

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790177  
 研究課題名（和文）  
 自然免疫系を制御するプロバイオティクスによる炎症性腸疾患の予防と治療  
 研究課題名（英文）  
 Prevention and treatment of inflammatory bowel disease by probiotics regulate innate immunity.  
 研究代表者 楠本 健二（KUSUMOTO KENJI）  
 山形大学・地域教育文化学部・助教  
 研究者番号：90398008

研究成果の概要：難治性疾患である炎症性腸疾患の予防および治療を目指し、これまで報告の少ないプロバイオティクス候補菌を用いて研究を行った。炎症性腸疾患類似腸炎発症モデルマウスを用いて検討を行った。候補菌の経口投与によって腸炎発症に伴う、体重減少や肉眼的な炎症の程度の抑制が見られた。また炎症性サイトカイン mRNA の発現抑制が見られた。細胞レベルにおいても候補菌の添加によって炎症を抑制することを見出し、炎症性腸疾患に対して有益な効果をもたらす可能性を明らかにした。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：自然免疫・プロバイオティクス

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は、主に潰瘍性大腸炎とクローン病に大別される難治性免疫疾患である。その病因・病態についてはまだ十分に解明されていないが、遺伝的素因、環境要因が複雑に絡み合った免疫機能の破綻によるものであると考えられている。これまでに、潰瘍性大腸炎を自然発症する IL-10 ノックアウトマウスを用いた研究において、無菌条件下では腸炎を発症しないこと、また抗炎症性サイトカインを分泌する乳酸菌が腸炎の発症を予防し、さらに発症後の腸炎

を改善することが報告されている。一方、潰瘍性大腸炎の大腸粘膜上皮細胞では、腸内細菌やウイルス等の病原因子を認識する Toll 様受容体（TLR）の発現異常が見られることが報告されている。これらの研究成果より、炎症性腸疾患の発症原因の一つとして腸内細菌に対する自然免疫系の異常が考えられている。そこで、炎症性腸疾患の発症メカニズムを解明する上で腸内細菌の関与について明らかにすることが重要であると考えられる。

近年、炎症性腸疾患の治療法の一つとし

て、腸内細菌叢に対して影響を与える乳酸菌やビフィズス菌といったいわゆる、プロバイオティクスの有用性が注目されている。最近では、プロバイオティクスが潰瘍性大腸炎患者やクローン病患者などに実際に投与され、プロバイオティクスの有効性についても多数確認されている。またプロバイオティクスとして有用な菌より抽出された DNA が、TLR9 を介して I 型インターフェロン (IFN- $\gamma$ ) を誘導し、抗炎症作用を發揮するといった新しいメカニズムが報告され、プロバイオティクスの作用メカニズムのひとつとして、TLR9 シグナル経路も重要であることが考えられている。

以上の研究成果より、TLR を介する自然免疫系を制御するプロバイオティクスの発見は、炎症性腸疾患に対する新しい治療法および治療薬の開発につながることを期待される。

## 2. 研究の目的

新規プロバイオティクス候補菌 (以下、候補菌) を用いた炎症性腸疾患に対する新しい治療法の確立と予防に関するメカニズムを明らかにする。

(1) 炎症性腸疾患類似腸炎発症モデル動物に与える候補菌の影響

(2) 腸管内での炎症性サイトカインの発現・分泌に与える候補菌の影響

(3) 大腸粘膜上皮細胞の TLR シグナル経路に与える候補菌の影響

について解析を行い、候補菌による TLR を介する自然免疫系の制御機構と、炎症性腸疾患の発症予防および治療に関する分子メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 炎症性腸疾患類似腸炎発症モデル動物に対するプロバイオティクスの効果の解析

炎症性腸疾患類似腸炎発症モデル動物の作成

本研究では、代表的な炎症性腸疾患発症モデル動物としてよく用いられている dextran sodium sulfate (DSS) 腸炎発症モデルマウスと、trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 腸炎モデルマウスを作成した。

それぞれの腸炎モデルにおいて、腸炎の発症に伴う体重変化、摂食量の変化、死亡率、腸管の長さおよび重量、脾臓重量、血便の有無について詳細に解析を行った。さらに、大腸粘膜における、潰瘍の深さと炎症の程度についてはスコア化し、比較解析を行った。

プロバイオティクスの投与方法の決定

候補菌自身の経口投与、または注腸投与を行い、それぞれの腸炎発症モデルマウス

に対する影響については、で挙げた項目について解析し、非投与群との比較を行った。さらに候補菌の分泌産物についても同様に、経口投与または注腸投与を行いそれぞれの腸炎発症モデルマウスに対する影響についてで挙げた項目について解析し、非投与群との比較を行った。

炎症性サイトカインの測定

プロバイオティクス投与群と非投与群の大腸を採取し、大腸粘膜上皮細胞より総 RNA を ISOGEN (日本ゼーン) を用いて抽出した。炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-8 等) の mRNA の発現変化については、それぞれの遺伝子に対応するプライマーを用いた PCR 法によって解析を行った。

Toll 様受容体 (TLR) の発現変化の解析

候補菌投与群と非投与群の大腸を採取し、大腸粘膜上皮細胞より総 RNA は、ISOGEN (日本ゼーン) を用いて抽出し、TLR の mRNA の発現レベルについては、それぞれの遺伝子に対応するプライマーを用いた PCR 法によって解析を行った。

(2) ヒト大腸がん由来細胞株に対する候補菌の影響について

ヒト大腸がん由来細胞株を用いた *in vitro* における細胞生物学的解析

TLR2、TLR4、TLR9 を発現しているヒト大腸がん由来細胞株である Caco2、T84、HT29 細胞を用いて、以下の解析を行った。

候補菌の添加による炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-8 等) の発現変化

候補菌の添加による大腸粘膜細胞の傷害からの保護および大腸粘膜細胞の修復に関連する因子 (Hsp70 等) の発現変化

それぞれの mRNA の発現変化については、それぞれの遺伝子に対応するプライマーを用いた PCR 法によって解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 炎症性腸疾患類似腸炎発症モデル動物に対するプロバイオティクスの効果の解析

デキストラン硫酸 (DSS) 誘発大腸炎モデルマウスに対する候補菌の作用

雌 BALB/c マウスに 5% DSS を自由飲水させると、飲水開始後 3-4 日目より血便、軟便、体重減少などが認められた。飲水開始 8 日目に頸椎脱臼にて安楽死させ、大腸の長さを測定し、炎症の程度を肉眼的スコアによって確認した。候補菌の投与により体重の減少や大腸短縮の抑制が認められた。炎症の程度の指標である肉眼的スコアの減少も見られ、腸炎症の改善傾向が認められた。

トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘発大腸炎モデルマウスに対する候補菌の作用

雌 BALB/c マウスに 100 mg/kg の濃度で

TNBS を注腸すると、2 日目より血便、軟便、体重減少などが見られた。また腸粘膜上皮細胞における炎症性サイトカイン mRNA の発現は候補菌投与群において IL-1、IL-12p40、TNF- mRNA の発現が抑制されていた。一方で、IL-10 mRNA の発現は候補菌投与群で亢進していた。このように候補菌は炎症性サイトカイン応答を制御し、大腸炎の病状を軽減させる可能性があることを明らかにした。

(2) ヒト大腸がん由来細胞株に対する候補菌の影響について

ヒト大腸がん由来細胞株を用いた *in vitro* における細胞生物学的解析

T84 細胞と HT29 細胞を用いて、炎症性サイトカインの細胞傷害に対する候補菌の保護作用について解析を行った。TNF- を添加し継続的な IL-8 mRNA の発現は PCR 法を用いて解析した。TNF- の添加によって IL-8 mRNA の発現量は増加したが、候補菌の添加によって IL-8 mRNA の発現抑制が見られた。また、TNF- 添加によるスーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) の産生増加も、候補菌の添加によって抑制した。

このように本研究では、新規プロバイオティクス候補菌は大腸炎の病態を軽減し、炎症性腸疾患に対して有益な効果をもたらす可能性があることを明らかにした。

## 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)

研究成果を発表するにはいたっていない。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

楠本 健二 (KUSUMOTO KENJI)  
山形大学・地域教育文化学部・助教  
研究者番号：90398008

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

# 様式 C-19 (記入例)

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 年 月 日現在

研究種目：基盤研究 (A)  
研究期間：2004～2007  
課題番号：16000000  
研究課題名 (和文) に関する研究  
研究課題名 (英文) AAAAAAAAAAAAA  
研究代表者  
学振 太郎 (GAKUSHIN TARO)  
大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

研究成果の概要：

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2005年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2006年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2007年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
年度			
総計	40,000,000	12,000,000	52,000,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

(1)

(2)

2. 研究の目的

(1)

(2)

3 . 研究の方法

(1)

(3)

(2)

4 . 研究成果

(1)

(4)

■

(5)

(2)

■

(6)

(7)

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10件)

学振太郎、半蔵門一郎、学振花子、論文  
名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発  
表年(西暦)、査読の有無

学振太郎、論文名、掲載誌名、巻、最  
初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の  
有無

学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最  
初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の  
有無

〔学会発表〕(計5件)

〔図書〕(計2件)

〔産業財産権〕  
出願状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://>

6. 研究組織

(1)研究代表者

学振 太郎 (GAKUSHIN TARO)  
大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

(2)研究分担者

学振 花子 (GAKUSHIN HANAKO)  
大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

学振 次郎 (GAKUSHIN JIRO)  
大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

学振 三郎 (GAKUSHIN SABURO)  
大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

(3)連携研究者

学振 四郎 (GAKUSHIN SHIRO)  
大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：