

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659060

研究課題名(和文) 乳酸菌のゲノムDNAを利用した抗炎症薬の開発

研究課題名(英文) Development of anti-inflammatory drugs based on genomic DNA of lactic acid bacteria

研究代表者

鹿志毛 信広 (KASHIGE, Nobuhiro)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：80185751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：抗炎症薬であるNSAIDsの長期服用による慢性炎症の抑制は、がんの予防・治療につながる。しかし、NSAIDsの長期服用は胃腸障害を誘発する。本研究では、抗炎症作用を持つ乳酸菌に着目し、腸管以外の組織でも使用できる抗炎症薬の創出を目指し、乳酸菌の抗炎症成分であるゲノムDNAに着目した。そして、乳酸菌のゲノムDNAがヒト腸管上皮細胞の中に侵入すること、細菌のゲノムDNAを特異的に認識する受容体toll-like receptor 9を介して抗炎症作用を示すことを明らかにした。このメカニズムはNSAIDsとは異なるため、乳酸菌のゲノムDNAは長期服用が可能な新しい抗炎症薬になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The inhibition of chronic inflammation by long-term use of NSAIDs, an anti-inflammatory drug, leads to the prevention and treatment of cancer. However, NSAIDs induce gastrointestinal side effects. We therefore investigated genomic DNA, which is one of the anti-inflammatory components of lactic acid bacteria (LAB). The use of component allows the application of LAB for systemic tissues except for intestine. The present study showed that genomic DNA of LAB is taken up into Caco-2 cells, and toll-like receptor 9, a specific receptor of bacterial DNA, is one of the major pathways for the anti-inflammatory effects by genomic DNA of LAB. Since the mechanisms of anti-inflammatory effects differ between genomic DNA of LAB and NSAIDs, long-term use of genomic DNA of LAB may lead to the prevention and treatment of cancer without side effects.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：乳酸菌 ゲノムDNA 抗炎症作用 toll-like receptor 9 NF- $\kappa$ B オリゴデオキシヌクレオチド

## 1. 研究開始当初の背景

非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) の長期服用は、がんの発症および進行を抑制する。これは、がんの原因の一つである慢性炎症が、NSAIDs により抑制されることに起因する (Grivennikov *et al*, Cell 2010)。しかし、NSAIDs の長期服用は胃腸障害などの副作用を誘発するため、がんを予防・治療するために NSAIDs を使用することは難しい。したがって、副作用が少なく、長期服用が可能な抗炎症薬の創出が望まれている。

研究代表者は、上記の問題を解決すべく、乳酸菌が持つ抗炎症作用に注目した。乳酸菌の抗炎症作用については多くの研究により報告されている。また、食品や医薬品として広く利用される乳酸菌は副作用なく、長期服用することが可能である。しかし、乳酸菌の抗炎症作用は腸管に限定的なものであるため、腸管以外で発生する慢性炎症を抑えることができない。そこで、研究代表者は、乳酸菌に含まれる抗炎症成分を特定することで、この問題を解決することができると考えた。抗炎症成分を利用することで、腸管から吸収され、全身に分布することが可能となる。

一方、乳酸菌は免疫活性化作用を持つことも報告されており、その作用には、乳酸菌に含まれるゲノム DNA が重要な役割を果たすことが明らかになっている (Iliev *et al*, Cell Microbiol 2005)。よって、本研究では、ゲノム DNA が乳酸菌の作用を決定する主要な成分であると予想し、乳酸菌に含まれる抗炎症成分として、ゲノム DNA に着目した。

以上のことから、本研究では、乳酸菌のゲノム DNA の抗炎症作用を評価し、さらに、そのメカニズムを解析することを試みた。これまで使用されてきた抗炎症薬である NSAIDs とは異なるメカニズムで抗炎症作用を示すことを明らかにすることで、乳酸菌のゲノム DNA が、副作用が少なく長期服用が可能な抗炎症薬となることを実証することができる。

## 2. 研究の目的

生菌の乳酸菌の抗炎症作用は、菌種により異なることが報告されている (Grimoud *et al*, Int J Food Microbiol 2010)。そこで、本研究では、5 種類の *Lactobacillus* 属乳酸菌 (*L. acidophilus*; La, *L. casei*; Lc, *L. gasseri*; Lg, *L. plantarum*; Lp, *L. reuteri*; Lr) のゲノム DNA を用いて、抗炎症作用を比較した。抗炎症作用は、 $H_2O_2$  により炎症を誘発させたヒト腸管上皮由来 Caco-2 細胞を用いて、炎症の指標である interleukin (IL)-8 の遊離量を測定することで評価した。次に、乳酸菌のゲノム DNA が持つ抗炎症作用のメカニズムを解析するために、細菌の DNA を特異的に認識する受容体 toll-like receptor (TLR)9 と炎症誘発因子の発現を制御する I  $\kappa$ B- /NF- $\kappa$ B システムに着目した。

一方、乳酸菌のゲノム DNA は、分子量が大きい、合成できないなどの点が医薬品として

製造する際の問題点となる可能性がある。そこで、本研究では、乳酸菌のゲノム DNA 内に含まれる抗炎症作用を持つ配列 (オリゴデオキシヌクレオチド:ODN) を特定することで、抗炎症薬の低分子化を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 乳酸菌のゲノム DNA の抗炎症作用の比較

Caco-2 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well で 24-well プレートに播種し、 $H_2O_2$  (1mM) および 5 種類の *Lactobacillus* 属のゲノム DNA (3、10、30  $\mu$ g/ml) を添加した。また、ネガティブコントロールとして、大腸菌 (*Escherichia coli*; Ec) のゲノム DNA を使用した。48 時間後、培養上清を回収し、ELISA を用いて、IL-8 の遊離量を測定した。

### (2) 乳酸菌のゲノム DNA の抗炎症作用メカニズムの解明

乳酸菌のゲノム DNA の Caco-2 細胞への侵入作用

乳酸菌のゲノム DNA が細胞内に局在する TLR9 に認識されるためには、Caco-2 細胞内に侵入する必要がある。そこで、*Lactobacillus* 属および Ec のゲノム DNA の Caco-2 細胞内への侵入作用を検討した。

具体的には、Caco-2 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well で 24-well プレートに播種し、 $H_2O_2$  (1mM) の存在下および非存在下で、5 種類の *Lactobacillus* 属と Ec のゲノム DNA (30  $\mu$ g/ml) を 0.2、0.5、1、3、6、9、12、18、24 時間添加した。そして、Caco-2 細胞の DNA を抽出し、各 *Lactobacillus* 属および Ec の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーを用いて、ネステッド PCR を行った。そして、それぞれの PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分離し、16S rRNA 遺伝子の存在を確認した。

### I $\kappa$ B- /NF- $\kappa$ B システムの関与

転写因子である NF- $\kappa$ B は、通常、I  $\kappa$ B- と複合体を形成し、細胞質内に局在する。一方、細胞が炎症性のシグナルを感知すると、I  $\kappa$ B- は分解され、遊離の状態となった NF- $\kappa$ B が細胞質内に侵入し、炎症性サイトカインなどの炎症誘発因子のプロモーター領域に結合し、それらの遺伝子の mRNA 転写量を増加させる。そこで、本研究では、細胞質内および核内の I  $\kappa$ B- と NF- $\kappa$ B の発現量を測定し、I  $\kappa$ B- の分解と NF- $\kappa$ B の核内移行を評価した。

具体的には、Caco-2 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well で 24-well プレートに播種し、 $H_2O_2$  (1mM) および 5 種類の *Lactobacillus* 属のゲノム DNA (30  $\mu$ g/ml) を 1、3、6、9、12、18、24 時間添加した。そして、Caco-2 細胞の細胞質内および核内のタンパク質を抽出した。抗 I  $\kappa$ B- 抗体および抗 NF- $\kappa$ B 抗体を用いたウエスタンブロットにより、細胞質内・核内タンパク質抽出物における I  $\kappa$ B- および NF- $\kappa$ B の発現量を測定した。

## TLR9 の関与

2 × 10<sup>5</sup> cells/well で 24-well プレートに播種した Caco-2 細胞に TLR9 の発現を特異的に抑制する siRNA (TLR9-siRNA) とトランスフェクション試薬 (siLentFect Lipid Reagent, Bio-Rad) を添加した。TLR9 の発現抑制は、抗 TLR9 抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した。また、ネガティブコントロールとして、TLR9 の発現を抑制しない scramble TLR9-siRNA を添加した Caco-2 細胞も作製した。これらの細胞に対し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) および 5 種類の *Lactobacillus* 属のゲノム DNA (30 μg/ml) を 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48 時間添加した。48 時間後の Caco-2 細胞の培養上清を回収し、ELISA を用いて、IL-8 の遊離量を測定した。また、1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 時間後の Caco-2 細胞の細胞質内および核内タンパク質を抽出し、ウエスタンブロットにより I B- および NF- B の発現量を測定した。

### (3) 抗炎症作用を持つ ODN の特定

*L. casei* のゲノム DNA を 4 塩基認識酵素 *Sau3AI* により切断し、プラスミド pUC19 の *BamHI* サイトに挿入した。このプラスミドを大腸菌 DH5 に形質転換し、100 個のクローンをランダムに選択した。それぞれのクローンからプラスミドを抽出後、2 × 10<sup>5</sup> cells/well で 24-well プレートに播種した Caco-2 細胞に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) の存在下、10 μg/ml の濃度で添加した。48 時間後、培養上清を回収し、ELISA により、IL-8 の遊離量を測定した。そして、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による IL-8 の遊離を抑制したプラスミドに含まれる *L. casei* のゲノム DNA 由来配列を決定し、その中に高頻度に含まれる配列を抗炎症作用を持つ ODN の候補とした。これらの候補を合成し、2 × 10<sup>5</sup> cells/well で 24-well プレートに播種した Caco-2 細胞に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) の存在下、30 μM の濃度で添加した。48 時間後、培養上清を回収し、ELISA により、IL-8 の遊離量を測定し、抗炎症作用を持つ ODN を決定した。

## 4. 研究成果

### (1) 乳酸菌のゲノム DNA の抗炎症作用の比較

強い抗炎症作用を示す乳酸菌のゲノム DNA を特定するために、5 種類の *Lactobacillus* 属のゲノム DNA の抗炎症作用を比較した。その結果、すべての *Lactobacillus* 属のゲノム DNA が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による IL-8 の遊離を抑制した (図 1)。この作用は *Ec* のゲノム DNA には見られなかったことから、ゲノム DNA の抗炎症作用は乳酸菌に特異的なものであると考えられる。次に、3、10 μg/ml のゲノム DNA の作用を検討した結果、5 種類の *Lactobacillus* 属のゲノム DNA は濃度依存的に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による IL-8 の遊離を抑制した。また、*La* のゲノム DNA の IL-8 遊離抑制作用は、他の 4 種類の *Lactobacillus* 属より弱いことが明らかとなった。この結果より、生菌と同様に、乳酸菌のゲノム DNA の抗炎症作用の強さは菌種によ

り異なることが示唆された。また、*Lc*、*Lg*、*Lp*、*Lr* のゲノム DNA が新たな抗炎症薬となる可能性を見出した。

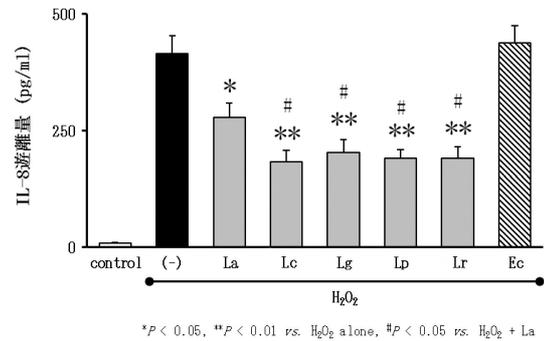


図 1. 5 種類の乳酸菌の IL-8 遊離抑制作用の比較

### (2) 乳酸菌のゲノム DNA の抗炎症作用メカニズムの解明

乳酸菌のゲノム DNA の Caco-2 細胞への侵入作用

5 種類の *Lactobacillus* 属および *Ec* のゲノム DNA は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の存在下、添加 0.5、1、3、6、9、12 時間後に Caco-2 細胞内へ侵入することが明らかになった (図 2)。一方、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の非存在下では、すべてのゲノム DNA において、Caco-2 細胞内への侵入は見られなかった。これらの結果は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加し炎症を誘発させたときのみ、ゲノム DNA は細胞内に侵入することを示唆している。

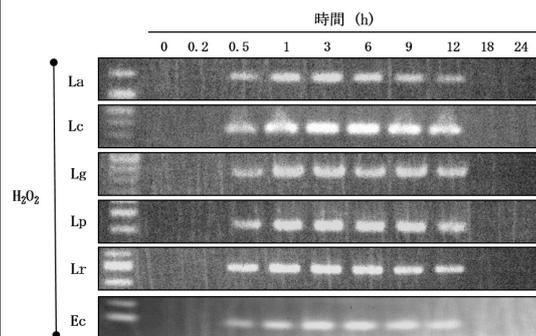


図 2. 乳酸菌の細胞内侵入作用

### I B- /NF- B システムの関与

I B- と NF- B は、通常の Caco-2 細胞では、恒常的に細胞質内に発現していた。一方、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加した細胞では、I B- の細胞質内における発現量が添加 1 時間後より減少し、6 時間後には完全に消失した。NF- B の細胞質内から核内への移行は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の添加 1 時間後から始まり、6 時間後に最大となった。一方、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と同時に 5 種類の *Lactobacillus* 属のゲノム DNA を添加した Caco-2 細胞では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による I B- の分解が抑制され、NF- B の核内移行が遅延および抑制されることが明らかとなった (図 3、図 4)。

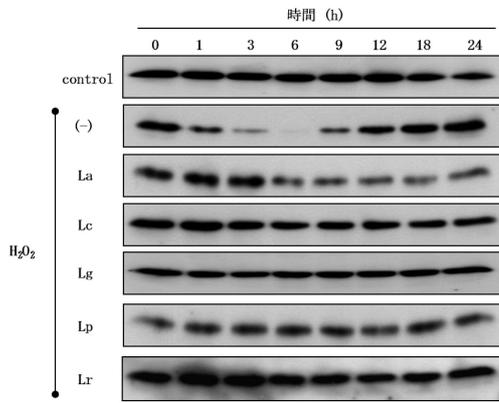


図3. 細胞質内における IκB-α の発現量

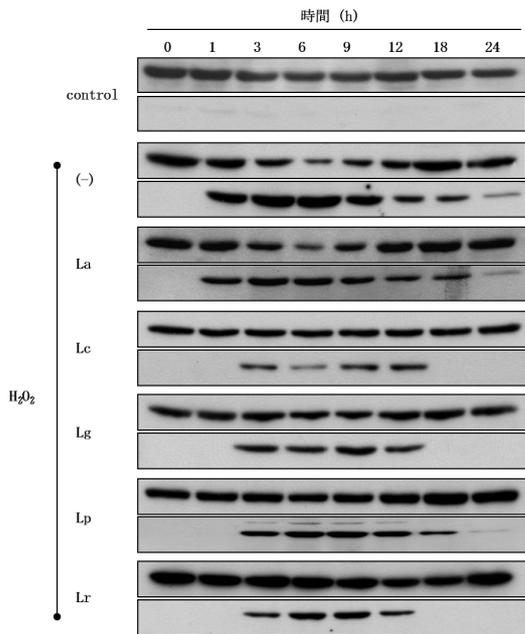


図4. 細胞質内(上段)および核内(下段)における NF-κB の発現量

#### TLR9 の関与

抗 TLR9 抗体を用いたウエスタンブロットにより、TLR9-siRNA の添加による TLR9 の発現抑制を確認した。次に、TLR9 の発現を抑制した Caco-2 細胞を用いて、5 種類の *Lactobacillus* 属のゲノム DNA の IL-8 遊離抑制作用を評価した。その結果、siRNA を添加していない細胞と scramble TLR9-siRNA をトランスフェクションした細胞では、すべてのゲノム DNA が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による IL-8 の遊離を抑制した。一方、TLR9-siRNA をトランスフェクションした細胞では、乳酸菌のゲノム DNA は IL-8 の遊離に影響を与えなかった(図4)。この結果より、乳酸菌のゲノム DNA の IL-8 遊離抑制作用は、TLR9 の発現抑制により完全に消失することが明らかとなった。さらに、TLR9 の発現を抑制した Caco-2 細胞では、5 種類の *Lactobacillus* 属のゲノム DNA による IκB-α 分解および NF-κB 核内移行に対する抑制作用も完全に消失していた。

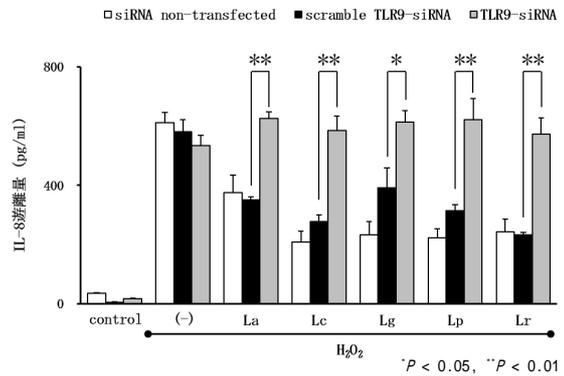


図5. TLR9 の発現抑制が乳酸菌のゲノム DNA の IL-8 遊離抑制作用に与える影響

以上の結果から、乳酸菌のゲノム DNA は、炎症誘発時のみに上皮細胞内に侵入し、TLR9 を介して IκB-α の分解および NF-κB の核内移行を抑制し、IL-8 の遊離を抑制することが明らかとなった(図6)。これまで使用されてきた抗炎症薬 NSAIDs は、非炎症組織にも作用し胃腸障害などの副作用を示すことから、乳酸菌のゲノム DNA は、NSAIDs とは異なるメカニズムで抗炎症作用を示すと考えられる。

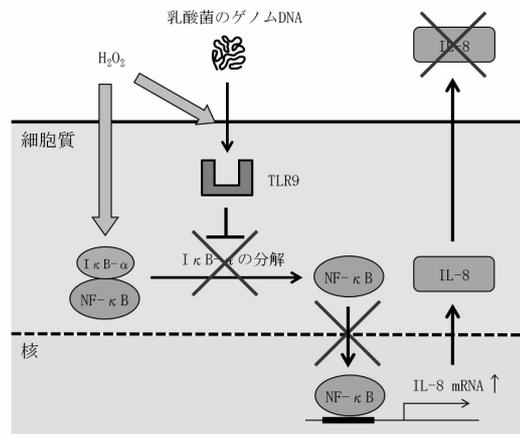


図6. 乳酸菌のゲノム DNA の抗炎症作用メカニズム

#### (3) 抗炎症作用を持つ ODN の特定

*L. casei* のゲノム DNA 由来配列を含む 100 個のプラスミドの IL-8 遊離抑制作用を評価した結果、24 個のプラスミドが H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による IL-8 の遊離を抑制した。そして、これらのプラスミドに含まれる *L. casei* のゲノム DNA 由来配列を決定し、抗炎症作用を持つ DNA 断片として DDBJ に登録した (Accession numbers: AB78086-AB780887)。これらの配列には、8 塩基からなる 9 種類の配列が高頻度に存在していた。この 9 種類の配列の Sense 鎖および Anti-sense 鎖を合成し (1F-9R)、抗炎症作用を持つ ODN の候補とした(表1)。次に、これらの 18 種類の ODN の IL-8 遊離抑制作用を評価した結果、14 種類の ODN (3F-9R) が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による IL-8 の遊離を抑制した(図7)。特に、7F が最も強く H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による IL-8 の遊離を抑制した。また、抗炎症作用を持つ ODN の

*L. casei* のゲノム DNA 内に含まれる頻度を算出した結果、7F と 7R が最も高頻度に含まれていた (128 個/10<sup>6</sup> bp)。本結果より、8 塩基からなる低分子の ODN が新たな抗炎症薬となる可能性を見出した。

表 1. 抗炎症作用を持つ ODN の候補

Sense		Anti-sense	
No.	Sequence (5' 3')	No.	Sequence (5' 3')
1F	CAAACTA	1R	TAGTTTTG
2F	GATGGTCA	2R	TGACCATC
3F	TGGCTGTT	3R	AACAGCCA
4F	TTGCCGCA	4R	TGCGGCAA
5F	GATTATCG	5R	CGATAATC
6F	CGCCATTT	6R	AAATGGCG
7F	TTTGCCG	7R	CGGCAAAA
8F	TTGTCACC	8R	GGTGACAA
9F	CATCAAAG	9R	CTTTGATG

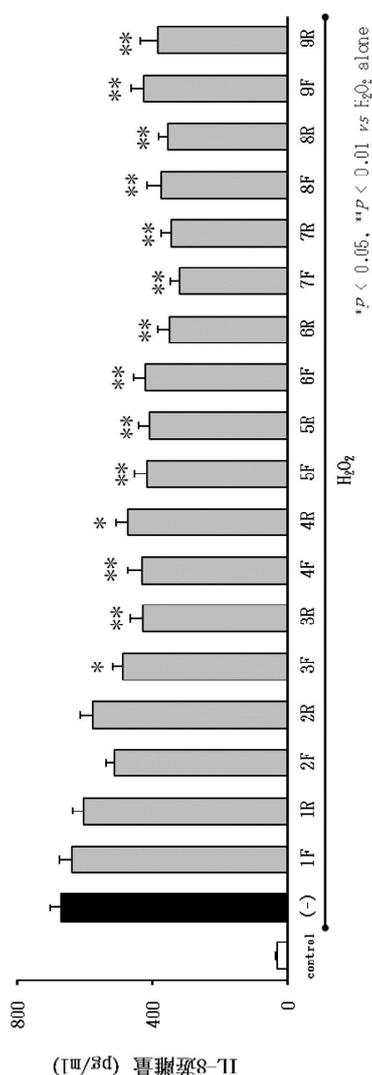


図 7. ODN の IL-8 遊離抑制作用

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 3 件)

Yukihiro Hiramatsu, Masatatsu Yamamoto, Tomomitsu Satho, Keiichi Irie, Akiko Kai, Saori Uyeda, Yuki Fukumitsu, Akihisa Toda, Takeshi Miyata, Fumio Miake, Takeshi Arakawa, Nobuhiro Kashige. Recombinant fusion protein of cholera toxin B subunit with YVAD secreted by *Lactobacillus casei* inhibits lipopolysaccharide-induced caspase-1 activation and subsequent IL-1 beta secretion in Caco-2 cells. *BMC Biotechnology*. (In press)  
 Takahiro Okuno, Nobuhiro Kashige, Tomomitsu Satho, Keiichi Irie, Yukihiro Hiramatsu, Tanjina Sharmin, Yuki Fukimits, Saori Uyeda, Seitaro Yamada, Tetsuya Harakuni, Takeshi Miyata, Takeshi Arakawa, Masumi Imoto, Akihisa Toda, Yukihiro Nakashima, Fumio Miake. Expression and secretion of cholera toxin B subunit in lactobacilli. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 36(6):952-958 (2013), 査読有  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/36/6/36\\_b12-01021/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/36/6/36_b12-01021/_article)  
 Yukihiro Hiramatsu, Tomomitsu Satho, Keiichi Irie, Shota Shiimura, Takahiro Okuno, Tanjina Sharmin, Yuki Fukumitsu, Saori Uyeda, Yukihiro Nakashima, Fumio Miake, Nobuhiro Kashige. Differences in TLR9-dependent inhibitory effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced IL-8 secretion and NF-kappa B/I kappa B-alpha system activation by genomic DNA from five *Lactobacillus* species. *Microbes and Infection*. 15(2):96-104 (2013), 査読有  
 DOI:10.1016/j.micinf.2012.11.003

[学会発表](計 8 件)

平松征洋、佐藤朝光、入江圭一、百武美香、見明史雄、鹿志毛信広、乳酸菌由来 DNA の腸管における抗炎症作用、第 30 回日本薬学会九州支部大会、2013 年 12 月 7 日、長崎国際大学  
 江川さおり、百武美香、中村智美、平松征洋、上田紗織、入江圭一、佐藤朝光、中島幸彦、三島健一、鹿志毛信広、見明史雄、マウスにおける DSS 誘導性大腸炎の病態と TREM-1/TREM-2 の発現量比の一致、第 86 回日本生化学会、2013 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜

Yukihiro Hiramatsu, Tomomitsu Satho, Keiichi Irie, Shota Shiimura, Yukihiro Nakashima, Fumio Miake, Nick Carpino, Nobuhiro Kashige.

Oligodeoxynucleotide 5'- TTTTGCCG- 3' inhibits intestinal inflammation, World Biotechnology Congress (WBC)

2013, 2013年6月4日, Boston, USA

百武美香、田村幸恵、江川さおり、入江圭一、佐藤朝光、平松征洋、上田紗織、

福光由起、中島幸彦、三島健一、藤原道弘、鹿志毛信広、見明史雄、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)投与により発症するマウス大腸炎の病態に関する性差、日本薬学会 第133年会、2013年3月28日、パシフィコ横浜

平松征洋、佐藤朝光、入江圭一、椎村翔太、中島幸彦、見明史雄、鹿志毛信広、

*Lactobacillus casei* のゲノム DNA に含まれる抗炎症作用を持つオリゴデオキシヌクレオチドの特定と作用機構の解明、日本農芸化学会 2013年度大会、2013年3月25日、東北大学

椎村翔太、平松征洋、佐藤朝光、入江圭一、

宇高彩奈、上田紗織、中島幸彦、鹿志毛信広、見明史雄、

乳酸菌ゲノム DNA 由来の抗炎症作用を持つオリゴデオキシヌクレオチドの特定、第29回日本薬学会九州支部大会、2012年12月8日、熊本大学

宇高彩奈、平松征洋、佐藤朝光、椎村翔太、入江圭一、古川歩、三島健一、藤原道弘、中島幸彦、鹿志毛信広、見明史雄、

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞における炎症誘発時の Progranulin 発現と分泌、第29回日本薬学会九州支部大会、2012年12月8日、熊本大学

平松征洋、佐藤朝光、入江圭一、椎村翔太、中島幸彦、見明史雄、鹿志毛信広、5

種類の *Lactobacillus* 属乳酸菌由来ゲノム DNA の抗炎症作用機構に関する研究、第16回腸内細菌学会、2012年6月14日、神戸市産業振興センター

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.fukuoka-u.ac.jp/user/microbiology/web/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鹿志毛信広 (KASHIGE, Nobuhiro)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：80185751

### (2) 研究分担者

佐藤朝光 (SATHO, Tomomitsu)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：90369025

入江圭一 (IRIE, Keiichi)

福岡大学・加齢脳科学研究所・研究員

研究者番号 50509669

(削除：平成25年4月20日)

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

平松征洋 (HIRAMATSU, Yukihiro)

福岡大学大学院・薬学研究科・大学院生