

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19607

研究課題名(和文)腸管バリア機能の構築における腸内細菌の関与

研究課題名(英文)The effect of microbiota on the gut barrier maturation

研究代表者

大岡 杏子(OH-OKA, Kyoko)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号：50569019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、母親の腸内細菌叢が子供の腸管バリア機能の構築に影響を及ぼすかを示す事を目的とした。腸管バリア機能の指標として腸間上皮細胞のタイトジャンクション構成因子の発現を解析したところ、週齢が進むにつれ発現量の上昇が見られた。当初は、germ freeマウスや抗生物質投与マウスに出生させ、母親の腸内細菌叢の違いによって子供の腸管バリア機能の構築に差が生じるか解析する予定であったがうまくいかなかった。そこで研究計画を変更し、プロバイオティクスやポリフェノールを母親に投与し腸内細菌叢を変化させ、解析する事にした。ある特定の乳酸菌とレスベラトロールが、腸管バリア機能に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to show whether the gut barrier maturation of infants is affected by microbiota of mother. The expression level of several tight junction proteins, which regulate intestinal barrier function, was increased depending on the week-old. Next, I analyzed whether the gut barrier maturation of infants is changed or not, after changing the microbiota of mother by administration of pro-biotics and polyphenol. It is suggested that a particular lactobacillus and resveratrol affect to the gut barrier function.

研究分野：免疫学

キーワード：小児免疫 腸管バリア機能

1. 研究開始当初の背景

腸管バリア機能の破綻が、粘膜免疫系制御異常を引き起こし、炎症性腸疾患や食物アレルギーなどの疾患の発症や進展に関わることが示唆されている。腸管バリア機能の破綻は食生活の乱れや老化、抗生物質の長期投与によって見られることから腸内細菌叢が腸管バリア機能に影響を与えている可能性が考えられる。

新生児の腸管バリア機能は未熟で、成長と共に構築されることが知られている。腸管バリア機能の成熟には、隣接する上皮細胞同士を強固に接着するバリア構造の一つで、claudin や occludin, zonula occludens など、多くのタンパク質から構成されているタイトジャンクションが重要な役割を果たしていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、子マウスの腸管バリア機能の発達に、腸内細菌叢、特に母親の腸内細菌叢が関与するか否かを明らかにすることを目的とした。これを明らかにすることは、腸内細菌叢と腸上皮細胞の新たな関係を示すと共に、乳幼児期のアレルギー性疾患や腸管感染症の予防法の開発にも役立つと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 腸上皮細胞のタイトジャンクション構成因子の発現が週齢によって異なるか確認した。胎児期-E16d、新生児期-1~3d、乳児期-1w、成獣マウスから腸管を採取し、zonula occludens, claudin-2, 3, 4, 7 の RNA の発現量

を解析した。

(2) 当初、germ free マウスを用いた実験を予定していたが、本施設では作製が困難で実験を行うことができなかった。そこで予定を変更し、抗生物質を投与することで腸内細菌叢を変化させたマウスに出産させ、抗生物質投与の有無で子マウスの腸管バリア機能の発達に差が生じるか解析した。

(3) 既に腸内細菌叢を変化させる事が報告されているレスベラトロール (ポリフェノール) (引用文献; ①) や 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) (引用文献; ②)、また、腸内細菌叢を変化させることが予想される様々なオリゴ糖 (プレバイオティクス)、乳酸菌 (プロバイオティクス)、を投与し、腸上皮細胞のタイトジャンクション構成因子の発現を解析した。本研究では、スクリーニングのため、成獣マウスにこれらを 2 週間投与し、マウスの腸上皮細胞のタイトジャンクション構成因子の発現を見た。

4. 研究成果

(1) 図 1 に示すように、週齢が進むにつれて、zonula occludens の発現量は変化しなかったが、claudin-3, 4, 7 の発現量が増加することがわかった。特に、claudin-3 は腸管に多く発現する因子であり、腸管バリア機能の発達の指標になると考えられる。一方、イオンや水分などを通すために重要であることが知られている claudin-2 の発現量は胎児期

のマウスで発現量がやや高いことがわかった。

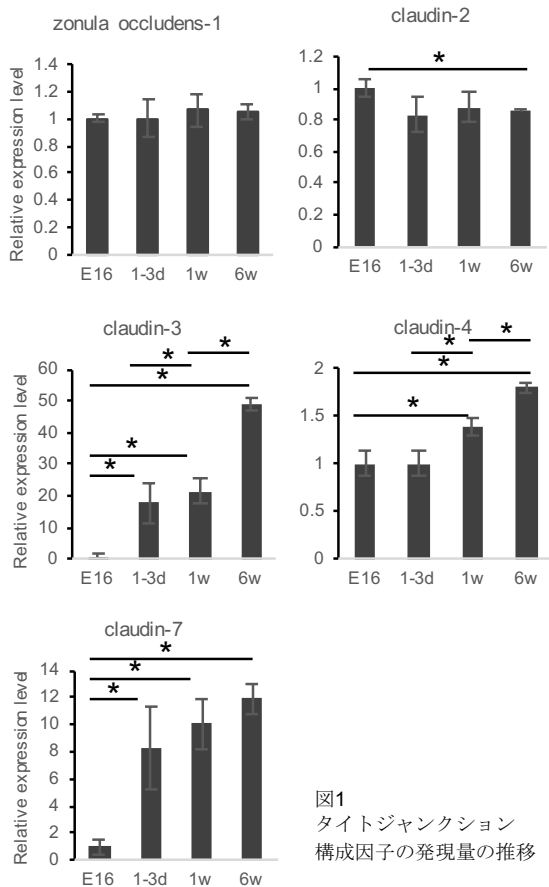


図1
タイトジャンクション
構成因子の発現量の推移

(2) 抗生物質を投与する事によってマウスが衰弱し、出産させる事が困難であり、解析できなかった。しかしながら抗生物質投与によって、マウスの腸管バリア機能が抑制されたので、腸内細菌叢と腸管バリア機能が密接に関係している事が示唆された。

(3) 図2に示すように、成獣マウスにある特定の乳酸菌Aを投与した際に、腸管の claudin-3,4 の発現量が上昇した。また、レスベラトロール投与によっても、claudin-3

の発現量が上昇した (図3)。どちらも、zonula occludens の発現量は変わらなかった。一方、DHNA やオリゴ糖の投与によって腸管のタイトジャンクション構成因子の発現量は変わらなかった。乳酸菌やレスベラトロールによるこれらの変化は、腸内細菌叢の変化によるものだけではない可能性もあるため、今後更なる解析が必要である。乳酸菌やレスベラトロールを投与した母親の腸内細菌叢の変化によって、新生児の腸管上皮細胞のバリア機能の発達にも差が生じる可能性があると考えている。これらを投与したマウスから生まれた子マウスの腸管バリア機能の発達に差が生じるか、また、乳酸菌やレスベラトロールを投与したマウスの糞を新生児に塗布したり、子マウスに糞食させる事で腸管バリア機能の発達に差が生じるか検討を試みている。

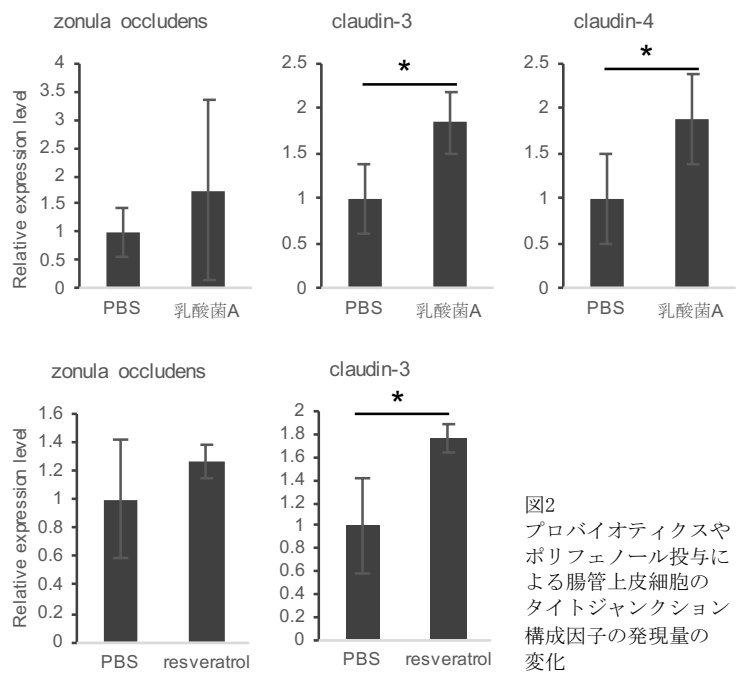


図2
プロバイオティクスや
ポリフェノール投与による腸管上皮細胞のタイトジャンクション構成因子の発現量の変化

<引用文献>

- ① Fang Li et al. Effects of Dietary Resveratrol on Gut Microbiota in Mice with Colitis. *Faseb Journal*. vol. 31 2017, 1241-1249
- ② Fukumoto et al. Identification of a probiotic bacteria-derived activator of the aryl hydrocarbon receptor that inhibits colitis. *Immunol. Cell Biol.* Vol. 92 (5) 2014, 460-465

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Oh-oka K, Kojima Y, Uchida K, Yoda M, Ishimaru K, Nakajima S, Hemmi J, Kano H, Fujii-Kuriyama Y, Katoh R, Ito H, Nakao A: Induction of colonic regulatory T cells by 5-aminosalicylic acid (5-ASA) by activating the aryl hydrocarbon receptor. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 査読有、2017 (in press)
- ② Hanihara M, Kawataki T, Oh-oka K, Mitsuka K, Nakao A, Kinouchi H: Synergistic anti-tumor effect with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition and temozolomide in a murine glioma model. *Journal of Neurosurgery*、査読有、124 (6), 2015, 1594-1601

[学会発表] (計2件)

- ① Oh-oka K, Nakao A: 5-ASA induces the colonic regulatory T cells via the activation of the AhR signaling pathway. 第45回日本免疫学会 2016年12月 5-7日 沖縄県 宜野湾市 口頭発表
- ② 齋藤一步, 大岡 杏子, 久本雅嗣, 奥田徹, 中尾篤人: レスベラトロール二量体であるε-ビニフェリンによるIgE依存性アレルギー反応の抑制効果. 第64回日本アレルギー学会学術大会 2015年 5月 26-28日 東京都 港区 ポスター発表

[その他]

ホームページ等

http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/para0imm/whatsnew.php

6. 研究組織

(1)研究代表者

大岡 杏子 (OH-OKA, Kyoko)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号: 50569019