

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05930

研究課題名(和文)炎症性腸疾患のディスバイオシス改善のための植物乳酸菌活用戦略

研究課題名(英文) The approach using plant-derived lactic acid bacteria in order to improve the dysbiosis in inflammatory bowel disease

研究代表者

東川 史子(Higashikawa, Fumiko)

広島大学・医系科学研究科(薬)・特任准教授

研究者番号：70346534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物乳酸菌による治療戦略につなげることを念頭に置き、健常者と炎症性腸疾患患者の腸内細菌の特徴について検討した。その結果、炎症性腸疾患患者の中でも、寛解維持治療薬を服用中か否かで、腸内マイクロバイオーム(MB)による腸管細胞障害性及びサイトカイン類の発現誘導等に差異があることを見出した。服用無しのMBは、腸管細胞生存率を有意に低下させたが、服用中の患者のMBでは健常者と差が無かったことから、寛解維持治療薬は腸内細菌を鎮静化していることが明らかとなった。また、治療薬服用無しの患者の腸内MBは、正常な腸内MBをディスバイオシスへと誘導する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本国内における炎症性腸疾患患者は近年急増しているが、未だ完治に至る治療法は確立されておらず、寛解維持が治療の中心となっている。炎症性腸疾患は寛解と再燃を繰り返すことから、学業や就業に支障を来しQOLが著しく損なわれることが多く、本疾患の原因究明が急がれる。本研究では、炎症性腸疾患の患者の間でも、治療薬服用中か否かによって、腸内マイクロバイオームの細胞障害性等が異なっていることが示唆された。その差が何に由来するのかを明らかにすることによって、疾患の発症原因の解明及び根治療法開発への一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the characteristics of the human gut microbiome in healthy individuals and patients with ulcerative colitis (UC), aiming at the application of plant-derived lactic acid bacteria for UC treatment. As a result, we found differences in cytotoxicity and the induction of cytokine expression between the gut microbiome of the patients under and not under medication. Since the microbiome without prescription significantly reduces intestinal cell line viability, therapeutic drugs may normalize the gut microbiome in UC patients. In addition, the gut microbiome of UC patients without medication may induce normal gut microbiome into dysbiosis.

研究分野：予防医学・腸内マイクロバイオーム・機能性食品

キーワード：炎症性腸疾患 潰瘍性大腸炎 腸内マイクロバイオーム ディスバイオシス 植物乳酸菌

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD: inflammatory bowel disease) は、若年層を中心に発症する原因不明の難治性疾患であり、潰瘍性大腸炎 (UC: ulcerative colitis) とクローン病 (CD: Crohn's disease) に分類される。UC と CD のいずれも自己免疫疾患で、異常亢進したマクロファージや好中球が自身の腸粘膜を攻撃することで炎症が生じると考えられている。現在、IBD には根本的な治療法はなく、寛解維持を目的とし、過剰な免疫反応や炎症を抑制する対症療法が中心となっている。欧米と比較すると日本の罹患率は低かったが、いずれも近年急増しており、対策が急がれる疾患である。

近年、腸内マイクロバイーム (MB) の重要性に注目が集まり、肥満、糖尿病、動脈硬化、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー型認知症、アレルギー、喘息、そして炎症性腸疾患等、実に多くの疾患と MB との関連性が明らかとなってきている。一方、当研究グループは、様々な植物から分離した乳酸菌を多数所持しており、腸内 MB を変化させる植物乳酸菌も多く見出している。免疫の過剰反応が生じている IBD において、腸の免疫システムを適切に保つ (過剰反応しない) ような腸内 MB を構築することができれば、完治が困難とされる IBD を完治させることができるかもしれない。理想的な細菌の配合を突き止めれば、それをプロバイオティクス投与によって作り出すことも可能となると考えられる。

## 2. 研究の目的

バランスが失われてしまった IBD 患者の腸内細菌叢を再構築する方法を探索し、将来的に炎症性腸疾患に有効な治療法の開発を目指す。そのために、本研究では、炎症性腸疾患患者の MB の特徴について健常者 MB と比較検討し、MB のディスバイオシスの改善や細胞障害性の抑制につながる植物由来の乳酸菌をスクリーニングすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 腸内マイクロバイームサンプルの取得

健常者及び潰瘍性大腸炎患者の便サンプルの提供を広く一般に募集し、健常者 (36~73 歳、男性 5 名、女性 6 名) 及び UC 患者 (23~72 歳、男性 5 名、女性 3 名) のサンプルを取得した。UC 患者の全員が、サンプル提供時点で自覚症状としては寛解状態であると申告した。

### (2) 細胞実験

ヒト腸管上皮様細胞株 Caco-2 細胞に、健常者及び UC 患者の MB を LB 培地にて培養した上清を添加し、72 時間培養後、MTT アッセイによって細胞生存率を評価した。また同様に、Caco-2 細胞に MB 培養上清を添加し、24 時間培養後に Total RNA を抽出し、リアルタイム PCR にて各種サイトカイン発現量を比較した。なお、統計解析は Tukey's test で行った。

さらに、当研究室の保持する植物乳酸菌ライブラリーの各種菌株について、MRS 培地の培養上清 (中和処理済) を添加し、DSS (Dextran sulfate sodium) や UC 患者 MB による細胞障害を抑制する菌株のスクリーニングを行った。

### (3) 腸内マイクロバイーム解析

取得したヒト腸内 MB サンプルについて、次世代シーケンサー (Illumina) を用い、16S rRNA メタゲノム解析を実施した。

また、各腸内 MB を LB 培地で 48 時間培養後、その一部を新たな LB 培地中に移し、2 種類の MB サンプルを 72 時間混合培養 (またはコントロールとして単独で培養) した後、メタゲノム解析を実施した。組み合わせは、健常者 11 名に対し、服薬無しの UC 患者 3 名のすべての組み合わせとした。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞実験

#### 細胞障害性

各 MB の培養上清をヒト腸管上皮様細胞株 Caco-2 細胞に添加培養し、細胞の生存率を比較したところ、健常者と UC 患者で比較すると、わずかな差しか認められなかった。ところが、MB 取得時における UC 治療薬服用の有無で分けて解析すると、図 1 に示したように、UC 治療薬を服用中の患者の MB (UC med) では、Caco-2 細胞生存率が健常者と同程度であったのに対し、服薬無しの患者の MB (UC med(-)) では細胞生存率が有意に減少した。その低下率は、72 時間の共培養で 14% であった。なお、被験者の便サンプルを PBS で十分に洗浄した後、LB 培地で培養した上清を実験に用いたことから、残存する治療薬が直接細胞に作用した可能性は無いと考

えられる。

また、MB 培養上清を 100°C で 30 秒処理した時、細胞障害性が失活したことから、上清中に存在する熱感受性成分の関与が示唆された。

### サイトカイン発現量

同様に、各 MB の培養上清を Caco-2 細胞に添加後のサイトカイン類の mRNA 発現量を比較したところ、服薬の有無で差異が認められ、炎症性サイトカインである IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  及び IL-1 の mRNA 発現量が、健常者や服薬中 UC 患者と比較し、服薬無しでは有意に増加した (図 2)。また、AhR (Aryl hydrocarbon receptor) や TGF- $\beta$  も、服薬無しで増加傾向にあった。その他、IL-5、IL-7、IL-12、IL-13、及び IL-37 については MB 間で有意差は認められなかった。

このように、UC 患者全員が寛解状態であると認識していながら、治療薬の服用の有無により、明らかに腸内細菌叢が異なっており、炎症性サイトカインの産生促進と細胞障害に差が生じていた。UC では寛解状態から自覚症状が無いまま静かに炎症が進行し、突然の再燃が生じるのはそのためかもしれない。

図1 MB培養上清添加後のCaco-2細胞の生存率

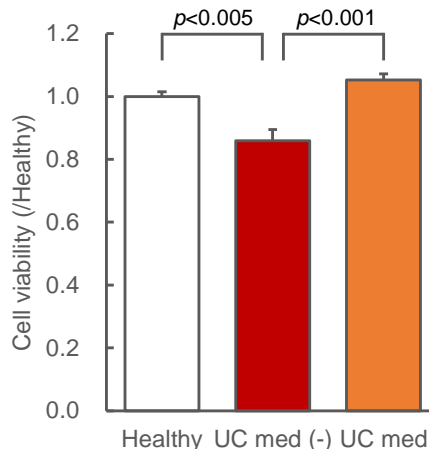
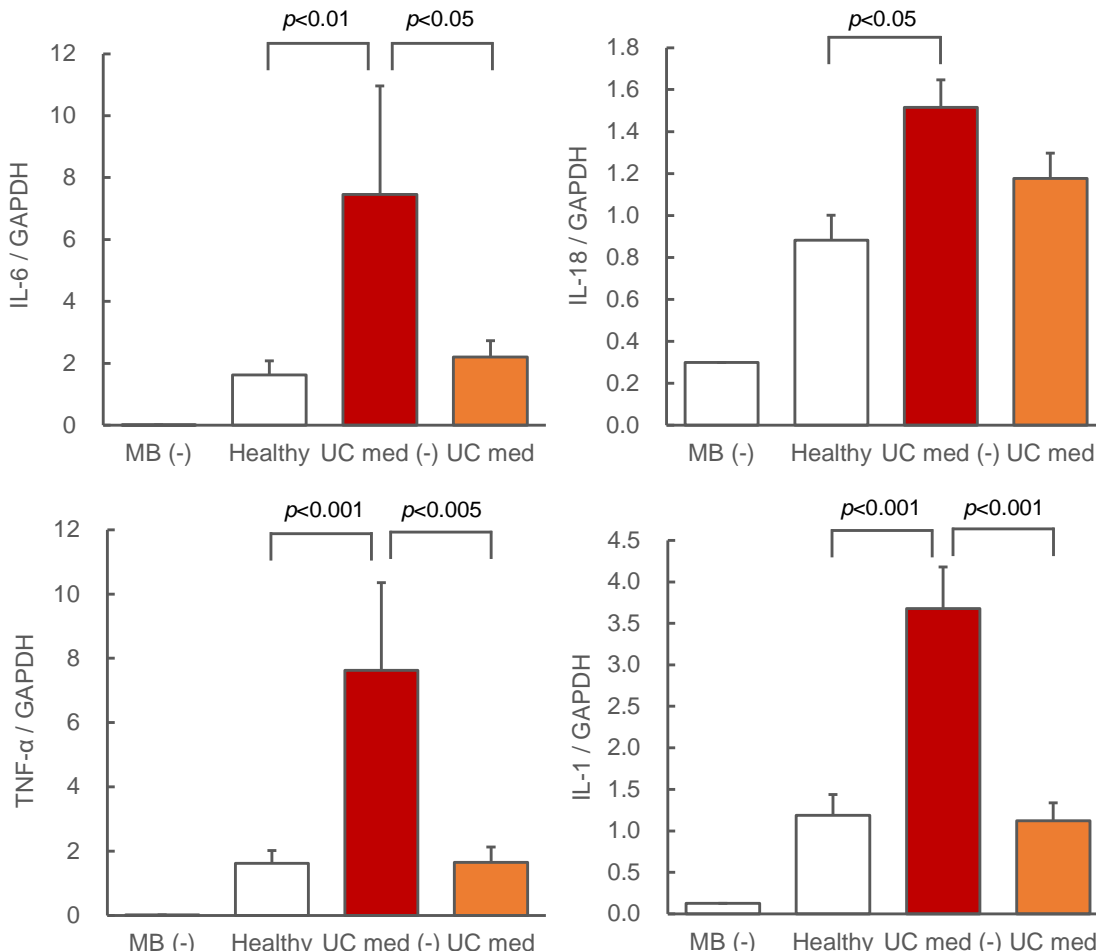


図2 MB培養上清添加後のサイトカイン発現量



### 植物乳酸菌のスクリーニング

植物由来の乳酸菌が、腸管細胞への障害性を抑制するか検討した。まず、腸炎モデルとして使用される DSS による細胞障害を抑制する植物乳酸菌をスクリーニングしたところ、*Enterococcus* 属の数種が細胞生存率を改善した。しかしながら、UC 患者 MB による細胞数減少を顕著に抑制する植物乳酸菌は今回のスクリーニングでは得られなかった。

## (2) 腸内マイクロバイオーーム解析 組成

UC 患者及び健常者の腸内細菌の 16S rRNA メタゲノム解析を実施し、その特徴について比較したところ、Proteobacteria 門の割合が UC 患者で高い傾向にあり、その中でも Gammaproteobacteria 綱が高かった。また、Enterococcus 属や Prevotella 属が健常者より高かった一方で、Verrucomicrobia 門は低い傾向にあり、Prostheobacter 属は検出頻度が UC 患者で有意に低かった。本来、健常者と患者の MB の特徴を比較するためには、サンプル数は多いほど良いと考えられるが、本研究では、*in vitro* 実験の結果と対比させることを目的としていたため、少人数で行った。UC 患者の MB から細胞障害性の原因菌の特定を進めているが、これまでに Gammaproteobacteria 綱の菌種が検出されており、メタゲノム解析の結果と一致していた。

### MB の共培養

腸内細菌は、難培養性の菌が多数を占め、体外で腸内環境を再現することは難しいものの、IBD の腸内 MB が、ディスバイオシスを誘導する何かを有しているのではないかとという仮説を確認するために、健常者と UC 患者の MB を共培養してその影響を比較した。

図 3 に示したように、共培養の各組合せの 2 サンプル(健常者と UC 患者)に共通していなかった菌種、つまりそれぞれの MB に特有であった菌種のうち、共培養後に残存していた割合は、UC 側で有意に高かった。このことから、本実験では LB 培地で培養可能な細菌に限ってはいるが、UC 患者の MB は、健常者の MB を圧倒し、ディスバイオシスへと変化させ得ることが示唆された。

実際、共培養後の菌叢の 16S rRNA メタゲノム解析の結果の Jaccard 距離では、混合した UC 患者の MB の組成により近くなっていることが示された(図 4)。興味深いことに、健常者に多く存在していた *Bifidobacterium* 属や *Lactobacillus* 属、*Pseudomonas* 属等の菌種は、共培養後に著しく低下していた。このように、治療薬を服用していない UC 患者の MB は、他の細菌の増殖を抑制するなどし、腸内 MB の多様性の低下をもたらす可能性が考えられる。

図3 MB混合培養による変化

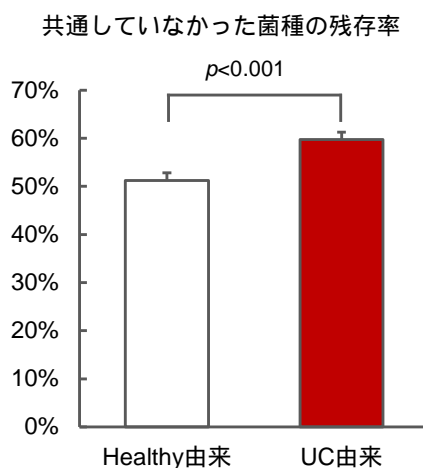
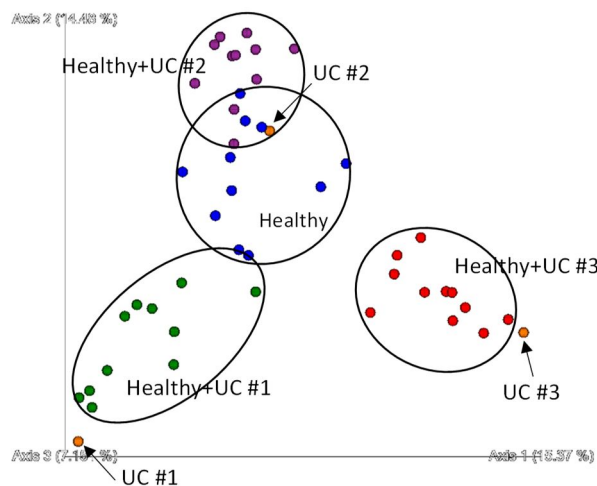


図4 MB混合培養による変化 (Jaccard distance)



以上のように、寛解維持療法を受けている UC 患者の腸内 MB 培養上清に細胞障害性は認められず、その点においては、腸内 MB が正常化していることが示唆された。IBD は、寛解と再燃を繰り返すことが多いが、未治療の MB や、何らかのきっかけによって治療薬による抑制が効かなくなった MB により、腸管粘膜細胞への攻撃が続いている可能性が示唆された。

本研究では、UC 患者の腸内 MB のディスバイオシスを改善するための植物乳酸菌をスクリーニングすることを主目的としていたが、UC の炎症を生じさせる機序に関して興味深い知見が得られ、そちらに注力する結果となった。しかしながら、UC 治療の有無により、MB にどのような変化が生じているかについて現在も解析を継続中であり、それらが明らかとなれば、治療のために適切なプレバイオティクス・プロバイオティクスの選択が可能となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉山 政則  (Sugiyama Masanori)  (30106801)	広島大学・医系科学研究科(薬)・共同研究講座教授    (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関