、骨代謝マーカー、老化マーカー、一般生化学検査、血算検査、HbA1cより、

栄養状態への影響を評価した。

睡眠状態の評価：オムロン社の睡眠計もしくは、スリープウェル社のスリープスコープを用いて、睡眠状態の客観的計測を行った。

自律神経活動の評価：パルスアナライザーを用いて、自律神経活動比の計測を行った。質問票から得られた身体症状の変化と遺伝子発現・タンパク質発現、代謝状態の変化を群間差、また、被験物飲用前後の比較検討をし、乳酸菌飲料の身体への効果について検討した。

4. 研究成果

乳酸菌ガセリ菌 CP2305 の生体シグナルを惹起する菌体成分の同定を目指した。具体的には CP2305 を加熱殺菌し洗浄した菌体の抗ストレス作用を検証した。医師国家試験受験者 69 名（男子学生 40 名、女子学生 29 名）を 2 群に分け、毎日 CP2305 の死菌あるいはプラセボを 12 週間服用させた。その結果、PSQI による睡眠の質の評価と睡眠時脳波検査を行い、CP2305 のストレスによる睡眠障害作用を確認した。パルスアナライザーを用いた自律神経活動比の計測を行い、CP2305 は副交感神経活動を高め、ストレスに起因する腹部症状の緩和することを確認した。さらに、末梢血の心理的ストレスマーカーである miR-144 及び miR-144* の発現を有意に抑制することを見出し、J Funct Foods に投稿した。平成 27 年度に 40-60 歳代看護師 16 名と 70-90 歳代老人 18 名を対象に、CP2305 あるいはプラセボを 12 週間投与して効果を判定した。その結果の解析をもとに、栄養状態改善に使用するための組成物（特願 2016-130814）、腎性貧血改善用組成物（特願 2016-130811）、及び軟骨再生促進用組成物（特願 2016-130847）の特許出願を行った。この成果をさらに確認するため、平成 28 年度に、40-80 歳の民間病院職員とボランティア 200 名を対象に、ガセリ菌 CP2305 の確認実験を平成 28 年 9 月中旬から 12 週間の飲用実験を行った。実験は無事終了し、サンプルの測定をほぼ終了して現在データ解析を行っている。また、生菌を用いた人体解剖実習者を対象とした研究成果と過敏性大腸群患者を対象とした臨床研究の成果は、J Funct Foods と J Appl Microbiol にそれぞれ誌上発表した。

さらに、乳酸菌シロタ株についてもストレス緩和作用の研究を行った。実験モデルとして、医学科 4 年次に行う全国共通の進級試験（いわゆる CBT 試験）の受験者を対象にして、8 週間のシロタ株の飲料摂取により、ストレスによる身体症状の緩和 (Benef Microbes. 2016)、脳腸相関を介した抗ストレス作用 (Neurogastroenterol Motil. 2016)、ストレスによる腸内細菌叢の多様性の減少を抑える作用 (Appl Environ Microbiol. 2016)、及び、ストレスによる睡眠障害の緩和作用 (Benef Microbes. 2017) をそれぞれ報告した。

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 7 件)

Masuki S, Nishida K, Hashimoto S, Morikawa M, Takasugi S, Nagata M, Taniguchi S, Rokutan K, Nose H. Effects of milk product intake on thigh muscle strength and NFkB gene methylation during home-based interval walking training in older women: a randomized, controlled pilot study. *PLoS ONE* 2017;12(5):e0176757. doi:10.1371/journal.pone.0176757 (査読有)

Sawada D, Kawai T, Nishida K, Kuwano Y, Fujiwara S, Rokutan K. Daily intake of *Lactobacillus gasseri* CP2305 improves mental, physical, and sleep quality among Japanese medical students enrolled in a cadaver dissection course. *J Funct Foods* 2017;31:188-197. doi: 10.1016/j.jff.2017.01.042. (査読有)

Takada M, Nishida K, Gondo Y, Kikuchi-Hayakawa H, Ishikawa H, Suda K, Kawai M, Hoshi R, Kuwano Y, Miyazaki K, Rokutan K. Beneficial effects of the probiotic *Lactobacillus casei* strain Shiota on academic stress-induced sleep disturbance in healthy adults in a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Benef Microbes* 2017;8(2):153-162. doi: 10.3920/BM2016.0150. (査読有)

Nobutani K, Sawada D, Fujiwara S, Kuwano Y, Nishida K, Nakayama J, Kutsumi H, Azuma T, Rokutan K. The effects of administration of the *Lactobacillus gasseri* strain CP2305 on quality of life, clinical symptoms and changes in gene expression in patients with irritable bowel syndrome. *J Appl Microbiol*. 2017;122(1):212-224. doi: 10.1111/jam.13329. (査読有)

Kato-Kataoka A, Nishida K, Takada M, Kawai M, Kikuchi-Hayakawa H, Suda K, Ishikawa H, Gondo Y, Shimizu K, Matsuki T, Kushiro A, Hoshi R, Watanabe O, Igarashi T, Miyazaki K, Kuwano Y, Rokutan K. Fermented Milk Containing *Lactobacillus casei* Strain Shiota Preserves the Diversity of the Gut Microbiota and Relieves Abdominal Dysfunction in Healthy Medical Students Exposed to Academic Stress. *Appl Environ Microbiol*, 2016;82(12):3649-3658. doi: 10.1128/AEM.04134-15. (査読有)

Takada M, Nishida K, Kataoka-Kato A, Gondo Y, Ishikawa H, Suda K, Kawai M, Hoshi R, Watanabe O, Igarashi T, Kuwano Y, Miyazaki K, Rokutan K. Probiotic

Lactobacillus casei strain Shirota relieves stress-associated symptoms by modulating the gut-brain interaction in human and animal models. *Neurogastroenterol Motil.* 2016;28(7):1027-1036. doi: 10.1111/nmo.12804. (査読有)

Kato-Kataoka A, Nishida K, Takada M, Suda K, Kawai M, Shimizu K, Kushiro A, Hoshi R, Watanabe O, Igarashi T, Miyazaki K, Kuwano Y, Rokutan K. Fermented milk containing Lactobacillus casei strain Shirota prevents the onset of physical symptoms in medical students under academic examination stress. *Benef Microbes.* 2016;7(2):153-6. doi: 10.3920/BM2015.0100. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

六反一仁 乳酸菌が開拓するあらたな健康戦略 第22回 Hindgut Club JAPAN シンポジウム招待講演、専修大学神田キャンパス、東京都千代田区、2016年12月3日

Rokutan K, Nishida K, Kuwano Y, Sawada D, Fujiwara S. Enteric-colonizing Lactobacillus gasseri CP2305 improves stress-related adverse behaviours. 5th Beneficial Microbe Conference, Amsterdam, Netherland, October 10-12, 2016.

西田憲生、狩野静香、佐竹譲、板井美樹、田中裕基、桑野由紀、六反一仁、上皮間葉移行モデルを用いた EMT 関連 microRNA の探索、第12回日本消化管学会総会学術集会、東京、京王プラザホテル、東京都新宿区、2016年2月26-27日

六反一仁、次世代乳酸菌を用いたストレス緩和とその可能性について、第1回日本疲労学会総会・学術集会シンポジウム「疲労 - 睡眠 - ストレス - 運動」、山口県総合保険会館、山口県山口市、2105年5月15日

〔産業財産権〕

出願状況(計 5 件)

名称：血中トリプトファン濃度上昇抑制剤
発明者：六反一仁、西田憲生、桑野由紀、加藤豪人、高田麻衣、宮崎幸司、河合久光、須田一徳、早川弘子
権利者：国立大学法人徳島大学、株式会社ヤクルト本社

種類：特許
番号：特願 2015-185031
出願年月日：平成 27 年 9 月 18 日
国内外の別：国内

名称：ストレス負荷解放後のセロトニン欠乏改善剤
発明者：六反一仁、西田憲生、桑野由紀、

加藤豪人、高田麻衣、宮崎幸司、河合久光、須田一徳、早川弘子
権利者：国立大学法人徳島大学、株式会社ヤクルト本社

種類：特許
番号：特願 2015-185032
出願年月日：平成 27 年 9 月 18 日
国内外の別：国内

名称：栄養状態改善に使用するための組成物
発明者：六反一仁、西田憲生、桑野由紀、藤原茂、菅原智詞、青木ゆめこ、澤田大輔

権利者：国立大学法人徳島大学、アサヒグループホールディングス株式会社

種類：特許
番号：特願 2016-130814
出願年月日：平成 28 年 6 月 30 日
国内外の別：国内

名称：腎性貧血改善用組成物
発明者：六反一仁、西田憲生、桑野由紀、藤原茂、菅原智詞、青木ゆめこ、澤田大輔

権利者：国立大学法人徳島大学、アサヒグループホールディングス株式会社

種類：特許
番号：特願 2016-130811
出願年月日：平成 28 年 6 月 30 日
国内外の別：国内

名称：軟骨再生促進用組成物
発明者：六反一仁、西田憲生、桑野由紀、藤原茂、菅原智詞、青木ゆめこ、澤田大輔

権利者：国立大学法人徳島大学、アサヒグループホールディングス株式会社

種類：特許
番号：特願 2016-130847
出願年月日：平成 28 年 6 月 30 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

六反一仁 (ROKUTAN, Kazuhito)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：10230898