

令和 3 年 5 月 8 日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20164

研究課題名(和文) プロバイオティクスは敗血症関連二次感染の原因である免疫麻痺を解除できるか？

研究課題名(英文) Do probiotics reverse immune paralysis in sepsis?

研究代表者

長太 のどか (Nago, Nodoka)

鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・助教

研究者番号：10772593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症では一次感染初期の免疫系細胞の過剰な活動亢進による臓器傷害や、感染後期での免疫系が強く抑制された免疫麻痺により引き起こされる二次感染などが懸念されている。我々は敗血症時の免疫応答を調べ、プロバイオティクスの敗血症一次感染に対する効果および敗血症二次感染の原因となる免疫麻痺を解除する効果について検証した。敗血症モデルマウスにおける腸管粘膜(MLN)および脾臓(SP)における樹状細胞(DC)は、部位別に機能的に異なることが見出された。また、敗血症発症源となり得るサルモネラ菌の増殖抑制効果も認められたことから、プロバイオティクスが敗血症やその後の二次感染に対して効果的に寄与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症の発症数は世界的に増えつつあるが、その特異的な治療法は未だなく、効果的な治療法が切望されている。敗血症に罹患すると進行が早く、重症化や二次感染への罹患も待ち受けており長期予後の悪化や入院生活の延長を余儀なくされる可能性が非常に高いため、早期の効果的対応が必要と考える。本研究では、敗血症性免疫麻痺に関連するDC活性の分子基盤を示し、また、プロバイオティクスが敗血症発症源の1つである腸管感染症の予防もしくは治療に効果的に寄与する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In sepsis, there are concerns about organ damage due to excessive activation of immune system cells in the early stage of primary infection, and secondary infection caused by immune paralysis in which the immune system is strongly suppressed in the late stage of infection. We investigated the immune response during sepsis and examined the effects of Probiotics on primary septic infections and the effects of relieving the immune paralysis that causes secondary septic infections. It was found that the dendritic cells (DC) in the intestinal mucosa (MLN) and spleen (SP) in sepsis model mice were functionally different depending on the site. In addition, the effect of suppressing the growth of Salmonella, which can be a source of sepsis, was also observed. These findings suggest that Probiotics may be able to provide effective preventive or therapeutic effects against sepsis and subsequent septic secondary infections.

研究分野：栄養学

キーワード：プロバイオティクス 敗血症 感染症 サルモネラ 腸管粘膜 免疫麻痺

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症は感染症を契機に発症し、播種性血管内凝固症候群(DIC)から制御不能な多臓器不全となり死に至る。感染初期では免疫系細胞の活動が過剰に亢進し臓器傷害を引き起こすが、後期には免疫系が強く抑制された免疫麻痺により二次感染を引き起こす。敗血症後期における免疫抑制のメカニズムは未だ不明な点が多く、分子機構は解明されていない。樹状細胞(DC; Dendritic Cell)は、免疫系の維持や反応を制御する重要な免疫細胞であるが、敗血症では腸管細菌叢の乱れがDCを含む粘膜免疫細胞の機能不全を誘導している可能性が提唱されている¹⁾。そこで、我々は免疫系活性化の誘導に大きく関与することが期待できる腸管粘膜DCと、その機能に影響する可能性があるプロバイオティクスに着目した。マイクロRNA miR-221/222はDCの活性化に関与する遺伝子群を包括的に制御している²⁾ため、本研究の研究開始当初は、「プロバイオティクスが敗血症での腸管粘膜DCのmiR-221/222発現上昇を抑制し、免疫麻痺を解除する効果がある」という仮説を検証することであった。しかしながら、プロバイオティクスが感染症に対する代替治療となる可能性が高い³⁾ことから、敗血症発症のきっかけとなる感染症に対するプロバイオティクスの有効性について確認し実証しておくことも重要と考えられたため、腸管感染症の主要な感染原因菌の1つであるサルモネラ菌を用いて、この増殖抑制効果について調べることを本研究に加えて検討することとした。

2. 研究の目的

本研究の狙いは、プロバイオティクスが、敗血症関連二次感染における腸管粘膜DCの免疫機能へどのように寄与し、病態からの改善効果を示すことができるのか明らかにすることである。そのため、敗血症性二次感染の原因となる免疫麻痺の分子機構を調べ、敗血症時の免疫応答を知ること、プロバイオティクスが敗血症発症の契機の1つとなり得る腸管感染症源菌であるサルモネラ菌に対する有効的効果が認められるか調べることを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 敗血症時における免疫応答

C57BL/6JおよびBalb/cマウス(10~13週齢)を用いて行った。C57BL/6Jマウスは盲腸結紮穿孔刺(CLP)敗血症モデルを作製した。Balb/cマウスの脾臓から分離したCFSE標識CD4+T細胞とC57BL/6Jマウスの腸管粘膜もしくは脾臓から分離したCD11c+細胞(DC)を、RPMI-1640培地で7日間共培養し、フローサイトメトリー分析、RT-PCR分析、qPCR分析を行った。また、CFSE標識CD4 T細胞をIL-1 およびTNF- とともにインキュベートし、それらの増殖を分析した。

3-2. 腸管感染症源菌に対するプロバイオティクスの効果

プロバイオティクス(乳酸菌・ビフィズス菌)の培養のために、次の市販のヨーグルトを用いた;

1) R-1 (*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* OLL1073R-1)[(株)明治]、2) ガセリ (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) [雪印メグミルク]、3) ビヒダス (*Bifidobacterium longum*) [森永乳業]、4) ビフィズス SP (*Bifidobacterium longum* SBT2928) [雪印メグミルク]、5) カスピ海 (*Lactococcus lactis subsp. cremoris* FC) [フジッコ]

乳酸菌およびビフィズス菌をそれぞれMRS培地上に個別に播種し、嫌氣的条件下にて培養し、培養72時間後にコロニーを得た。これらの得られたコロニーを純培養するため、乳糖ブイヨン培養液にそれぞれ播種した。培養24時間後に培養液が緑色から黄色に変化したことで有機酸の産生を確認した。この純培養菌を新たなMRS培地に各々接種し、培養48時間後に得られた3) *Bifidobacterium longum* および5) *Lactococcus lactis subsp. cremoris* FCのコロニーをサルモネラ菌の増殖抑制の検討実験に用いた。

サルモネラ菌は、三重県公的機関保健環境研究所および保健所において検出・保存されているサルモネラ菌株を用い、DHL培地で培養した。

腸管感染症の主要な感染原因菌となるサルモネラ菌の増殖抑制効果を調べるため、次のようにいくつかの接種パターンによってMRS培地上に各種菌を接種し培養した;

1) サルモネラ菌の全面塗抹培地: MRS培地上にサルモネラ菌を全面塗抹し、その上からプロバイオティクスを各々接種した。2) プロバイオティクスの全面塗抹培地: MRS培地上に各種プロバイオティクスをそれぞれ別々に全面塗抹し、その上からサルモネラ菌を各々接種した。3) プロバイオティクスの縄張り培地: MRS培地上に各種プロバイオティクスをそれぞれ格子状に接種し縄張りを作製し、その格子の枠内にサルモネラ菌を接種した。4) Control: MRS培地上にサルモネラ菌を接種した。

4. 研究成果

4 - 1 . 敗血症時における免疫応答

盲腸結紮穿孔刺 (CLP) 敗血症モデルマウスの腸管粘膜 (MLN) および脾臓 (SP) において、MLN の DC はより多くの IL-1 を産生し、CD4T 細胞を効果的に増殖させることを示したことから、敗血症時に MLN DC から放出されるサイトカインが部分的に敗血症性炎症の促進に役割を果たす可能性があることが考えられた。敗血症では MLN 組織と SP 組織それぞれにおける DC の機能的な違いが敗血症性炎症や免疫麻痺を誘発する可能性が見出された。

4 - 2 . 腸管感染症源菌に対するプロバイオティクスの効果 (図1)

Bifidobacterium longum の縄張りは、サルモネラ菌の増殖をやや抑制した (a)。

Lactococcus lactis subsp.cremoris FC の縄張りは、サルモネラ菌の増殖を抑制しなかった (b)。

サルモネラ菌全面塗抹上に接種した *Bifidobacterium longum* は、やや増殖した (c)。

サルモネラ菌全面塗抹上に接種した *Lactococcus lactis subsp.cremoris FC* は、増殖が見られなかった (d)。

Bifidobacterium longum 全面塗抹上に接種したサルモネラ菌は、増殖しなかった (e)。

Lactococcus lactis subsp.cremoris FC 全面塗抹上に接種したサルモネラ菌は、増殖が見られた (f)。

プロバイオティクスの中でもビフィズス菌 (*Bifidobacterium longum*) がサルモネラ菌の増殖を抑制する効果が見られたため、敗血症発症の契機となる腸管感染症に対して有効である可能性が考えられた。

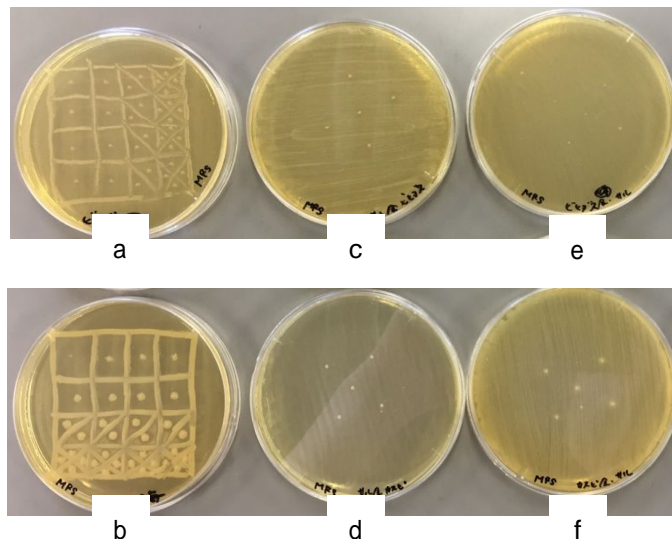


図1 腸管感染症源菌 (サルモネラ) に対するプロバイオティクスの増殖抑制効果

< 引用文献 >

- 1) Haak et al, The role of the gut microbiota in sepsis, *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2:135, 135-143, 2017.
- 2) Seeley, Induction of innate immune memory via microRNA targeting of chromatin remodelling factors, *Nature*, 559:114, 114-119, 2018.
- 3) Gut et al, Salmonella infection - prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review, *Microbiology*, 164: 11, 1327-1344, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Darkwah Samuel, Nago Nodoka, Appiah Michael G., Myint Phyo Kyawe, Kawamoto Eiji, Shimaoka Motomu, Park Eun Jeong	4. 巻 7
2. 論文標題 Differential Roles of Dendritic Cells in Expanding CD4 T Cells in Sepsis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 52～52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines7030052	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 該当する
1. 著者名 Kawamoto Eiji, Nago Nodoka, Okamoto Takayuki, Gaowa Arong, Masui-Ito Asami, Sakakura Yosuke, Akama Yuichi, Soe Zay Yar, Prajuabjinda Onmanee, Darkwah Samuel, Appiah Michael G., Myint Phyo Kyawe, Obeng Gideon, Park Eun Jeong, Imai Hiroshi, Shimaoka Motomu	4. 巻 511
2. 論文標題 Anti-adhesive effects of human soluble thrombomodulin and its domains	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 312～317
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.02.041	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 該当する
1. 著者名 Nodoka Nago, Misao Yoneda, Samuel Darkwah, Eiji Kawamoto, Eun Jeong Park, Motomu Shimaoka	4. 巻 5
2. 論文標題 Micro-MRI-based Detection of Tissue Damage in the Liver, Pancreas, and Kidney during the Early Phases of an LPS and D-Galactosamine-Induced Hepatic Injury Model in Mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostic Pathology	6. 最初と最後の頁 1～8
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 長太 のどか、川本 英嗣、朴 恩正、島岡 要	4. 巻 27
2. 論文標題 リコモジュリンによる白血球インテグリンと 血管内皮細胞上のインテグリンリガンドを介した接着制御作用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 鈴鹿医療科学大学紀要	6. 最初と最後の頁 41～54
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 -

1. 著者名 Kawamoto Eiji, Nago Nodoka, Okamoto Takayuki, Gaowa Arong, Masui-Ito Asami, Akama Yuichi, Darkwah Samuel, Appiah Michael Gyasi, Myint Phyo Kyaw, Obeng Gideon, Ito Atsushi, Caidengbate Siqingaowa, Esumi Ryo, Yamaguchi Takanori, Park Eun Jeong, Imai Hiroshi, Shimaoka Motomu	4. 巻 9
2. 論文標題 The Lectin-Like Domain of Thrombomodulin Inhibits 1 Integrin-Dependent Binding of Human Breast Cancer-Derived Cell Lines to Fibronectin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 162 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9020162	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 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 米田 操、棚橋 伸行、前河 裕一、金山 和樹、山口太美雄、長太のどか、加藤洋介、橋本 秀哉
2. 発表標題 臍 EUS-FNA 残渣検体の臍腫瘍マーカーが細胞診断に有用であった臍管癌の1例
3. 学会等名 第58回中部支圏支部医学検査学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 棚橋 伸行、前河 裕一、金山 和樹、山口太美雄、長太のどか、加藤洋介、米田 操
2. 発表標題 若年層における脂肪肝の超音波診断評価について
3. 学会等名 第58回中部支圏支部医学検査学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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