

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2017

課題番号：17H07091

研究課題名(和文)涙液分泌における腸内細菌の役割

研究課題名(英文)The role of intestinal bacteria for tear secretion

研究代表者

佐野 ころこ (Sano, Kokoro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：40804597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：ドライアイ治療の新規アプローチとして、涙液分泌と腸内細菌の関係性を検討した。C57BL/6マウスを用いて通常飼育、豊かな環境での飼育、ストレス負荷を行い、飼育環境の違いによる腸内細菌の変化を検討した。また腸内細菌が涙液分泌量に与える影響を観察するため、マウスに抗生剤を経口投与し、マウスの涙液分泌量の変化を検討した。その結果、飼育環境の違いによって腸内細菌叢の構成が異なること、マウスへの抗生剤投与によって涙液分泌量が変化することが明らかになった。これらより、マウスにおいて飼育環境の違いは腸内細菌叢の構成を変化させる要因となり、腸内細菌叢の構成と涙液分泌量には関連性があることが示唆された。

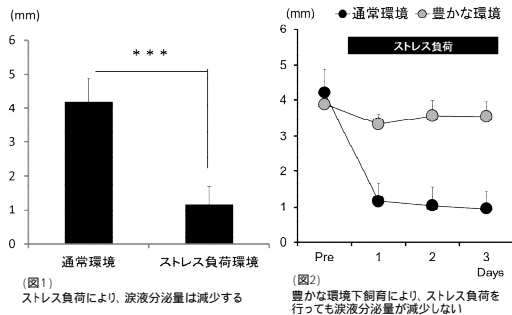
研究成果の概要(英文)：I considered the association between tear secretion and intestinal bacteria for a new approach to dry-eye disease. I prepared 3 housing environments, normal environment, enriched environment, stress environment, and I gave C57BL/6 mice each environment for observing the change of intestinal bacteria. Moreover I administered antibiotics to mice for observing the change of intestinal bacteria and tear secretion. The difference of environment led to the change of structure of intestinal bacteria. Mice administered antibiotics showed lower tear secretion compared with normal mice. These results showed the difference of housing environment brought the change of structure of intestinal bacteria and suggested the relationship between tear secretion and structure of intestinal bacteria.

研究分野：眼科

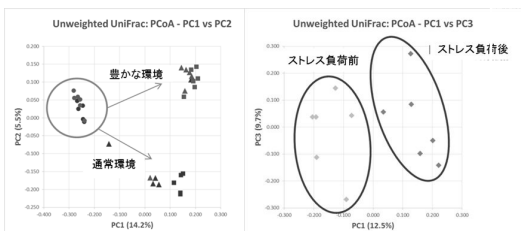
キーワード：涙液分泌 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

近年、ドライアイ患者数は増加傾向にあり問題視されている。ドライアイ潜在患者数は2200万人以上、オフィスワーカーの3人に1人はドライアイとも言われており、生産性にも影響を及ぼすことが報告されている。ドライアイは多因性疾患であり、炎症によるものや瞬目の減少によるもの、糖尿病によるものなど様々であるが、一般的なドライアイは環境要因が大きいと考えられている。しかし環境要因に着目した涙液分泌に関する研究は皆無である。そこで研究代表者は環境要因による涙液分泌変化を明らかにするため、これまでにマウスを用いて、ストレス負荷によって涙液分泌量が減少すること(図1)や豊かな環境で飼育することによってストレス負荷による涙液分泌量減少を抑制できること(図2)など、飼育環境が涙液分泌量に影響を及ぼすことを明らかにしてきた。



環境要因と涙液分泌の関係性を探る上で、我々は近年多数報告されている腸内細菌に注目している。上述したストレス負荷時、豊かな環境飼育時ではマウスの腸内細菌の組成が変化することが予備検討結果より確認されており(図3)、今までに得てきた結果と腸内細菌に関する既報より、腸内細菌の変化が脳や神経系を通じて涙液分泌に影響を与えているのではないかという着想に至った。



<参考文献>

(1) American Journal of Ophthalmology. 2014 Feb;157(2):294-300

2. 研究の目的

腸内細菌と涙液分泌の関係性を明らかにすることを目的とする。具体的には、まずはマウスを様々な環境下で飼育し、涙液分泌量の変化と腸内細菌の変化を観察する予定である。次に抗生剤をマウスに投与した上でス

トレス負荷、豊かな環境での飼育を行い、腸内細菌がほとんど存在しない状態で環境要因を変えた場合の涙液分泌量の変化を観察する。これらの研究により、飼育環境の違いによる腸内細菌の変化を明らかにし、さらには腸内細菌の変化及び腸内細菌の有無が涙液分泌量に与える影響を検討する。

上記によって基礎データを取得した後、腸内細菌の移植による涙液分泌変化を検討する予定である。抗生剤の前投与により腸内細菌をなくしたマウスに対して、ストレス負荷により涙液分泌が減少しているマウスの腸内細菌、豊かな環境で飼育しているマウスの腸内細菌をそれぞれ移植し、涙液分泌変化を観察する。この研究により、腸内細菌を通じた新規の涙液分泌維持方法を検討する。

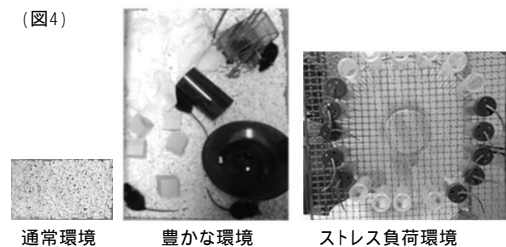
3. 研究の方法

本研究は3段階に分けて行う。まず始めに飼育環境の違いによる涙液分泌量の変化と腸内細菌の変化を観察するため、3つの異なる環境を組み合わせ様々な条件下でマウスを飼育し、涙液分泌量の測定及び腸内細菌の解析を行う。次に、腸内細菌がない状況での涙液分泌量変化を観察するため、抗生剤を投与し、異なる環境下で飼育したマウスの涙液分泌量の測定及び腸内細菌の解析を行う。これらの結果を踏まえ、最後に腸内細菌が涙液分泌量に与える影響を観察するため、抗生剤を投与したマウスに異なる環境で飼育された他のマウスの糞便を移植し、糞便移植後のマウスの涙液分泌量の測定及び腸内細菌の解析を行う。

(1)飼育環境の違いによる涙液分泌量変化の観察及び腸内細菌変化の観察

B6Jマウスを通常環境・豊かな環境・ストレス負荷環境という3つの環境下(図4)で飼育し、涙液分泌量の変化と腸内細菌の変化を観察する。具体的には、3週令しくは4週令のB6Jマウスを通常環境もしくは豊かな環境で4週間飼育し、その後マウスをさらにストレス負荷群、対照群に分け、ストレス負荷群は5日間のストレス負荷(4時間/日)を行う。実験中は週に1度、涙液分泌量を測定するとともに、マウスの糞便を採取する。ストレス負荷時には毎日マウスの糞便を採取する。その後、糞便をサンプルとしてマイクロバイオーム解析を実施する。

(図4)



(2)抗生剤を用いた涙液分泌量変化の観察及び腸内細菌変化の観察

腸内細菌を減らすことを目的に抗生物質をB6J マウスに投与した上で、通常環境・ストレス負荷環境・豊かな環境で飼育を行う。腸内細菌の減少を目的とした抗生物質のプロトコル(抗生物質4種カクテル)は既に確立されており、既報のプロトコルを用いる。具体的には、(1)と同様に3週令もしくは4週令のB6Jマウスを通常環境もしくは豊かな環境で4週間飼育をする。この際の飲み水を抗生物質4種カクテル入り(アンピシリン、バンコマイシン、ネオマイシン、メトロニダゾール)の水道水とし、マウスに抗生物質を経口摂取させる。4週間の飼育後、マウスに5日間のストレス負荷(4時間/日)を行う。週に1度、マウスの涙液分泌量の測定、体重測定、マウスの糞便を採取し、ストレス負荷時には毎日マウスの糞便を採取する。その後、糞便をサンプルとしてマイクロバイオーム解析を実施する。

(3)腸内細菌の移植による涙液分泌量変化の観察

(1)(2)によって基礎データを取得した後、腸内細菌の移植による涙液分泌変化を検討する。抗生物質の前投与により腸内細菌がほとんど存在しない状態にしたマウスに対して、ストレス負荷により涙液分泌が減少しているマウスの腸内細菌、豊かな環境で飼育しているマウスの腸内細菌をそれぞれ移植し、涙液分泌変化を観察する。さらには行動解析を行い、腸内細菌の変化による行動への影響を検討する。具体的には4週令のB6Jマウスを通常環境で4週間飼育する。その際の飲み水を水道水ではなく抗生物質4種カクテル入りの水とし、マウスに抗生物質を経口摂取させる。同時に、4週令のB6Jマウスを豊かな環境で4週間飼育、また7週令のB6Jマウスにストレス負荷を行っておく。4週間の抗生物質投与を終えた後、豊かな環境で飼育したマウス及び1週間のストレス負荷を行ったマウスから糞便を採取し、生理食塩水に融解する。それぞれのマウスの腸内細菌を含んだ生理食塩水を、抗生物質を投与したマウスに経口投与する。週に1度、マウスの涙液分泌量の測定、体重測定、マウスの糞便を採取し、ストレス負荷時には毎日マウスの糞便を採取する。その後、糞便をサンプルとしてマイクロバイオーム解析を実施する。また、腸内細菌移植前、移植1週間後に強制水泳試験、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験を実施し、行動解析を行う。

<参考文献>

(1) GASTROENTEROLOGY 2011;141:621-632

4. 研究成果

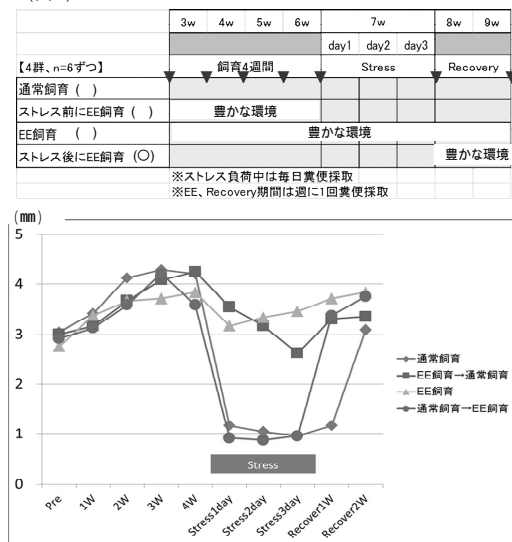
今回の研究により、大きく2つの成果を得ることができた。1つ目は飼育環境の違いによって涙液分泌量が異なり、さらには腸内細菌叢の構成も異なるということである。2つ目は抗生物質投与によって涙液分泌量が異なり、その変化は投与する抗生物質の種類にも影

響を受けるということである。

(1)飼育環境の違いにより、涙液分泌量・腸内細菌叢の構成は変化する

3週令のB6Jマウスをランダムに4群(n=6ずつ)に分け、2群は通常環境、2群は豊かな環境(EE)で4週間飼育を行った。その後、全群に3日間のストレス負荷を行った。その際に豊かな環境で飼育していた1群を通常環境での飼育に変更した。これは事前に豊かな環境で飼育していることがストレス負荷に対して良い効果があるのを見るためである。また、ストレス負荷後に通常環境で飼育していた1群を豊かな環境での飼育に変更した。これはストレス負荷からの回復に豊かな環境での飼育が影響するのを観察するためである。その結果、通常環境で飼育していたマウスは成長とともに涙液分泌量が増加し、ストレス負荷によって涙液分泌量が減少、その後2週間かけて涙液分泌量が回復した(図5の○)。一方、豊かな環境で飼育していたマウスはストレス負荷による涙液分泌量の減少が見られなかった(図5の●)。さらに、豊かな環境で飼育した後、ストレス負荷時から通常環境で飼育したマウスは、通常環境で飼育していたマウスに比べてストレス負荷による涙液分泌量の減少幅が小さく(図5の▲)、ストレス負荷後に通常環境から豊かな環境での飼育に変更したマウスは通常環境で飼育しているマウスに比べて涙液分泌量の回復が早いことが明らかになった(図5の○)。

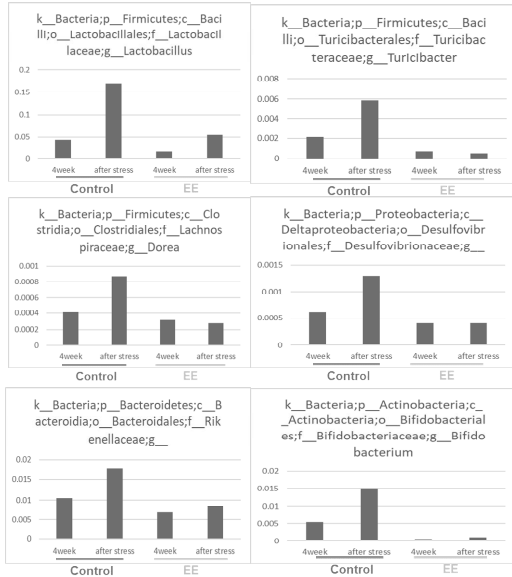
(図5)



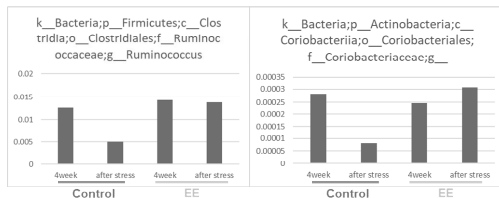
次に、上記の実験中に採取した糞便を用いて、腸内細菌叢の変化を解析した。その結果、各群によって腸内細菌叢の構成の変化が見られたため、ストレス負荷前後で通常環境飼育群(Control)と豊かな環境飼育群(EE)での腸内細菌叢の変化を観察した。その結果、通常環境飼育と豊かな環境飼育ではストレス負荷によって増える腸内細菌種と減る腸内細菌種に違いがあることが明らかになった(図6)。

(図6)

ストレス負荷によって増えた細菌



ストレス負荷によって減った細菌



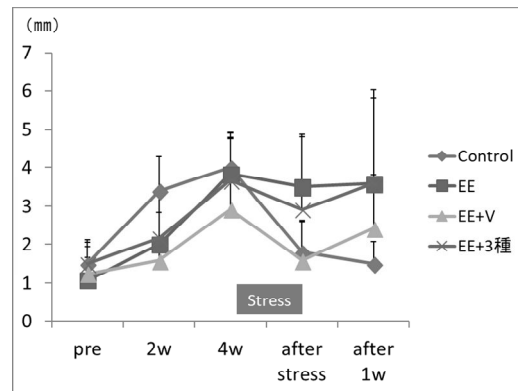
今後更なる研究と解析が必要であるが、今回の結果によって、マウスにおいて飼育環境の違いが涙液分泌量に影響を及ぼすこと、飼育環境の違いによって腸内細菌叢の構成が変化し、この変化が涙液分泌量と関係があるかもしれないことが示唆された。

(2) 抗生剤の投与により、涙液分泌量は変化する

(1)の結果を受けて、腸内細菌叢と涙液分泌量は関係している可能性があると考えた。そこでマウスに抗生剤を経口投与し、腸内細菌を減らした場合の涙液分泌量の変化を観察した。4週令のB6Jマウスをランダムに通常環境飼育群(Control、図7の○)、豊かな環境飼育群(EE、図7の□)、豊かな環境飼育をしながらバンコマイシンを投与する群(EE+V、図7の△)、豊かな環境飼育をしながら3種抗生剤(バンコマイシン、ネオマイシン、アンピシリン)を投与する群(EE+3種、図7の×)の4群(n=5-6ずつ)に分けた。それぞれの条件で4週間飼育した後、3日間のストレス負荷を行い、その後涙液分泌量の回復を観察した。バンコマイシン投与群、3種抗生剤投与群は飼育中に与える飲水に各種抗生剤を混合した。その結果、バンコマイシンを投与した群では成長に伴う涙液分泌量の増加が他の群に比べて少ないことが明らかになった。また、豊かな環境で飼育をしているにも関わらず、バンコマイシン投与群及び3種抗生剤投与群ではストレス負荷を

行った際に涙液分泌量の減少が見られることが明らかになった。バンコマイシン投与群では、ストレス負荷からの涙液分泌量の回復も遅いことが明らかになった。

(図7)



今後、上記の実験中に得られた糞便を解析し、抗生剤を投与した際の腸内細菌叢の変化を観察する予定である。そして、涙液分泌量の減少に関わっていると考えられる腸内細菌種の絞り込みを行っていく予定である。

本研究課題によって、涙液分泌量と腸内環境が関係している可能性があるという今までに報告されていない新たな研究成果を得ることができた。環境要因で腸内細菌叢が変化すること、腸内細菌叢の変化が涙液分泌量に関係していること、そして涙液分泌量に関係している腸内細菌種を特定することができれば、新たなドライアイ治療として腸内細菌からのアプローチが生まれる可能性がある。新たなドライアイ治療の開発として、今後も腸内細菌叢の解析を行っていく予定である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者 佐野 ころこ(SANO, Kokoro)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教
研究者番号: 40804597