

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390148

研究課題名(和文)炎症性腸疾患バイオフィーム微生物由来活性物質を介した粘膜保護作用の解析とその制御

研究課題名(英文)Cytoprotective effects of bioactive molecules derived from bacteria in the intestinal biofilm

研究代表者

高後 裕 (Kohgo, Yutaka)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：10133183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトおよびマウス腸管を用いた腸内細菌叢の解析から、腸管内とバイオフィーム内の細菌ポピュレーションが異なること、健康人と炎症性腸疾患患者におけるバイオフィーム内の細菌ポピュレーションが異なることが示唆された。

宿主由来および腸内細菌由来活性物質の作用解析から、プロバイオティクス由来の腸管保護活性物質が、腸炎による腸管障害を改善することが明らかになった。また、この作用は上皮細胞膜トランスポーターによる細胞内への取り込みや上皮細胞接着分子との結合により仲介されることが明らかになった。以上の研究結果から、プロバイオティクス由来の活性物質を用いた新規腸炎治療開発の基盤的成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The present study identified the alterations in the microflora in the intestinal lumen and biofilms, and between healthy volunteers and IBD patients based on an analysis of human and mouse samples. This study showed that probiotics-derived effectors exhibited protective effects against intestinal injury due to intestinal inflammation. The functions were mediated by the interaction between the probiotic-derived effectors and transporters or adherent molecules. These results will be helpful for the development of a novel treatment for intestinal inflammations using probiotic-derived effectors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 腸内細菌 バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

自然免疫機構は、原生生物から哺乳動物にいたるまで種を超えて存在し、特に多様な微生物が共生する腸管組織において必須の生体防御機構である。我々はこれまでに、自然免疫機構の障害という視点から炎症性腸疾患の成因について解析し、クローン病患者において自然免疫反応のエフェクター分子であるパネート細胞由来 α -defensin の抗菌活性が著しく低下していることを突き止め、この活性障害は s-s 結合の欠如による構造異常に起因することを明らかにした(Tanabe H, 2007)。さらに、IBD 自然発症モデルである IL-10 欠損マウスにおいて α -defensin の発現が低下していること (Inaba, 2010)、 α -defensin が腸管上皮細胞からの IL-8 分泌を促し、獲得免疫系との相互作用に関係することを明らかにした (Isikawa, 2010)。一方、遺伝子多型の解析により Nod2 や TLR4 などの微生物認識関連分子の遺伝子異常に加え、MDR-1 や Novel organic cation transporters (OCTNs)などの細胞膜トランスポーターの遺伝子多型も IBD 患者で高率に検出されたが、IBD の病態との関係については不明であった。我々は、腸内に共生するバシラス菌から分泌された生理活性物質 (competence and sporulation factor; CSF) が、OCTN2 を介して上皮細胞に取り込まれることで認識され、腸管のホメオスタシス維持や細胞防御能の向上に寄与することを明らかにした(Fujiya M, 2007)。また、マウス小腸陰窩では TLR4 が欠損しているにもかかわらず、細菌膜抗原の暴露により抗菌ペプチドを分泌することを証明した (Tanabe H, 2005)。以上から、TLRs を介さない認識機構が、宿主および菌由来活性物質の作用メカニズムに関与していることを示した。

最近、腸内細菌は管腔内に流動的に生息する菌群と、粘膜上に形成されるバイオフィーム内に生息する菌群の、ふたつの異なる集団として存在することが示された(Xu J, PLoS Biol, 2007)(Ley R.E, Science, 2008)。前者は主に短鎖脂肪酸などの代謝物質の分解を行うのに対し、後者は粘膜関連細菌と呼ばれ、粘膜上に安定して存在し、腸管の免疫反応やホメオスタシス維持に関与していると考えられている。しかし、従来の便を用いた細菌叢の解析では、粘膜に定着したバイオフィーム内の環境を反映しないため、粘膜関連細菌の実態や疾患との関わりについて明らかにされていない。

2. 研究の目的

- (1) バイオフィーム内に生息する粘膜関連微生物のポピュレーションを解明する。
- (2) 抗菌物質などの宿主由来の活性物質および腸内細菌由来の活性物質の効果および作用機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) 健常人、IBD 患者、動物モデルにおける腸管バイオフィーム細菌叢を、16S rRNA based variable sequence tags 法を用いて定量的に解析する。

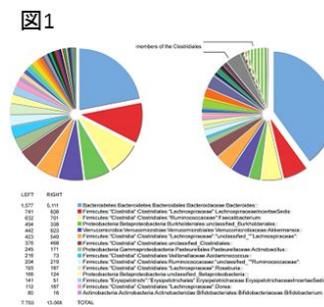
(2) 各種細胞膜分子欠損モデルおよび腸炎マウスモデルにおける、宿主由来および菌由来活性物質の効果と作用機序を検討する。

4. 研究成果

(1) バイオフィーム内に生息する粘膜関連微生物のポピュレーションを解明する。

無前処置下に内視鏡検査を行い、狙撃生検にて採取した組織を用いた。得られた組織は nonaqueous Carnoy solution により固定後に Hematoxiline & eosine 染色を行った。粘液層のすぐ管腔側にあるバイオフィームを同定し、Laser capture microscopy (LCM)を用いて、粘膜関連細菌群の DNA を抽出した。この DNA を 16S rRNA based variable

sequence tags 法を用いて定量的解析を行った。その結果、健常人と炎症性腸疾患患者では粘膜関連細菌のポピュレーションが異なることが明らかになった(図 1)。また、正常マウスにおいても同様の解析によりバイオフィーム内の粘膜関連細菌のポピュレーションを検討した。その結果、放線菌目やバークホルデリア目、バシラス目などの菌群が多数存在することが明らかになった。さらに、属レベルまでの解析を加えた結果、Propionibacterium 属や Corynebacterium 属、Staphylococcus 属などが多数を占めることが明らかになった(図 2、表 1)。



また、正常マウスにおいても同様の解析によりバイオフィーム内の粘膜関連細菌のポピュレーションを検討した。その結果、放線菌目やバークホルデリア目、バシラス目などの菌群が多数存在することが明らかになった。

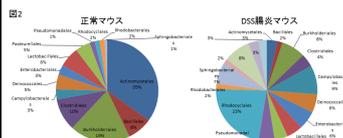


表1 正常マウス(バイオフィーム内)

normal mouse biofilm(目)	Normal mouse biofilm(属)
Actinomycetales 44	Achromobacter 2
Bacillales 10	Alcaligenes 2
Burkholderiales 24	Anaerococcus 9
Clostridiales 13	Arthrobacter 5
Campylobacteriales 4	Corynebacterium 11
Deinococcales 6	Diaphorobacter 7
Enterobacteriales 4	Delftia 7
Lactobacillales 8	Deinococcus 6
Pasteurellales 6	Escherichia coli 5
Pseudomonadales 2	Haemophilus 6
Rhodocyclales 2	Propionibacterium 27
Rhodobacteriales 2	Pseudomonas 2
Sphingobacteriales 1	Streptococcus 8
total 126	Serratia 10
	Staphylococcus 2
	Thauera 4
	unclassified Clostridiaceae 3
	total 114

さらに、腸炎マウスを用いて解析を行い、正常とは明らかに異なる粘膜関連細菌群が検出されており、腸管炎症病態への関与が示唆された。この研究成果から、腸管内とバイオフィーム内の細菌ポピュレーションが異なること、健常人と炎症性腸疾患患者におけるバイオフィーム内の細菌ポピュレーションが異なること、が示唆された。

(2) 抗菌物質などの宿主由来の活性物質および腸内細菌由来の活性物質の効果および

作用機序を解明する。

宿主由来の抗菌物質による腸管障害改善効果およびその作用機序

宿主由来の抗菌物質である α -defensin 5 の recombinant を作製し、腸炎モデルに投与した。その結果、recombinant α -defensin 5 を投与した群ではコントロール群に比べ、腸炎による腸管障害が有意に改善していた。また、致死性腸炎モデルにおいて、マウス生存期間が有意に延長した。以上から、

図3

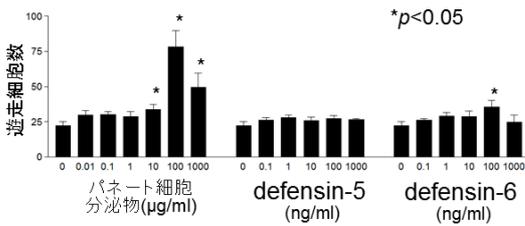
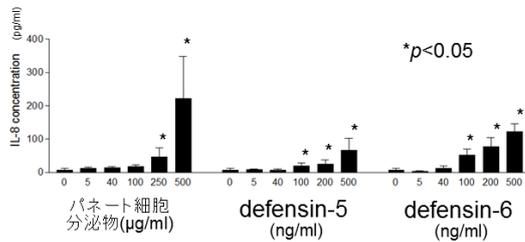


図4



recombinant α -defensin 5 には抗菌作用に加え、腸炎による腸管障害を改善する作用があると考えられた。また、 α -defensin 6 や defensin の産生細胞であるパネート細胞の分泌物には樹状細胞の遊走や腸管上皮細胞

図5

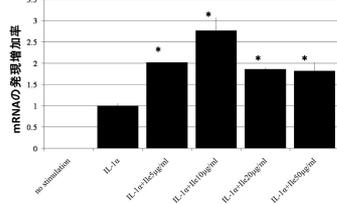
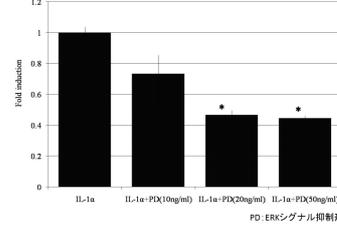


図6



添加すると α -defensin が誘導されること(図5)、この誘導は ERK シグナルの活性化を介して起こること(図6)も明らかにした。イソロイシンなどの中性アミノ酸は腸管上皮細胞膜トランスポーターのLAT2から取り込まれることが知られている。したがって、この輸送システムを介して腸管上皮内にイソロイシンが吸収されることにより、 α -defensin などの抗菌物質の産生が変化することが示唆される。

腸内細菌由来の抗菌物質による腸管障害改善効果およびその作用機序

腸内細菌の中でも宿主腸管に有益な作用を持つものはプロバイオティクスと呼ばれる。種々のプロバイオティクスは腸管障害改善効果を持つことが知られており、健康食品や薬剤への応用が試みられている。しかし、その作用機序については不明な点が多く、また、菌が分泌する腸管保護活性物質は同定されていなかった。我々は、プロバイオティクスの一種であるバシラス菌の培養上清から、菌由来の腸管保護活性物質である competence and sporulation factor (CSF)を初めて同定し、

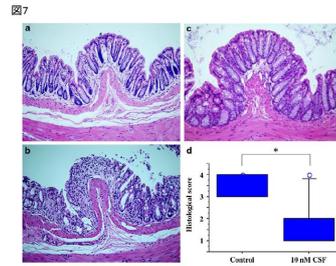


図7 a: 正常腸管 b: DSS誘発腸炎 (control) c: DSS誘発腸炎 + CSF注腸投与 d: DSS誘発腸炎 (control) 群とDSS誘発腸炎 + CSF注腸投与群との組織学的炎症スコアの比較

図8

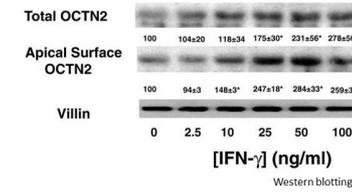


図9

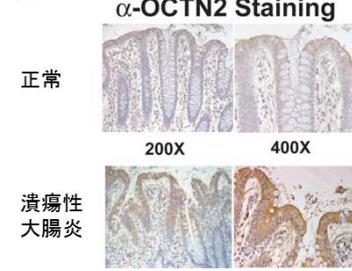
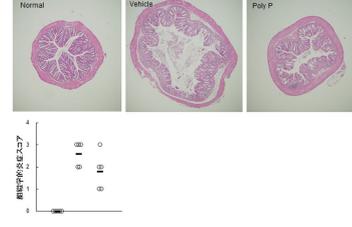


図10



以上から、バシラス菌由来の CSF は OCTN2 による細胞内輸送を介して、腸炎による腸管障害を改善することが明らかになった。また、新規麦芽乳酸菌の培養上清から菌由来の腸管保護活性物質であるポリリン酸を同定し、このポリリン酸には腸炎による腸管障害の改善効果があることを明らかにした(図10)。これらの研究成果から、プロバイオティクス由来の腸管保護活性物質を用いた新規腸炎治療開発の足がかりが得られた。これまでに、プロバイオティクス由来の腸管保護活性物

質を用いた治療薬は国内外を問わず開発されておらず、本研究成果は高い社会的インパクトを持つと考えられる。

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 63 件)

1. Ueno N, Hasebe T, Kaneko A, Yamamoto M, Wang Y, Fujiya M, Kohgo Y, Kono T, Musch MW, Chang EB. Daikenchuto, a Japanese traditional medicine, blocks DSS-induced intestinal inflammation and damage. *PloS One* (in press)
2. Sawada K, Ohtake T, Hasebe T, Abe M, Tanaka H, Ikuta K, Suzuki Y, Fujiya M, Hasebe C, Kohgo Y. Augmented hepatic Toll-like receptors by fatty acids trigger the pro-inflammatory state of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology Research* (in press)
3. Sakatani A, Fujiya M, Ito T, Inaba Y, Ueno N, Kashima S, Tominaga M, Moriichi K, Okamoto K, Tanabe H, Ikuta K, Ohtake T, Kono T, Furukawa H, Ashida T, Kohgo Y. Infliximab extends the duration until the first surgery in patients with Crohn's disease. *Biomed Research International* 2013:879491, 2013.
4. Nomura Y, Tanabe H, Moriichi K, Igawa S, Ando K, Ueno N, Kashima S, Tominaga M, Goto T, Inaba Y, Ito T, Ishida-Yamamoto A, Fujiya M, Kohgo Y. Reduction of E-cadherin by Human Defensin-5 in Esophageal Squamous Cells. *Biochem Bioph Res Co* 439(1):71-7, 2013.
5. Okamoto K, Fujiya M, Nata T, Ueno N, Inaba Y, Ishikawa C, Ito T, Moriichi K, Tanabe H, Mizukami Y, Chang EB, Kohgo Y. Competence and sporulation factor derived from Bacillus subtilis improves epithelial cell injury in intestinal inflammation via immunomodulation and cytoprotection. *Int J Colorectal Diseases* 27(8):1039-46, 2012.
6. Wakita Y, Shimizu C, Nakakita Y, Kaneda H, Kanda H, Segawa S, Shigyou T, Ohtake T, Fujiya M, Kohgo Y. Effect of Lactobacillus brevis SBC8803 on Gamma-Glutamyl Transferase in Japanese Habitual Drinkers: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Food and Nutrition Sciences* 3(5):678-684, 2012.
7. Konno Y, Ashida T, Inaba Y, Ito T, Tanabe H, Maemoto A, Ayabe T, Mizukami Y, Fujiya M, Kohgo Y. Isoleucine, an essential amino acid, induces the expression of human β defensin 2 through the activation of the G-protein coupled receptor-ERK pathway in the intestinal epithelia. *Food and Nutrition Sciences* 3(4):548-555, 2012.
8. Ito T, Ayabe T, Ishikawa C, Inaba Y, Tanabe H, Maemoto A, Kono T, Ashida T, Fujiya M, Kohgo Y. Paneth cell regulate gut inflammation, thereby inducing chemotaxis of dendritic cells and cytokine production from epithelial cells. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 227(1):39-48, 2012.
9. Ueno N, Fujiya M, Segawa S, Nata T, Moriichi K, Tanabe H, Mizukami Y, Kobayashi N, Ito K, Kohgo Y. Heat-killed body of Lactobacillus brevis SBC8803 ameliorates intestinal injury in a murine model of colitis by enhancing the intestinal barrier function. *Inflammatory Bowel Diseases* 17(11):2235-50, 2011.
10. Segawa S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Kobayashi N, Shigyo T, Kohgo Y. Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway. *PloS One* 6 (8): e23278, 2011.

11. Fujiya M, Inaba Y, Musch MW, Hu S, Kohgo Y, Chang EB. Cytokine Regulation of OCTN2 Expression and Activity in Small and Large Intestine. *Inflammatory Bowel Diseases* 17(4):907-16, 2011.
12. Inaba Y, Ashida T, Ito T, Ishikawa C, Tanabe H, Maemoto A, Watari J, Ayabe T, Mizukami Y, Fujiya M, Kohgo Y. The expression of the anti-microbial peptide α -defensin/cryptdins in intestinal crypts decreases at the initial phase of intestinal inflammation in a model of inflammatory bowel disease, IL-10 deficient mice. *Inflammatory Bowel Diseases* 16(9): 1488-95, 2010.

その他

[学会発表](計40件)

1. Ueno N, Fujiya M, Segawa S, Konishi H, Sakatani A, Tanaka K, Dokoshi T, Ando K, Kashima S, Inaba Y, Ito T, Moriichi K, Shigyo T, Kohgo Y. Long-term oral dietary administration of a new probiotic, *Lactobacillus brevis* SBC8803, alters gut the microbiota and ameliorates DSS-induced colitis in mice. DDW 2014 (AGA), Chicago 2014.05.06.
2. Sakatani A, Fujiya M, Konishi H, Segawa S, Kashima S, Ueno N, Tanaka K, Dokoshi T, Ando K, Tominaga M, Inaba Y, Ito T, Tanabe H, Moriichi K, Kohgo Y. Probiotic-derived polyphosphate inhibits colon cancer progression through the inactivation of the ERK pathway and the induction of cancer cell apoptosis. DDW 2013 (AGA), Orland 2013.05.21.
3. Konishi H, Fujiya M, Segawa S, Kashima S, Ueno N, Tanaka K, Sakatani A, Dokoshi T, Ando K, Tominaga M, Inaba Y, Ito T, Tanabe H, Moriichi K, Kohgo Y. A probiotic-derived polyphosphate improves chronic inflammation and fibrosis via caveolin-dependent endocytosis. DDW 2013 (AGA), Orland 2013.05.21.
4. Fujiya M, Ueno N, Sakatani A, Dokoshi T, Ando K, Nomura Y, Kashima S, Tominaga M, Inaba Y, Ito T, Moriichi K, Kikuchi Y, Okamoto K, Tanabe H, Segawa S, Kobayashi N, Shigyo T, Kohgo Y. Polyphosphate is a novel active molecule derived from *Lactobacillus brevis* that contributes to the maintenance of intestinal homeostasis and the improvement of intestinal injury in acute and chronic experimental colitis. DDW 2012 (AGA), San Diego 2012.05.20.
5. Inaba Y, Fujiya M, Musch MW, Boone D, Kohgo Y, Chang EB. Activation of Intestinal Epithelial Autophagy as a Potential and Novel Mechanism of Probiotic Action in the Gut. 7th Congress of ECCO, Barcelona 2012.02.16.
6. Segawa S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Kobayashi N, Shigyo T, Kohgo Y. *Lactobacillus brevis* Culture Supernatant Induces Cytoprotective Small Heat Shock Protein HSP27 and Increase Intestinal Barrier Function by Activating the p38 MAPK Pathway. 15th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2011), Paris 2011.07.05.
7. Inaba Y, Fujiya M, Musch MW, Boone DL, Kohgo Y, Chang EB. Activation of Intestinal Epithelial Autophagy as a Potential and Novel Mechanism of Probiotic Action in the Gut. DDW 2011 (AGA), Chicago 2011.05.10.
8. Okamoto K, Fujiya M, Nata T, Ueno N, Inaba Y, Ishikawa C, Ito T, Moriichi K, Tanabe H, Mizukami Y, Chang EB, Kohgo Y. Competence and Sporulation Factor

Derived From Bacillus Subtilis Improves Epithelial Cell Injury in Intestinal Inflammation via Immunomodulation and Cytoprotection. DDW 2010 (AGA), New Orleans 2010.05.05.

9. Segawa S, Fujiya M, Ueno N, Kobayashi N, Ito K, Kohgo Y. Lactobacillus Brevis SBC8803 Culture Supernatant Induces Cytoprotective Small Heat Shock Protein HSP27 in Human Intestinal Epithelial CaCo2/Bbe Cells by activating the p38 MAPK Pathway and Alleviates DSS-Induced Acute Colitis in C57BL/6 Mice. DDW 2010 (AGA), New Orleans 2010.05.04.
10. Ueno N, Fujiya M, Segawa S, Nata T, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Mizukami Y, Kobayashi N, Ito K, Kohgo Y. Heat-Killed Body of Lactobacillus brevis SBC8803 Contributes to Maintain Intestinal Homeostasis and Improve Intestinal Injury in a Murine Model of Colitis. DDW 2010 (AGA), New Orleans 2010.05.04.

その他

〔図書〕(計1件)

1. Tanabe H, Fujiya M, Kohgo Y. Trypsin acts as an activating enzyme in gut innate immunity, *Trypsin: Structure, Biosynthesis and Functions* Trypsin: Structure, Biosynthesis and Functions, edited by Kirk Weaver and Clayton Kelly. Hauppauge (NY): Nova Science Publishers Inc., 2012, 133-139. (ISBN 978-1-61942-319-0)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：腸管保護剤
発明者：高後 裕，藤谷幹浩，上野伸展，瀬川修一，小林直之
権利者：旭川医科大学
種類：特許
番号：PCT/JP2011/057689

出願年月日：2011年3月28日
国内外の別：国外

取得状況(計2件)

名称：消化器癌に対する抗腫瘍剤
発明者：高後 裕、藤谷幹浩，岡本耕太郎
権利者：旭川医科大学
種類：特許
番号：特許第5190849号
取得年月日：2013年2月8日
国内外の別：国内

名称：腸管保護剤
発明者：高後 裕，藤谷幹浩，上野伸展，瀬川修一，小林直之
権利者：旭川医科大学
種類：特許
番号：特許第5526320号
取得年月日：2014年4月15日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高後 裕 (KOHGO, Yutaka)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：10133183

(2) 研究分担者

蘆田知史 (ASHIDA Toshifumi)
旭川医科大学・医学部・客員教授
研究者番号：50261409

藤谷幹浩 (FUJIYA Mikihiro)
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80322915

大竹孝明 (Ohtake Takaaki)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：10359490

前本篤男 (Maemoto Atsuo)
旭川医科大学・医学部・客員教授
研究者番号：40400113

上野伸展 (Ueno Nobuhiro)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：30436000