

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580339

研究課題名（和文）腸管粘膜上の常在細菌コロニーに対する調節機構に関する基盤的研究

研究課題名（英文）Fundamental study on the regulation system for indigenous bacteria colonies on the intestinal mucosa

研究代表者

北川 浩（KITAGAWA HIROSHI）

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：40125307

研究成果の概要（和文）：

消化管における常在細菌の定着及びその調節の仕組みを明らかにするために研究を実施した結果、消化管全長における常在細菌の基本的定着部位がアポトーシス発現上皮細胞であり、そのアポトーシスの誘導・実行・調節機構を明らかにするとともに、細菌の上皮細胞への接着に必要なリガンドの候補や、上皮に接着した常在細菌に対する上皮細胞独自の排除機構及び常在細菌コロニーが過度に増殖した場合の制御機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed to clarify the mechanisms of settlement and regulation of indigenous bacteria in the alimentary tract. As a result, this study clarified the apoptotic epithelial cells as the settlement places throughout the alimentary tract, the induction, execution and regulation mechanisms in the epithelial apoptosis, the possible epithelial ligands against some indigenous bacterial lectins, the elimination system against the attached indigenous bacteria by epithelial cells themselves, and the regulation system against the expansion of indigenous bacteria in the rat alimentary tract.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：アポトーシス，消化管，常在細菌，生体防御，パイエル板，抗菌物質，超微形態学，免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

人や動物の常在細菌に関する研究は古くから細菌学的に行われてきたが、生体にお

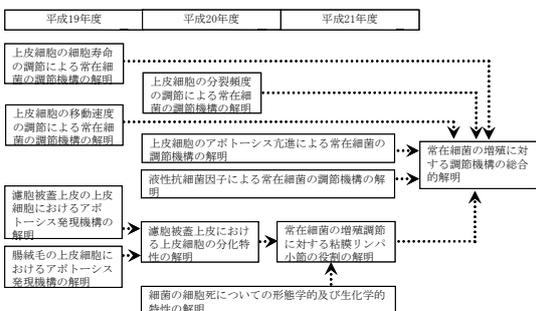
ける常在細菌の増殖に対する調節機構については漠然とした非特異的及び特異的成体防御機構によって行なわれることが推測されているものの、*in vivo*における具体的な調

節のメカニズムについては殆ど国内外を通じて明らかにされてきていない。

近年、アトピー性疾患の一部と、腸管内の特定の常在細菌との因果関係が明らかになり、さらにプロバイオティクスの応用としての有用細菌の経口投与が行われてきているが、生体内における常在細菌の定着に対する基本的な調節機構が *in vivo* で明らかにされていないため、アトピー性疾患等の予防や治療としての常在細菌の制御や有用細菌の消化管内への長期定着等については実現していない。

2. 研究の目的

本研究では、研究実施者が従来積み重ねてきた常在細菌の定着に関する細菌学的な知見と消化管の生体防御に関する形態学的な知見を統合してさらに発展させ、最終的に生体における常在細菌の定着に対する宿主側の調節機構に関する基礎的知見を解明すること目的とした。



3. 研究の方法

- (1) ラットの消化管全長を固定し、縦断パラフィン切片を作製して粘膜上皮上における常在細菌の定着部位と粘膜リンパ小節と常在細菌の分布との関係を計量組織学的に精査するとともに、常在細菌の接着時のリガンドになり得る糖鎖をレクチン組織化学的に明らかにした。
- (2) ラットに BrdU を血中投与して経時的に小腸及び大腸を固定し、凍結切片を作製して抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学的手法により、常在細菌コロニーの定着が少ない部位やコロニーが拡大した部位等における上皮細胞の細胞動態（細胞寿命，移動速度，分裂指標）等について計量免疫組織化学的に比較検討し，明らかにした。
- (3) ラット小腸の粘膜リンパ小節を固定し，超薄切片を作製して透過型電子顕微鏡下で観察し，濾胞被蓋上皮及び腸絨毛の上皮細胞に接着した常在細菌に対する上皮細胞自身の生体防御作用について明らかにするとともに，これに関わる因子を免疫組織化学的に明らかにした。
- (4) ラット小腸の粘膜リンパ小節を固定し，超薄切片を作製して透過型電子顕微鏡下で

観察し，濾胞被蓋上皮におけるM細胞の分化及び運命について明らかにするとともに，アポトーシス関連蛋白を免疫組織化学的に検出して，M細胞の分化とアポトーシス発現（細胞成熟）との関連を考察した。

- (5) ラット小腸を固定して凍結切片及び超薄切片を作製し，8種のアポトーシス関連蛋白を免疫組織化学的に検出するとともに，透過型電子顕微鏡下で観察し，絨毛円柱上皮細胞へのアポトーシスの誘導・実行・調節機構を明らかにした。
- (6) ラットの消化管全長を固定して凍結切片を作製し，グラム陽性/陰性菌の分布を検討するとともに，lysozyme, α -ないし β -defensin1, 2 や phospholipidA2 等に対する免疫組織化学を実施して比較検討し，グラム陽性/陰性菌の棲み分けの仕組みと常在細菌コロニーに対する調節機構を明らかにした。
- (7) 抗菌物質の非存在下で培養した *Staphylococcus epidermidis* のコロニーを固定して超薄切片を作製し，細菌の細胞死の過程を明らかにするとともに，ラットの腸管を用いて，様々な抗菌物質等に晒されている腸管内腔の常在細菌の細胞死及び細胞増殖の状態等について明らかにした。
- (8) ラットの消化管全長を固定して凍結切片を作製し，細菌の構成物質を認識する Toll-like receptor 2, 4 及び 9 に対する免疫組織化学を実施して，腸管上皮における発現に関する予備的知見を得た。
- (9) ラットの皮膚を固定して凍結切片を作製し，17種のアポトーシス関連蛋白を免疫組織化学的に検出するとともに，透過型電子顕微鏡下で観察し，絨毛円柱上皮細胞へのアポトーシスの誘導・実行・調節機構を明らかにした。

4. 研究成果

- (1) ラットの消化管全長における常在細菌の接着部位がアポトーシス後期の上皮細胞であることを明らかにし，併せて，常在細菌の接着時における上皮細胞側のリガンドの候補を特定し，論文公表した。
- (2) ラットの腸では，上皮細胞の移動速度を遅くすることによって常在細菌の上皮細胞への定着を促進するとともに，逆に常在細菌コロニーが過度に増殖する場合には上皮細胞の移動速度を速くすることによって増殖を阻止することを明らかにするとともに，大腸においても同様の常在細菌コロニーの調節機構が存在することを明らかにし，論文公表した。
- (3) 小腸では，腸絨毛や濾胞被蓋上皮の頂点のアポトーシス後期の上皮細胞に常在細菌が上皮細胞に接着するが，上皮細胞は微細線維の再構成による物理的排除と抗菌物質

の分泌による化学的排除を併用して常在細菌の接着を排除するという超微形態学的なメカニズムを明らかにするとともに、物理的排除に関わる物質を同定し、論文公表した。

- (4) 小腸内の抗原情報をモニタリングしている濾胞被蓋上皮中のM細胞の分化過程を超微形態学的に明らかにするとともに、濾胞被蓋上皮におけるアポトーシスの発現が一般の腸絨毛の上皮細胞に比べて極めて遅れ、このことが抗原を取り込むM細胞の分化と再分化に重要であることを明らかにし、論文公表した。
- (5) 小腸の腸絨毛の上皮におけるアポトーシスの発現機構について、腸陰窩直上の上皮細胞においてFasとFas-Lがアポトーシスを誘導し、これとほぼ同時に実行系の酵素である活性化caspase-3が出現すること、及び腸絨毛の先端でミトコンドリア経路が働いてcaspase-9が活性化し、最終的に細胞死に至ることを明らかにするとともに、小腸及び大腸における上皮細胞のアポトーシスの最終形はネクローシス様の水腫性変化であることを明らかにし、学会公表を終えて現在投稿準備中である。
- (6) 消化管全長における各種抗菌物質の分泌部位を特定するとともに、これがグラム陰性/陽性菌の分布と対応し、さらに抗菌物質の分泌と常在細菌コロニーの拡大とが密接に関連することを明らかにするとともに、抗菌物質が上皮細胞から再吸収されることを明らかにし、現在論文投稿中である。
- (7) 腸管内腔の食餌中に存在する常在細菌の生存・変性状態について、寒天平板にて培養した細菌コロニーにおける細菌の超微形態学的形態変化を実験対照として超微形態学的に明らかにし、国際シンポジウム・学会で公表するとともに、現在投稿準備中である。
- (8) ラット小腸における各種 Toll-like receptor の発現分布について明らかにし、国際シンポジウム・学会で公表するとともに、現在投稿準備中である。
- (9) 皮膚における常在細菌の定着・調節機構を明らかにする予備的研究として、上皮細胞のアポトーシスの誘導・実行・調節機構の詳細を明らかにし、学会公表を終えるとともに現在投稿準備中である。

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 29 件)

- 1) Yamamoto, K., Qi, W.-M., Yokoo, Y., Miyata, H., Udayanga, K. G. S., Kawano,

J., Yokoyama, T., Hoshi, N. and Kitagawa, H. (2010): Lectin histochemical detection of special sugars on the mucosal surfaces of the rat alimentary tract. *Journal of Veterinary Medical Science* (査読有), **72** (in press).

- 2) Qi, W.-M., Yamamoto, K., Yokoo, Y., Miyata, H., Udayanga, K. G. S., Kawano, J., Yokoyama, T., Hoshi, N. and Kitagawa, H. (2009): Histoplanimetric study on the relationship between cellular kinetics of epithelial cells and proliferation of indigenous bacteria in the rat colon. *Journal of Veterinary Medical Science* (査読有), **71**, 745-752.
- 3) Yamamoto, K., Qi, W.-M., Yokoo, Y., Miyata, H., Udayanga, K. G. S., Kawano, J., Yokoyama, T., Hoshi, N. and Kitagawa, H. (2009): Histoplasnimetric study on the spatial relationship of indigenous bacteria and mucosal lymphatic follicles throughout alimentary tract of rat. *Journal of Veterinary Medical Science* (査読有), **71**, 621-630.
- 4) Qi, W.-M., Yamamoto, K., Yokoo, Y., Miyata, H., Inamoto, T., Udayanga, K. G., Kawano, J., Yokoyama, T., Hoshi, N. and Kitagawa, H. (2009): Histoplanimetric study on the relationship between the cell kinetics of villous epithelial cells and the proliferation of indigenous bacteria in rat small intestine. *Journal of Veterinary Medical Science* (査読有), **71**: 463-470.
- 5) Inamoto, T., Namba, M., Qi, W.-M., Yamamoto, K., Yokoo, Y., Miyata, H., Kawano, J., Yokoyama, T., Hoshi, N. and Kitagawa, H. (2008): An immunohistochemical demonstration of the contribution of actin and myosin to physical elimination of adhered indigenous bacteria from mucous epithelial cells in Peyer's patches and intestinal villi of the rat jejunoleum. *Journal of Veterinary Medical Science* (査読有), **70**, 1153-1158.
- 6) Inamoto, T., Kawata, Y., Qi, W.-M., Yamamoto, K., Warita, K., Kawano, J., Yokoyama, T., Hoshi, N. and Kitagawa, H. (2008): Ultrastructural study on the epithelial responses against attachment of indigenous bacteria to epithelial membranes in Peyer's patches of rat small intestine. *Journal of Veterinary Medical Science* (査読有), **70**, 235-241.
- 7) Onishi, S., Miyata, H., Inamoto, T., Qi, W.-M., Yamamoto, K., Yokoyama, T., Warita, K.,

Hoshi, N. and Kitagawa, H. (2007): Immunohistochemical study on the delayed progression of epithelial apoptosis in follicle-associated epithelium of rat Peyer's Patch. *Journal of Veterinary Medical Science* (査読有), **69**, 1123-1129.

- 8) Onishi, S., Yokoyama, T., Chin, K., Yuji, M., Inamoto, T., Qi, W. -M., Warita, K., Hoshi, N. and Kitagawa, H. (2007): Ultrastructural study on the differentiation and the fate of M cells in follicle-associated epithelium of rat Peyer's Patch. *Journal of Veterinary Medical Science* (査読有), **69**, 501-508.

他 2 1 件

[学会発表] (計 63 件)

- 1) 万谷洋平(代表)：ラット小腸腸絨毛における Toll-like Receptor の発現. 第 85 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2009. 11. 28, 奈良県立医科大学.
- 2) Kankanam Gamage Sanath UDAYANGA (代表)：Apoptosis Process in Epidermal Epithelial Cells of Rat under a physiological condition. 第 85 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2009. 11. 28, 奈良県立医科大学.
- 3) 西田美穂(代表)：ラット腸管の上皮細胞における経時的形態学的変化とアポトーシスの進行に関する免疫組織化学的研究. 第 85 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2009. 11. 28, 奈良県立医科大学.
- 4) 宮田英典(代表)：ラット小腸および大腸の粘膜リンパ組織における上皮細胞の動態の特性. 第 85 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2009. 11. 28, 奈良県立医科大学.
- 5) 伊藤栄理(代表)：ラット腸管の常在細菌と寒天平板培養細菌の超微形態学的比較検討. 第 85 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2009. 11. 28, 奈良県立医科大学.
- 6) Kankanam Gamage Sanath UDAYANGA (代表)：Immunohistochemical study on the apoptosis process in rat epidermis. 第 148 回日本獣医学会学術集会, 2009. 9. 25, 鳥取大学.
- 7) 伊藤栄理(代表)：ラットの腸管内腔に存在する常在細菌の超微形態学的観察. 第 148 回日本獣医学会学術集会, 2009. 9. 25, 鳥取大学.
- 8) 宮田英典(代表)：ラット腸管の濾胞被蓋上皮における上皮細胞の動態に関する計量免疫組織化学的研究. 第 148 回日本獣医学会学術集会, 2009. 9. 25, 鳥取大学.
- 9) 万谷洋平(代表)：ラット小腸の粘膜上皮における Toll-like receptor の発現に関する免疫組織化学的研究. 第 148 回日本獣医

学会学術集会, 2009. 9. 25, 鳥取大学.

- 10) 西田美穂(代表)：ラットの腸管上皮におけるアポトーシス発現に関する超微形態学的研究. 第 148 回日本獣医学会学術集会, 2009. 9. 25, 鳥取大学.
- 11) Yoshitomo FUKUI (代表)：Scanning electron microscopic study on the persorption mechanism of large antigenic particulates from small intestinal lumen in rats. The 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology, 2009. 9. 16-18, Kobe Univ.
- 12) Eri ITO (代表)：Ultrastructural Study on the Indigenous Bacteria in the Lumen of Rat Intestine. The 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology, 2009. 9. 16-18, Kobe Univ.
- 13) Youhei MANTANI (代表)：Immunohistochemical study on the Toll-like receptor expression in villous columnar epithelial cells of rat small intestine. The 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology, 2009. 9. 16-18, Kobe Univ.
- 14) Miho NISHIDA (代表)：Ultrastructural and immunohistochemical study on the apoptotic process of intestinal epithelial cells in rats. The 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology, 2009. 9. 16-18, Kobe Univ.
- 15) Ei-ichiro TAKAHARA (代表)：Ultrastructural and histoplanimetric demonstration of direct transportation of chylomicrons via subepithelial blood capillaries in rat intestinal villi. The 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology, 2009. 9. 16-18, Kobe Univ.
- 16) 山本健吉(代表)：ラットの消化管における各種抗菌物質の分泌と常在細菌の分布との関係. 第 146 回日本獣医学会学術集会, 2008. 3. 38, 麻布大学.
- 17) 斎 旺梅(代表)：ラット結腸における常在細菌の増殖と上皮細胞の動態との関係に関する計量免疫組織化学的研究. 第 146 回日本獣医学会学術集会, 2008. 3. 38, 麻布大学.
- 18) 北川 浩(代表)：パイエル版濾胞被蓋上皮および腸絨毛の上皮細胞による常在細菌の物理的排除機構に関する免疫組織化学的研究. 第 145 回日本獣医学会学術集会, 2008. 3. 38, 麻布大学.
- 19) 横山俊史(代表)：ラット小腸粘膜上皮か

- ら毛細血管への乳ビ球の移行に関する計量超微形態学的研究. 第 83 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2007. 11. 17, 明治鍼灸大学.
- 20) 齊 旺梅(代表): ラット小腸の腸絨毛の上皮細胞の動態と常在細菌の定着との関係に関する計量免疫組織化学的研究. 第 83 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2007. 11. 17, 明治鍼灸大学.
- 21) 大西佐知子(代表): ラットパイエル板濾胞被蓋上皮におけるM細胞の分化とアポトーシスとの関係に関する免疫組織化学的研究. 第 83 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2007. 11. 17, 明治鍼灸大学.
- 22) 宮田英典(代表): ラット小腸の上皮細胞におけるアポトーシス発現のメカニズムに関する免疫組織化学的研究. 第 83 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2007. 11. 17, 明治鍼灸大学.
- 23) 横尾 諭(代表): ラット消化管粘膜における抗菌物質と常在細菌の制御に関する免疫組織化学的研究. 第 83 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2007. 11. 17, 明治鍼灸大学.
- 24) 大西佐知子(代表): ラットパイエル板の濾胞被蓋上皮におけるアポトーシスの進行に関する免疫組織化学的研究. 第 144 回日本獣医学会学術集会, 2007. 9. 2, 酪農学園大学.
- 25) 齊 旺梅(代表): ラット消化管粘膜への常在細菌の定着と上皮細胞の移動速度との関係に関する計量組織学的研究. 第 144 回日本獣医学会学術集会, 2007. 9. 2, 酪農学園大学.
- 26) 山本健吉(代表): ラット消化管粘膜の常在細菌の接着部位に発現する糖に関する組織化学的研究. 第 144 回日本獣医学会学術集会, 2007. 9. 2, 酪農学園大学.
- 27) 高原英一郎(代表): ラット空腸の腸絨毛における乳ビ球の毛細血管への吸収に関する超微形態学的研究. 第 144 回日本獣医学会学術集会, 2007. 9. 2, 酪農学園大学.
- 28) 横尾 諭(代表): ラット消化管における各種抗菌物質の局在と常在細菌の増殖に関する応答. 第 144 回日本獣医学会学術集会, 2007. 9. 2, 酪農学園大学.
- 29) 宮田英典(代表): ラット小腸の腸絨毛上皮におけるアポトーシスの誘導と実行に関する免疫組織化学的研究. 第 144 回日本獣医学会学術集会, 2007. 9. 2, 酪農学園大学.

他 3 4 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 浩 (KITAGAWA HIROSHI)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 40125307

(2) 研究分担者

河野 潤一 (KIWANO JUNICHI)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 40127361