

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08906

研究課題名(和文) プロバイオティクス由来の腸管バリア増強物質による敗血症治療薬開発

研究課題名(英文) Novel therapy for sepsis with probiotic-derived intestinal barriers enhancing molecules

研究代表者

高氏 修平 (Takauji, Shuhei)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：20793897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：乳酸菌より抽出された生理活性物質である長鎖ポリリン酸は腸内細菌叢の変化をもたらし、炎症増悪に関連する *Desulfovibrio* などの菌群を減少させ、逆に炎症改善に作用する有益な菌群である *Alistipes* を増加させることが明らかとなった。加えて長鎖ポリリン酸は腸管バリア機能を増強させる働きがある。急性膵炎の悪化には腸内細菌叢が深く関連しており、長鎖ポリリン酸投与による腸内細菌叢の変化と腸管バリア機能の増強作用の両者を介して、急性膵炎が改善することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで我々が行ってきた長鎖ポリリン酸による研究はいずれも腸管病変を対象にその治療効果を検討してきた。これに対して本研究は長鎖ポリリン酸が腸内細菌叢の変化を引き起こし、膵臓などの腸管外の遠隔臓器にまで作用を及ぼしている可能性を示した点において、その学術的意義は大きい。本研究の社会的意義は、将来、腸内細菌叢をターゲットとした他臓器疾患の治療薬開発につながる可能性を示したことである。

研究成果の概要(英文)：Polyphosphate (Poly P) derived from *L.brevis* altered the intestinal microbiome, decreasing the virulent bacteria *Desulfovibrio* and increasing the beneficial bacteria *Alistipes*. In addition, polyphosphate also enhances the intestinal barrier function. Intestinal microbiome is associated with the aggravation of acute pancreatitis, and Poly P attenuates acute pancreatitis through both modification of the intestinal microbiome and enhancement of the intestinal barrier integrity.

研究分野：救急医学

キーワード：プロバイオティクス 腸内細菌 敗血症 急性膵炎

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢は宿主のホメオスタシス維持に関連している。近年、この腸内細菌叢が乱れた状態は *dysbiosis* と呼ばれ、腸疾患ばかりでなく、膝臓などの遠隔臓器疾患の増悪にも関わることが明らかにされてきている(1)(2)。プロバイオティクスは宿主に健康上の利益をもたらす生菌と定義され、腸内環境を整える目的で使用されている。我々はこれまでプロバイオティクス (*Lactobacillus brevis*) 由来の生理活性物質である長鎖ポリリン酸が腸管保護作用を示すことや(3)、その作用メカニズムを明らかにしてきた(4)(5)。しかしながら、長鎖ポリリン酸が腸内細菌叢自体に与える影響や腸以外の遠隔臓器に対する作用については明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では①長鎖ポリリン酸が腸内細菌叢に対してどのような影響を及ぼしているのかについてメタゲノム解析の手法を用いて解析すること。②長鎖ポリリン酸が遠隔臓器の炎症や障害(敗血症や急性膵炎)に対してどのような効果があるか、またその作用メカニズムについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 長鎖ポリリン酸経口投与による腸内細菌叢の変化

マウスに長鎖ポリリン酸を24日間投与する群(ポリリン酸投与群)および生理食塩水を投与する群(コントロール群)に分類し、24日目にマウス糞便を回収する。この糞便サンプルからDNAを抽出し、精製した後に16S rRNA 遺伝子解析を行い、両群での菌叢変化を明らかにする。

(2) 敗血症モデル、急性膵炎モデルに対する長鎖ポリリン酸の炎症抑制効果

①敗血症モデルとして盲腸結紮穿孔法(cecal ligation and puncture, CLP)マウスモデル、②急性膵炎モデルとしてセルレイン誘発性急性膵炎マウスモデルを作成して長鎖ポリリン酸投与による炎症抑制効果をサイトカインおよび病理組織から評価する。

(3) 長鎖ポリリン酸投与による腸管バリア機能の評価

抽出したマウス大腸組織を用いて tight junction 蛋白の mRNA 発現量の変化、蛍光免疫染色を行い蛋白発現の局在を比較することで、腸管バリア機能の評価する。

(4) 長鎖ポリリン酸による炎症改善メカニズムの解明

(1)~(3)の結果から、長鎖ポリリン酸による遠隔臓器の炎症改善効果メカニズムについて明らかにする。

4. 研究成果

(1) メタゲノム解析を用いた長鎖ポリリン酸による腸内細菌叢の変化

16S rRNA 遺伝子解析の結果、PCoA 分析にて長鎖ポリリン酸投与群とコントロール群では異なる細菌叢プロファイルを示した。Metastat 分析の結果から、長鎖ポリリン酸投与群で *Alistipes*、*Candidatus_Saccharimonas* が有意に増加し、反対に *Desulfovibrio*、*Lachnospiraceae_UCG-001*、*Lactobacillus* は有意に減少していることが明らかとなった(図1)。この結果から長鎖ポリリン酸は腸内細菌叢を変化させることが明らかとなった。

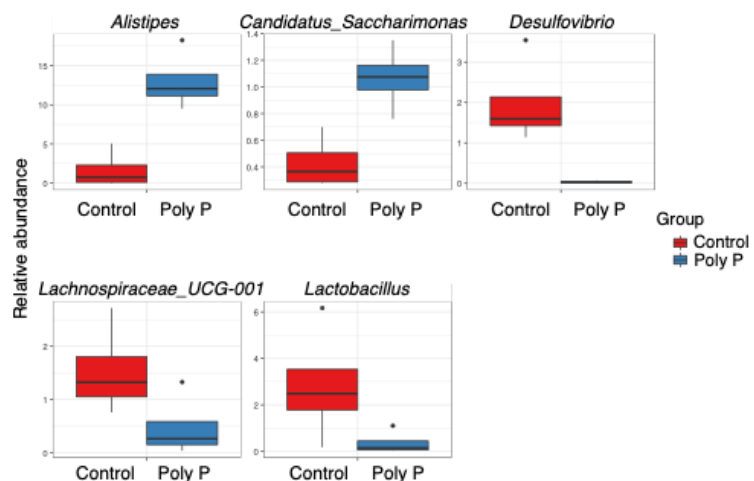


図1. 長鎖ポリリン酸群とコントロール群において有意な差が見られた細菌群

(2) 長鎖ポリリン酸による腸管外の炎症抑制効果

①CLP 敗血症マウスモデル

長鎖ポリリン酸投与を行った後に CLP 敗血症マウスを作成した群と対照群として生理食塩水投与を行った後に CLP 敗血症モデルを作成した群を比較したが、両群間の生存率に有意な差を認めず、長鎖ポリリン酸の効果を検査するモデルとしては適さなかった。

②セルレイン誘発急性膵炎マウスモデル

長鎖ポリリン酸投与群(AP+PolyP)では血清アミラーゼ、およびリパーゼは急性膵炎群(AP)に比べ、有意に低下した。(図2A, B)

膵組織中の炎症性サイトカイン
膵組織中の MCP-1 (CCL2)、IL-1 β の mRNA 遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR で測定した。MCP-1 (CCL2) の mRNA 発現は AP 群と比べ AP+PolyP 群で有意に抑制された。同様に IL-1 β も AP 群と比べ AP+PolyP 群で減少傾向を認めた。この結果、長鎖ポリリン酸は炎症性サイトカインの抑制により膵炎の炎症悪化を防いでいることが明らかとなった。(図 2 C, D)

膵組織の免疫染色
セルレイン誘発膵炎モデルの膵組織では炎症性細胞の浸潤、浮腫を特徴とした腺房細胞の障害を認めた。ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 免疫組織染色では、AP+PolyP 群で AP 群と比べ有意に好中球および単球の炎症浸潤が抑制された。(図 3)

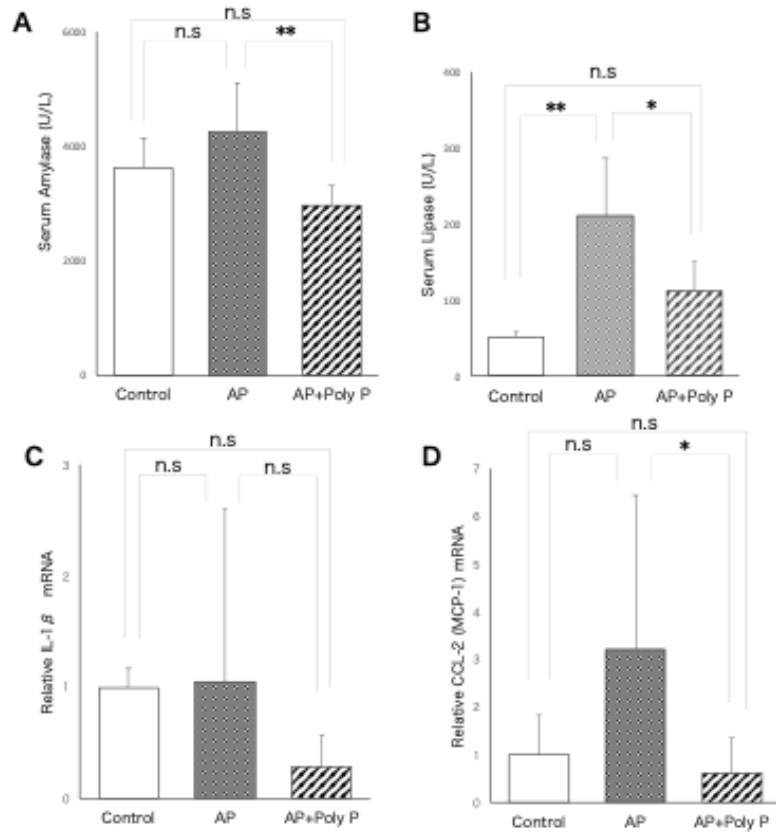


図 2. 血清アミラーゼ, リパーゼ, 膵組織サイトカインの mRNA 発現量

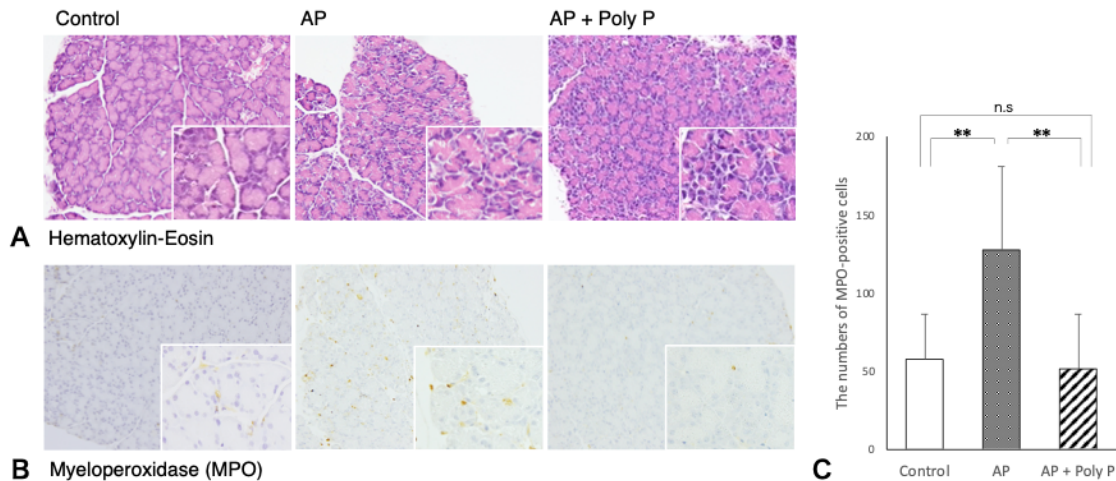


図 3. 膵組織ヘマトキシリンエオジン染色およびミエロペルオキシダーゼ染色

(3) 急性膵炎マウスモデルにおける長鎖ポリリン酸の腸管バリア機能の改善効果

大腸組織の蛍光免疫組織染色で、AP+PolyP 群において ZO-1 は腸管上皮の膜上に強く発現しているのに対して、AP 群では陰窩にわずかに発現しているのみであった。同様に、Occludin も AP 群に比べ、AP+PolyP 群で上皮細胞膜上に強く発現を認めた。Claudin-1 は両群間で有意な差は見られなかったが、同様の傾向がみられた。この結果、急性膵炎モデルにおいて長鎖ポリリン酸投与により腸管バリア機能が增強されることが示された。(図 4)

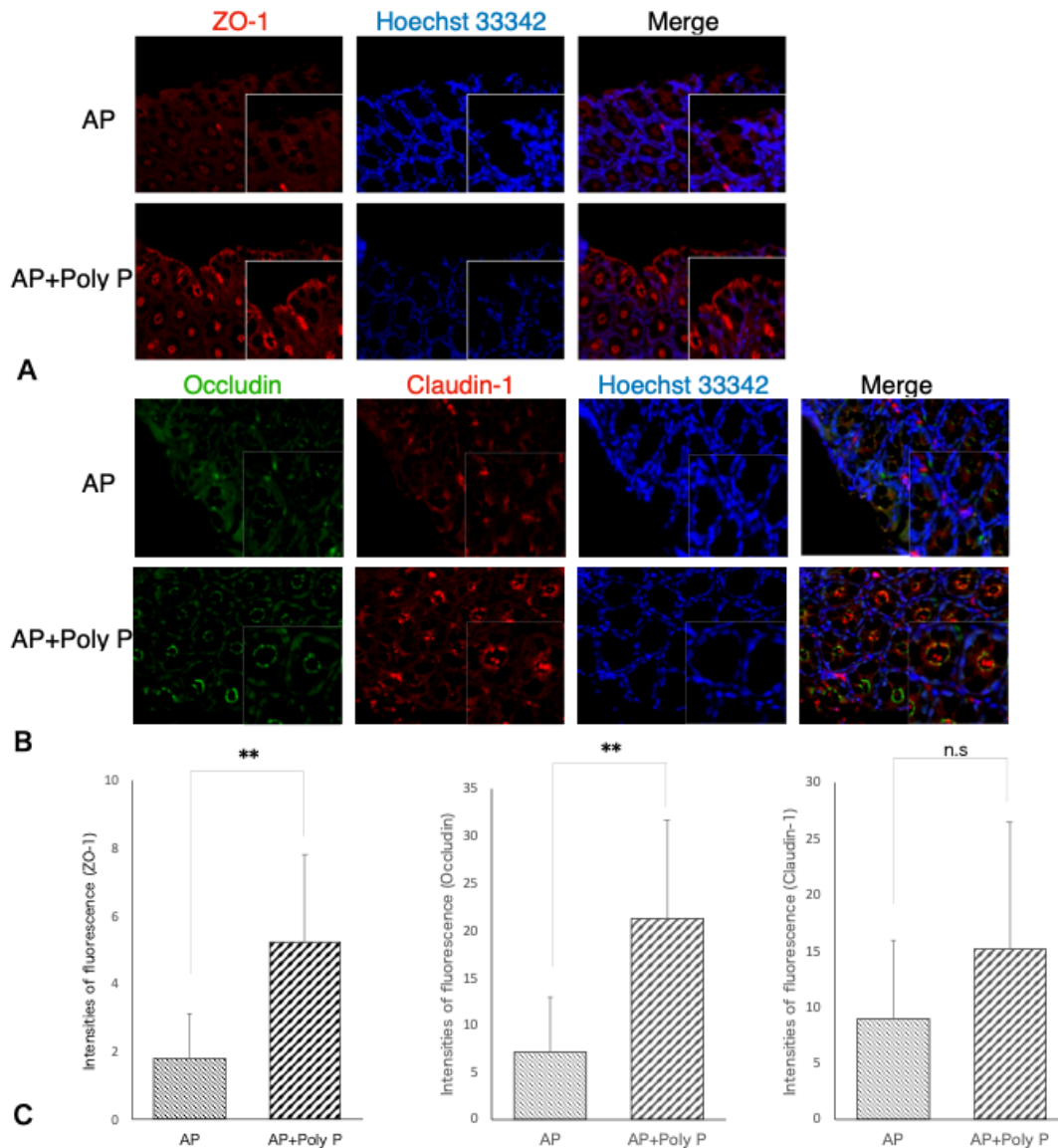


図4. 大腸組織の蛍光免疫組織染色(ZO-1, occludin, claudin-1)

(4) 長鎖ポリリン酸による急性膵炎改善メカニズムの解明

先行研究から急性膵炎の増悪には①腸内細菌の血中への移行、②膵での細菌からの NOD-1 を介した NF- κ B の活性化が関与していることが明らかにされている(6)。本研究において長鎖ポリリン酸が急性膵炎の炎症を抑制するメカニズムとして、長鎖ポリリン酸が①腸内細菌叢を変化させ、炎症増悪に関連する *Desulfovibrio* (7)などの菌群を減少、逆に炎症改善に作用する有益な菌群である *Alistipes*(8)を増加させること、および②腸管バリア機能を増強させることの両者を介して、膵臓での NOD-1 を介した NF- κ B 活性化をブロックし、その下流にある MCP-1 活性が抑制される経路が推察された。

<引用文献>

1. Zhu Y, He C, Li X, Cai Y, Hu J, Liao Y, et al. Gut microbiota dysbiosis worsens the severity of acute pancreatitis in patients and mice. *J Gastroenterol.* 2019;54(4):347-58.
2. Watanabe T, Kudo M, Strober W. Immunopathogenesis of pancreatitis. *Mucosal Immunol.* 2017;10(2):283-98.
3. Segawa S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Kobayashi N, Shigyo T, et al. Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway. *PLoS One.* 2011;6(8):e23278.
4. Tanaka K, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Kashima S, Sasajima J, et al. Probiotic-derived polyphosphate improves the intestinal barrier function through the caveolin-dependent endocytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;467(3):541-8.
5. Kashima S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, et al. Polyphosphate,

- an active molecule derived from probiotic *Lactobacillus brevis*, improves the fibrosis in murine colitis. *Transl Res.* 2015;166(2):163-75.
6. Tsuji Y, Watanabe T, Kudo M, Arai H, Strober W, Chiba T. Sensing of commensal organisms by the intracellular sensor NOD1 mediates experimental pancreatitis. *Immunity.* 2012;37(2):326-38.
 7. Roediger WE, Moore J, Babidge W. Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences.* 1997;42(8):1571-9.
 8. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(34):13780-5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Shuhei Takauji, Hiroaki Konishi, Mikihiro Fujiya, Nobuhiro Ueno, Hiroki Tanaka, Hiroki Sato, Shotaro Isozaki, Shin Kashima, Kentaro Moriichi, Yusuke Mizukami, Toshikatsu Okumura | 4. 巻 66 |
| 2. 論文標題 Polyphosphate, Derived from Lactobacillus brevis, Modulates the Intestinal Microbiome and Attenuates Acute Pancreatitis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences | 6. 最初と最後の頁 3872-3884 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10620-020-06747-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 小西弘晃、高氏修平、嘉島 伸、高橋慶太郎、久野木健仁、佐々木貴弘、村上雄紀、杉山雄哉、小林裕、安藤勝祥、上野伸展、盛一健太郎、藤谷幹浩 |
| 2. 発表標題 乳酸菌由来長鎖ポリリン酸は腸内細菌叢を変化させ急性膵炎を改善する |
| 3. 学会等名 第58回日本消化器免疫学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔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 | 上野 伸展 (Ueno Nobuhiro) (30436000) | 旭川医科大学・医学部・特任講師 (10107) | |

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 |
|---------|---------|