

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591489

研究課題名（和文） バクテリアルトランスロケーション下のタイトジャンクション傷害と治療への展開

研究課題名（英文） Evaluation of tight junctions under bacterial translocation for development of treatment

研究代表者

栗田 信浩 (KURITA NOBUHIRO)

徳島大学・病院・特任教授

研究者番号：30335814

研究成果の概要（和文）：

Bacterial translocation 下では TNF α 、NF- κ B 等 inflammatory cytokine、Toll like receptor (TLR)2・4 発現が上昇し、apoptosis に至り、Tight Junction (TJ) protein である Claudin-1・4、Occludin 等の発現が低下した。腸内細菌叢は多様性減少、上皮傷害を惹起する Akkermansia が増加した。漢方方剤 TU-100 投与にて inflammatory cytokine や TLR2・4 発現が抑制され、TJ protein、腸内細菌叢の多様性を維持し、Blautia など上皮保護作用を持つ菌を誘導した。

研究成果の概要（英文）：

Under bacterial translocation, expressions of inflammatory cytokines (TNF α , NF- κ B et al.) and Toll like receptor (TLR) 2, 4 were increased and caused apoptosis. Tight Junction (TJ) protein (Claudin-1・4, Occludin et al.) were decreased. Diversity of microbiome was decreased and Akkermansia, which disturbed intestinal epithelium, was appeared. Herbal medicine (TU-100) decreased inflammatory cytokines and TLR 2, 4 and maintained TJ proteins and diversity of microbiome, which introduced Blautia having protective effects of intestinal epithelium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：バクテリアルトランスロケーション、タイトジャンクション、パラセルラールルート、トルライクレセプター、腸内細菌叢、CPT11、TNF α 、NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

Bacterial translocation (BT) の route には細菌やエンドトキシン等が Tight Junction(TJ)を通過する para-cellular route と腸管粘膜細胞の細胞質内を通過する trans-cellular route があるとされ、我々

は para-cellular route における TJ 機能傷害が BT で発症していることをこれまでの検討で確認した。

これらの病態はほとんど解明されておらず、BT 発症における重要な因子である Inflammatory cytokine (TNF α ・NF- κ B 経

路)、自然免疫系の検討 (TLR2, 4 経路)、腸内細菌叢の変化等に注目した。

TNF α ・NF- κ B 経路: BT 下で発現増加する TNF α は、TNFR I、caspase8 の death effector domain に結合し caspase3, 7などを活性化して apoptosis が誘導される。さらに NF- κ B の転写を活性化し、anti-apoptosis 作用を示す一方、IL1 β 、IL6、TNF α などの inflammatory cytokine を誘導し、TJ タンパク傷害を来す可能性がある。本経路は inflammatory cytokine、apoptosis との関連を調査する上で重要である。

免疫系の検討 (TLR2, 4 経路): Toll-like receptor (TLR)は TLR1~10 の homologue が存在し、TLR2 は細菌の lipoprotein、TLR4 は LPS を認識する。これらは myeloid differentiation primary response gene 88 依存性に NF- κ B を活性化させ、inflammatory cytokine の誘導に至る。

腸内細菌叢: 腸内の常在細菌叢は感染予防、免疫賦活、消化吸収の補助など多彩な作用を持ち、侵襲時には偏性嫌気性菌 (Bifidobacterium、Lactobacillus)の減少、Staphylococcus、Pseudomonas など病原性細菌の増加が指摘され、さらに TNF α 存在下に TLR9 が常在細菌叢の DNA を認識して IL8 を誘導し抗炎症効果を示すことが知られているが、BT 下での詳細な報告はない。

我々はこれまで漢方方剤である大建中湯 (TU-100)が腸管ストレス下の炎症軽減、apoptosis を抑制すること等から、BT 抑制に有望であることを報告してきた。

2. 研究の目的

Inflammatory cytokine 誘導の経路である TNF α ・NF- κ B 経路、自然免疫に関与する Toll-like receptor2, 4 の経路、常在細菌叢の変化 TLR9 経路と TJ 機能との相関から検討して、BT のより詳細な病態と新たな治療 target を明らかにし、治療薬として注目される TU-100 等の治療薬の BT 抑制効果を多面的に評価する。

3. 研究の方法

BT モデル: 絶食モデル・CPT-11 投与モデル

TJ 傷害・TNF α ・NF- κ B 経路の検討: TNF α 、NF- κ B、CPT-11 投与モデルを用いて IL- β 、IL-6、caspase3、TLR4 mRNA 発現を RT-PCR にて測定し、TUNNEL 染色で

上皮細胞の apoptosis を検討した。さらに Tight junction protein (Claudin-isozymes、Occludin-1、ZO-1)の mRNA を RT-PCR、タンパク発現を免疫組織化学染色にて検討した。

自然免疫系の検討: TLR2・4 の mRNA 発現を RT-PCR、タンパク発現を免疫組織化学染色で検討した。

腸内細菌叢の変化: 絶食モデル、CPT-11 投与モデルを用い、Terminal Restriction Fragment Length Polymerase (T-RFLP 法)を以て腸管内容物における腸管細菌叢の変化を検討した。T-RFLP 法は、16S リボソーム RNA 遺伝子(16S)による細菌叢の菌種組成(OTU)解析で、プライマーを利用して細菌叢をプロファイリングする技術で、抽出した DNA のリボソーム(16s rDNA)を一括で PCR にて増幅し、これを大腸菌内にクローリングシークエンスを行い、多様性を評価するものである。

TU-100 の腸管ストレス軽減効果: CPT-11 投与モデルで発症する下痢は、なし: Grade0、肛門周囲のみ汚染: Grade1、後肢の付け根から臍部まで汚染: Grade2、臍部より頭側を汚染: Grade3 に分類した。BT の発症は腸間膜リンパ節の培養にて検討を行った。

4. 研究成果

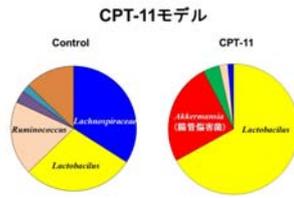
TJ 傷害・TNF α ・NF- κ B 経路の検討: CPT-11 モデルにおける回腸・大腸腸管壁内の TNF α 、NF- κ B、IL-1 β 、IL-6 等全ての inflammatory cytokine mRNA の上昇が認められた。さらに caspase3 mRNA 発現が上昇し、TUNNEL 染色にて apoptosis の誘導が確認された。Claudin isozyme では Claudin-1 及び Claudin-4 mRNA 発現低下、Claudin-2 mRNA は発現が上昇していた。Claudin-1 発現は免疫組織化学染色でも低下が確認された。さらに Occludin mRNA 発現低下、ZO-1 は回腸では有意な変化を示さず、大腸で mRNA 発現が低下していた。Occludin は免疫組織化学染色でも低下が確認された。

自然免疫系の検討: TLR4 mRNA 発現上昇、TLR2 mRNA 発現は、大腸で上昇傾向を示した。TLR4

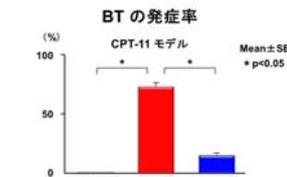
は免疫組織化学染色でタンパク発現が上昇していた。腸内細菌叢の変化: 絶食モデルにおいて、絶食開始前では腸内細菌の多様性が認められたが、5 日間の絶食後は、多様性が失われ、Erysipelotrichaceae が異常に増加していた。細菌のクラスター数で



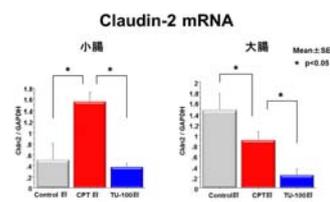
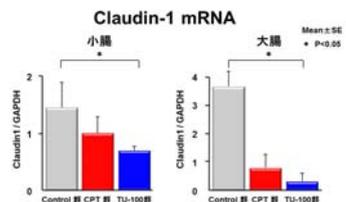
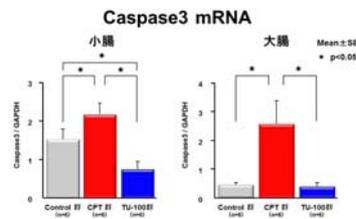
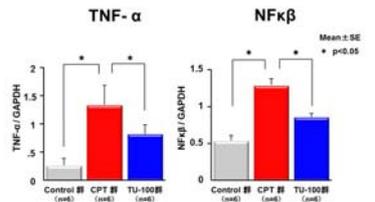
ある OUT は、絶食後は前の 40% 程度まで減少していた。CPT11 投与モデルでは、Lactobacilales 減少、腸粘液の主成分であるムチンを分解するグラム陰性菌 Akkermansia の増加が確認された。



TU-100 の腸管ストレス軽減効果: CPT-11 モデルで発症する下痢は、CPT-11 群で Grade 2・3 が発症するのに対し、TU-100 群では Grade 0・1 であり、軽減効果が見られた。また、BT の発症率も有意に低下した。



次に CPT-11 モデルにおける TJ 傷害・TNF α ・NF- κ B 経路への効果を検討した。CPT-11 投与により回腸・大腸腸管壁内の TNF α 、NF- κ B、IL-1 β 、IL-6 mRNA の上昇が認められたが、特に重要な TNF α 、NF- κ B mRNA は TU-100 投与により有意に抑制され、IL-1 β 、IL-6 mRNA も抑制される傾向が確認された。さらに上昇していた caspase3 mRNA 発現は抑制され、TUNNEL 染色にて apoptosis の軽減が確認された。Claudin isozyme では発現低下していた Claudin-1・4 mRNA のうち、



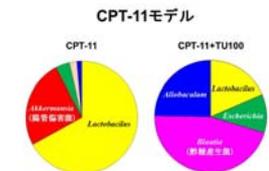
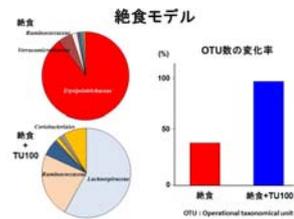
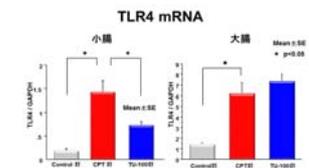
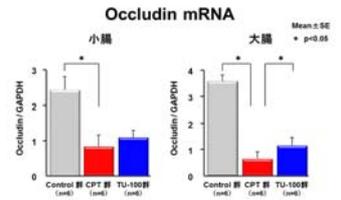
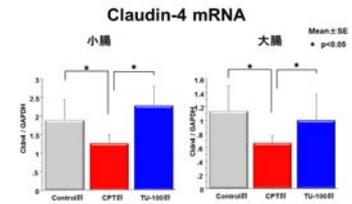
Claudin-1・4 mRNA のうち、

Claudin-1 は TU-100 投与でも回復していなかったが、Claudin-4 は有意に回復していた。上昇していた

Claudin-2 mRNA は TU-100 にて有意に抑制された。免疫組織化学染色にて、TU-100 投与後、Claudin-1

発現は回復していることが確認された。さらに発現低下していた Occludin mRNA は TU-100 により大腸で有意に上昇、小腸でも回復傾向であった。大腸で有意に発現低下していた ZO-1 mRNA は、TU-100 投与で有意に上昇した。Occludin は免疫組織化学染色でも TU-100 による回復が確認された。これらの結果から腸管ストレス時における TJ 傷害の中でも Claudin-4 や Occludin の維持が重要であり、Claudin-2 は腸管の正常な状態と負の相関を示すことが示唆された。

自然免疫系に対しては、上昇していた TLR4 mRNA を小腸で TU-100 が有意に抑制、大腸での TLR2 mRNA 発現を有意に抑制した。TLR4 は免疫組織化学染色でも TU-100 によって抑制されていることが確認された。腸内細菌叢の変化: 絶食モデルにおいて、Erysipelotrichaceae が異常に増加していたが、TU-100 投与によって OUT は 98% にまで回復していた。CPT11 投与モデルでは、腸管粘



膜傷害を引き起こす *Akkermansia* の比率が低下し、酢酸産生を通して感染防御を行う *Blautia* の増加が認められた。

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 3 件)

1. Chikakiyo M, Shimada M, Nakao T, Higashijima J, Yoshikawa K, Nishioka M, Iwata T, Kurita N. Kampo medicine “Dai-kenchu-to” prevents CPT-11 induced small intestinal injury in rats. *Surg Today* 42(1): 60-67, 2012, 査読有, DOI:10.1007/s00595-011-0014-7
2. Nakao T, Kurita N, Komatsu M, Yoshikawa K, Iwata T, Utusnomiya T, Shimada M. Irinotecan injures tight junction and causes bacterial translocation in rat. *J Surg Res* 173(2): 341-347, 2012, 査読有 DOI: 10.1016/j.jss.2010.10.003
3. Yoshikawa K, Shimada M, Nishioka M, Kurita N, Iwata T, Morimoto S, Miyatani T, Komatsu M, Kashihara H, Mikami C. The effects of the Kampo medicine (Japanese herbal medicine) “Daikenchuto” on the surgical inflammatory response following laparoscopic colorectal resection. *Surg Today* 42(7): 646-651, 2012, 査読有 DOI: 10.1007/s00595-011-0094-4.

[学会発表] (計 15 件)

1. Takasu C, 他 9 名 4 番目, Kurita N. The effect of Dai-kenchu-to in maintenance of microbiomal diversity on intestinal inflammation. *Digestive Disease Week (DDW2012)* 2012 年 5 月 19 日-22 日 San Diego Convention Center(アメリカ)
2. 吉川幸造, 他 8 名 3 番目, 栗田信浩. 腸管ストレスに対する大建中湯の効果発現機序の解明 第 113 回 日本外科学会学術集会 2012 年 4 月 11-13 日 福岡国際会議場(福岡県).
3. 吉川幸造, 他 10 名 3 番目, 栗田信浩. CPT-11 は Tight Junction 障害と TNF α ・NF- κ B 経路を介し Bacterial Translocation を発症させる 第 112 回 日本外科学会学術集会 2012 年 4 月 12 日-14 日 幕張メッセ (千葉県)
4. Yoshikawa K, 他 9 名 3 番目, Kurita N. The effect of Dai-kenchu-to in maintenance of microbiomal diversity on intestinal inflammation. 第 98 回 日本消化器病学会総会 2012 年 4 月 19 日

-21 日 京王プラザホテル(東京)

5. 吉川幸造, 他 10 名 3 番目, 栗田信浩. CPT-11 投与による腸管ストレスに対する大建中湯の効果に関する検討 第 49 回 日本外科代謝栄養学会学術集会 2012 年 7 月 5 日-6 日 シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル(東京都)
6. 吉川幸造, 他 9 名 3 番目, 栗田信浩. 腸管ストレスにおける大建中湯の抗炎症効果-From Bench to Bedside- 第 67 回 日本消化器外科学会総会 2012 年 7 月 18 日-20 日 富山国際会議場(富山県)
7. 栗田信浩, 他 9 名 1 番目. Role of Sonic Hedgehog signaling and expression of tight junction in regulation of cancer stem cells. 第 71 回 日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日-21 日 ロイトン札幌(北海道)
8. 佐藤宏彦, 他 3 名 3 番目, 栗田信浩. CPT-11 投与による腸管ストレスに対する大建中湯の効果と機序の解明 -なぜ腸内細菌が Bacterial Translocation に関係するのか?- 第 22 回 外科漢方研究会学術集会 2012 年 11 月 30 日 京王プラザホテル(東京都)
9. Yoshikawa K, 他 8 名 3 番目, Kurita N. Effect of kampo medicine, dai-kenchu-to, on bacterial translocation. 20th World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists (IASG02010) 2010 年 10 月 20 日-23 日 Cairo International Convention&Exhibition Center(エジプト)
10. 中尾寿宏, 他 13 名 3 番目, 栗田信浩. CPT11 による Bacterial Translocation の発症と Tight Junction 傷害 第 110 回 日本外科学会定期学術集会 2010 年 4 月 8 日-10 日 名古屋国際会議場(愛知県)
11. 福岡かおる, 他 12 名 2 番目, 桑原知己, 3 番目, 栗田信浩. 大腸中湯投与による抗炎症作用と腸管マイクロビオームの変化の検討 第 110 回 日本外科学会定期学術集会 2010 年 4 月 8 日-10 日 名古屋国際会議場(愛知県)
12. 柏原秀也, 他 9 名 3 番目, 桑原知己, 4 番目, 栗田信浩. 大建中湯投与による腸管マイクロビオームの変化の検討 第 47 回 日本外科代謝栄養学会学術集会 2010 年 7 月 8 日-9 日 神奈川県民ホール(神奈川県)
13. 吉川幸造, 他 9 名 3 番目 栗田信浩. 腸管ストレスに対する大建中湯の効果 -Bacterial translocation からマイクロビオームへ-第 65 回 日本消化器外科学会総会 2010 年 7 月 14 日-16 日 海峡メ

ッセ下関(山口県)

14. 柏原秀也, 他9名3番目, 栗田信浩. 炎症性サイトカインからみた消化管に対する大建中湯の効果 第17回 外科侵襲とサイトカイン研究会 2010年12月11日ホテル・ザ・マンハッタン(千葉県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

栗田 信浩 (KURITA NOBUHIRO)
徳島大学病院・地域外科診療部・特任教授
研究者番号：30335814

(2)研究分担者

高橋 章 (TAKAHASHI AKIRA)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・特任教授
研究者番号：90304047

桑原 知巳 (KUWAHARA TOMOMI)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：60263810

(3)連携研究者

()
研究者番号：