

令和 4 年 4 月 18 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15578

研究課題名(和文)腸内フローラを利用した放射線曝露個体における消化管障害新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel treatment for radiation induced gastrointestinal disorders using intestinal flora

研究代表者

辻口 貴清(Tsujiguchi, Takakiyo)

弘前大学・保健学研究科・助教

研究者番号：90737454

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)：高線量の放射線に曝露された個体では、重度の消化管障害により敗血症が誘発され死に至る。敗血症の原因ともなる消化管細菌は『腸内フローラ』と呼ばれ、生活習慣病や循環器疾患等と強い関連を持つことも知られているが、放射線曝露に伴う腸管機能と腸内細菌との関係は不明点が多い。この問題解明を目的に、本研究では放射線曝露後の腸内細菌の变化解析と共に腸管障害治療における腸内細菌の有用性を検討してきた。その結果、致死線量曝露個体では、乳酸菌群の大量流出が起こっていることが明らかとなった。また直腸便による移植実験では現段階において延命・救命効果は確認されていないことから、今後は培養細菌等を用いた移植を実施していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

被ばく傷病者における被ばく線量を過小評価してしまうと、潜伏期を経て臨床症状が発症する造血・消化管障害への対応が遅れてしまうため、治療戦略を決定する上で正確な線量評価は必須である。現在、染色体評価と核断片化評価が国際的に採用されているが、これらを実行するには高価な機材が必要および人材不足という問題が並行している。しかし、本研究の腸内フローラ解析結果は線量評価における新規バイオマーカーとしての有用性を提供する。特定の腸内フローラが線量および時間依存的に変化することを見出せば、簡便な遺伝子増幅法を利用することで新たな線量評価法への発展が期待され、社会的意義の高い研究である。

研究成果の概要(英文)：Severe gastrointestinal disorders induce sepsis and lead to death in individuals exposed to high doses radiation. Gastrointestinal bacteria that cause septicemia are called "intestinal flora" and are known to be strongly associated with lifestyle-related diseases and cardiovascular diseases. There are many unclear points about the relationship between. In order to clarify this problem, in this study, we have investigated the usefulness of gut microbiota in the treatment of intestinal disorders as well as the analysis of changes in gut microbiota after exposure to radiation. As a result, it was clarified that a large amount of lactic acid bacteria outflow occurred in the individuals exposed to the lethal dose. In addition, since life-prolonging and life-saving effects have not been confirmed in rectal stool transplantation experiments at this stage, transplantation using cultured bacteria will be carried out in the future.

研究分野：放射線科学

キーワード：被ばく医療 放射線事故 腸内フローラ 原子力災害医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高線量の放射線に曝露された個体では、放射線感受性である造血幹細胞からなる送血系や上皮幹細胞の充実した腸管は強い損傷を受け、最終的には個体死につながる。特にこれまでの放射線事故や災害で発生した患者個体では、重度の消化管障害を軽減できた例はないことが明らかである。さらに、重度の消化管障害の一つとして敗血症があり、この原因ともなる消化管細菌は『腸内フローラ』と呼ばれ、生活習慣病や循環器疾患等と強い関連を持つことも知られている。しかしながら、放射線曝露に伴う腸管機能と腸内フローラとの関係の詳細は全く不明である。

2. 研究の目的

放射線曝露個体における、放射線曝露後の腸内フローラの変化解析、腸内フローラ変化と腸管機能・障害の相関解析、腸管障害治療における腸内フローラの有用性を検討し、高線量放射線誘発消化管障害の治療法開発に資するデータ提供を目的とする。

3. 研究の方法

本研究は期間4年で、線量および時間による腸内フローラの変化を見出し、消化管障害の新規治療法確立を目指して実験を遂行した。

【課題1：線量/時間毎腸内フローラ変化解析 (In vivo)】

X線0,2,4,6,8Gyを選択し、C57BL/6NJclマウス(雄)8週齢(n=6~10)に照射する。照射前と照射後(2h~72h,2weeks)の糞便を個体毎に採取し、1. 目視的糞便評価 (Activity Index Score)：放射線性腸炎のスコアを作成、2. 経時的変化解析：便DNAのreal-time-PCRによる各群間比較定量、3. 線量依存的評価：照射後72時間後以降(腸絨毛の細胞サイクルが2-3日程度である為)におけるメタゲノム解析、を実施した。

【課題2：腸管バリア機能解析】

消化管バリア機能は、絨毛同士を接合するタイトジャンクション構造と分厚いムチン粘膜層により維持される。その為、具体的に下記1から5の解析を実施し、線量/時間毎の消化管バリア機能の変化を解明する。1. 形態学的評価：HE・PAS/マルシアン重染色評価、2. アポトーシス評価：TUNEL・Caspase3染色、3. 免疫染色評価：腸上皮細胞内タンパク解析、4. 膜タンパク接合に係るmRNA発現量解析、5. ELISA解析：粘膜バリアに係るムチン解析、を実施した。

【課題3：In vivo治療実験 および 課題4：総合評価】

課題1,2の結果を基に、消化管バリア機能との関わりを予想させる腸内フローラを致死線量曝露マウスに移植し、治療効果を検証した。

4. 研究成果

高線量の放射線に曝露された個体では、重度の消化管障害により敗血症が誘発され死に至る。敗血症の原因ともなる消化管細菌は『腸内フローラ』と呼ばれ、生活習慣病や循環器疾患等と強い関連を持つことも知られているが、放射線曝露に伴う腸管機能と腸内フローラとの関係の詳細は全く不明である。こうした問題解明を目的に、放射線曝露個体における、放射線曝露後の腸内フローラの変化解析、腸内フローラ変化と腸管機能・障害の相関解析、腸管障害治療における腸内フローラの有用性を検討してきた。下記に実施成果を項目別に表記する。

【課題1：線量/時間毎腸内フローラ変化解析 (In vivo)】

放射線線量及び被ばく後の経過時間ごとの腸内細菌叢の変化を追跡するため、X線0,2,4,8GyをC57BL/6NJclマウス(雄)8週齢(n=6~10)に照射し、生存率・体重変化・便の形状・腸管病理解析・腸内細菌層(qPCR CT解析)を解析した。被ばくマウス0-4Gy群は2週間の観察期間中に死亡することなく、一時的な体重減少はあるものの100%の生存率となった。8Gy照射マウスは顕著な体重減少を示し、照射14日目に全頭死亡した。死亡に至らなかった4Gy照射群では、照射直後から血便を排出し、死に至らない場合においても急性期に消化管症状を呈することが明らかとなった。照射後72時間にわたって追跡した腸内細菌叢では、*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium* coccoides group, *Bacteroides* spp. の計5種の細菌属を実験対象とした。その結果、4-8Gy照射群において、*Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp.のような乳酸菌群において顕著な排出量の増加を確認した(図1)。

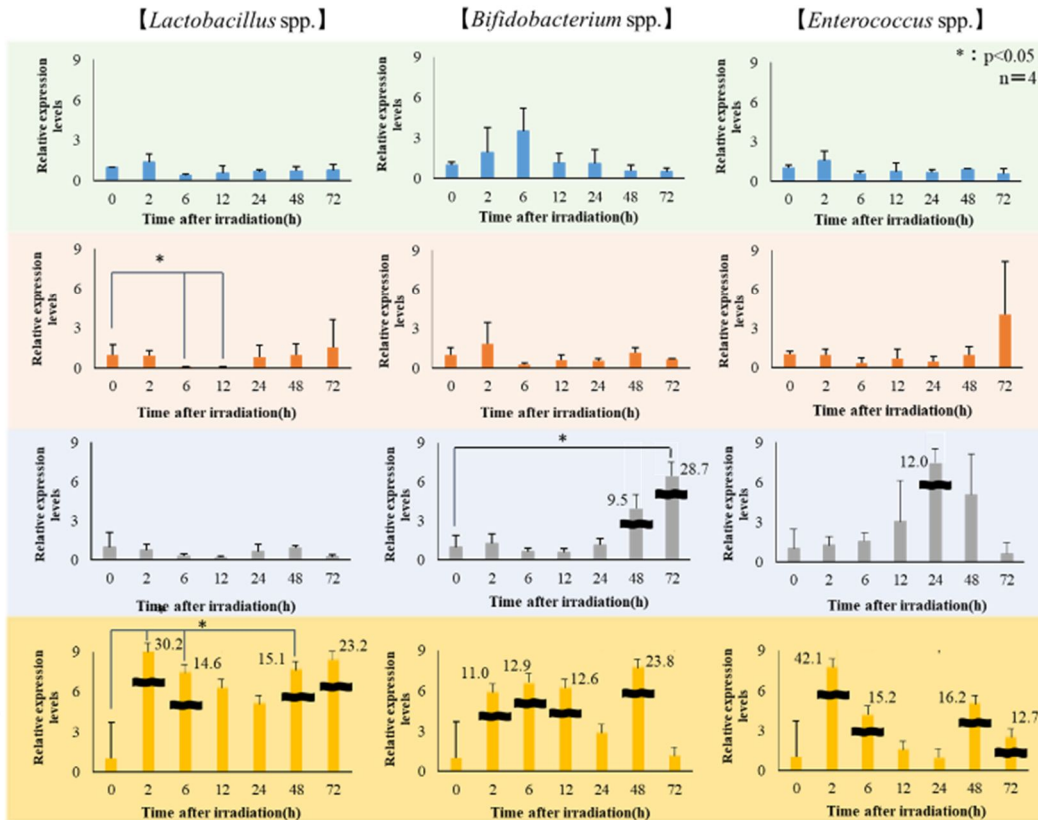


図1 被ばく線量と経過時間ごとの乳酸菌群の比較定量

【課題 2：腸管バリア機能解析】

被ばく後72時間経過したマウスにおいて、TUNEL染色、アルシアン青染色、HE染色を実施し腸管上皮の被ばくによる障害の程度を解析した。

小腸上皮は0-4Gy照射群では形態的变化は認められなかったが、8Gy照射群において顕著な上皮の脱落、変形をきたした。大腸上皮は0-8Gy照射群ともに形態学的変化は認められなかった。アルシアン青染色においては、形態学的変化を認めなかった大腸上皮において4-8Gy照射群にて杯細胞の萎縮、粘液の減少を認めた。TUNEL染色では8Gy照射群小腸上皮でDNA断片化の増加、大腸上皮における線量依存的なDNA断片化の増加を確認した(図2)。

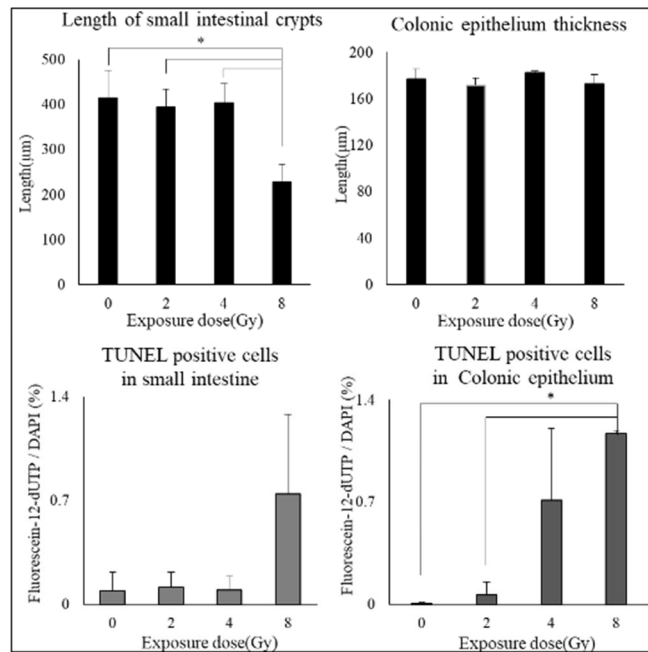


図2 小腸と大腸の形態学的変化とDNA断片化の比較

【課題 3：In vivo 治療実験 および 課題 4：総合評価】

致死に至らない4Gy照射群の直腸便懸濁液を致死線量である8Gy照射群マウスに経口投与し、便移植による放射線治療効果について検討したが、現段階においては明確な延命効果や治療効果は確認できていない。直腸便内における細菌生存率の検討や虫垂内堆積便や放射線依存的変化をきたした乳酸菌群の単離培養による移植実験を行う必要があると考えている。

本研究ではこれまで放射線消化管障害における腸内細菌の詳細な変動について経過時間ごとに追跡することで一部の乳酸菌群に放射線影響を受けていることを明らかとした。この線量依存的な変化が細菌の死によるものか増殖効果によるものかは明らかではない。また消化管に生息細菌は、相互に作用し生態系を維持している。本研究で明らかになった現象が他の細菌に与える影響についても検討することで、急性期における検査法の構築や治療法の開発に近づけると

考えている.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsujiuchi Takakiyo, Yamaguchi Masaru, Yamanouchi Kanako	4. 巻 45
2. 論文標題 Short-Term Changes in Gut Microflora and Intestinal Epithelium in X-Ray Exposed Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Protection and Research	6. 最初と最後の頁 163-170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14407/jrpr.2020.45.4.163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sakamoto Yamato, Tsujiuchi Takakiyo, Ito Koichi, Yamanouchi Kanako	4. 巻 184
2. 論文標題 DETERMINATION OF GUT BACTERIAL METABOLITES IN RADIATION EXPOSED MICE	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Radiation Protection Dosimetry	6. 最初と最後の頁 493-495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rpd/ncz094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamanouchi Kanako, Tsujiuchi Takakiyo, Sakamoto Yamato, Ito Koichi	4. 巻 60
2. 論文標題 Short-term follow-up of intestinal flora in radiation-exposed mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 328-332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrz002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 辻口貴清、山内可南子、伊藤勝博	4. 巻 47
2. 論文標題 腸内フローラを利用した放射線曝露個体の消化管障害新規治療法の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 599-601
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamato Sakamoto, Takakiyo Tsujiguchi, Koichi Ito, Kanako Yamanouchi
2. 発表標題 Determining gut bacterial metabolites in radiation exposed mice
3. 学会等名 9th International Conference on High Level Environmental Radiation Areas (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辻口貴清、山内可南子
2. 発表標題 原子力災害時に応用可能な早期治療・検査法構築へ向けて-腸内フローラ変化の追跡-
3. 学会等名 第77回日本公衆衛生学会総会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------