

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659350

研究課題名(和文) ストレスは如何にして宿主の易感染性を惹起するか？

研究課題名(英文) How does stressor make the hosts susceptible to bacterial infection?

研究代表者

須藤 信行 (Sudo, Nobuyuki)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60304812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：カテコラミンを介した“Interkingdom signaling”は、腸管内で恒常的に行われていると推定されるが、これまでin vivoで明確に証明した報告はなかった。その最大の理由は、多数の夾雑物の影響で腸管腔内のカテコラミン測定が技術的に困難であることによる。

本研究によって、1. 腸管腔内にはカテコラミンが存在しており、2. その生成には腸内細菌由来のbeta-glucuronidase による脱包合が関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： There is increasing interest in the bidirectional communication between the mammalian host and prokaryotic cells, called interkingdom signaling. Catecholamines (CA), candidate molecules for such communication, are presumed to play an important role in the gut lumen; however, available evidence is extremely limited because of the lack of actual data about luminal CA. This study evaluated luminal CA levels in the gastrointestinal tract, and elucidated the involvement of gut microbiota in the generation of luminal CA by comparing the findings among specific pathogen free (SPF) mice, germfree mice and gnotobiotic mice.

As a result, substantial levels of free dopamine and norepinephrine were identified in the gut lumen of the SPF mice. A series of experiments using gnotobiotic mice showed bacterial beta-glucuronidase plays a critical role in the generation of free luminal CA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般

キーワード：腸内細菌 カテコラミン 腸管 ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

“ストレス過多の環境下におかれた個体は感染症に罹りやすい”という事実は、様々な動物種において報告されている。ヒトにおいては、癌などの悪性消耗性疾患などの末期に、腸管管腔内に棲息する菌が、腸管を通過し血液中に侵入することで、しばしば菌血症や敗血症などを続発することが知られている(日和見感染・内因性感染)。また畜産分野においてもその影響は甚大であり、家畜のストレスを軽減し快適な環境下で飼育できるかは、畜産業そのものの成功の鍵を握っていると言っても過言ではない。従来、ストレス環境下における感染症誘発のメカニズムとしては、ストレスによる宿主の免疫機能低下が関連していると推定されているが、詳細な病態機序については不明の点も少なくない。

最近、細菌学の分野では、宿主と細菌との相互作用(情報交換)、いわゆる“インターキングダム・シグナリング(Inter-kingdom signaling: IKS)”(Nat Rev Microbiol 6;111-20, 2008)の存在が発見され、研究者の注目を集めている。IKSとは、本来は細菌間の情報伝達に使われていた物質が、「界(kingdom)」を越えてその宿主へ作用し、逆に宿主由来の物質が細菌へ作用しその性質を変化させるという原生生物界(細菌界)と動物界との間の双方向的な情報伝達を指す概念である。代表的ストレス関連ホルモンであるカテコラミン(catechoamine: CA)は、その情報伝達を仲介する分子の一つと考えられており、カテコラミンを介したIKSは、腸管管腔内で恒常的に行われていると推定されるが、これまでin vivoで明確に証明した報告はなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、腸管管腔内におけるカテコラミンの生成機構を明らかにし、その生成過程における腸内細菌の役割について検討する

ことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) マウス

実験には7-8週齢のオスBALB/cマウスを用いた。GFマウスおよび人工菌叢マウスは、Trexler-type flexible-film plastic isolators内で維持・飼育した。各単一細菌マウスは、同一の“grandparents”より出生した母マウスへ、それぞれの細菌( $10^9$  CFU)を経口的に投与して作成した。実験にはその母マウスから出生したマウスを用いた。EX-GFマウスも同様に、GFの母マウスへ1/100に希釈したSPFマウスの糞便0.5mlを経口投与して作成した。腸管内CAに関する実験には $\beta$ -glucuronidase (GUS)を欠損した大腸菌(JW1609)とその親株(BW25113)からなる単一細菌マウスを用いた。

### 2) 腸管管腔内CAの測定法

マウスを頸椎脱臼にて安楽死させ、回腸、盲腸、大腸を摘出した。摘出した腸管を腸管壁と内容物に分けた。腸管内容物および腸管壁のCAは、ジフェニルエチレンジアミンを用いた高速液体クロマトグラフィー法にて測定した。

### 3) 抱合型CAの測定法

まずHPLC測定用に調整されたサンプルを3つに分け、(a)遊離型、(b)グルクロン酸抱合型、(c)硫酸抱合型の測定に用いた。(b)のサンプルにはGUSを添加しpH6.8に調整した後、1時間培養した。(c)のサンプルにはsulphataseを添加しpH7.0に調整した後、同じく1時間培養した。(a)には酵素を添加せず、1時間培養した。反応終了後、過塩素酸を添加し、それぞれのサンプル中のCA濃度をHPLCにて測定した。サンプル中のグルクロン酸抱合型CA濃度は、(a)と(b)の差により算出した。同様に硫酸抱合型CA濃度は、(a)

と(c)の差により算出した。

#### 4) GUS 活性の測定法

GUS 活性は以下のように測定した。腸管内容物に 1 ml PBS を添加し、超音波破碎を行った。遠心分離後に得られた上清のタンパク量を測定。次に上清に 0.01 M phenolphthalein glucuronide を含む反応液を添加し、37 °C で 1 時間培養した。遊離された phenolphthalein 量を蛍光光度計にて測定した。

#### 5) 統計解析

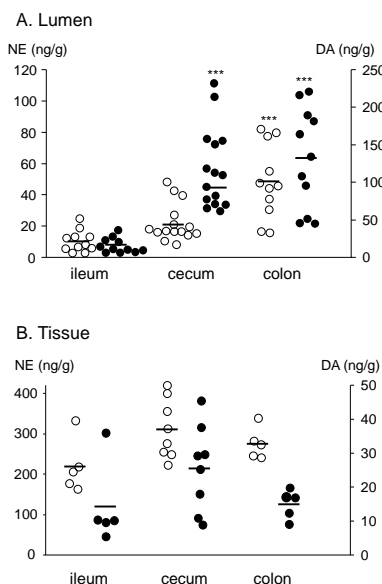
2 群の比較には *t* 検定を使用した。3 群以上の群間比較は、分散分析の後、Dunnett's test により検定した。

### 4. 研究成果

#### 1) 腸管管腔内 CA

図 1 に示したように、盲腸内容物および糞便中には遊離型 NE, DA が存在し、その濃度は DA > NE であった。特に盲腸、大腸などの下部消化管において NE, DA は高かった。一方、腸管壁の CA 濃度は回腸、盲腸、大腸で有意差は認めず、NE > DA であった。

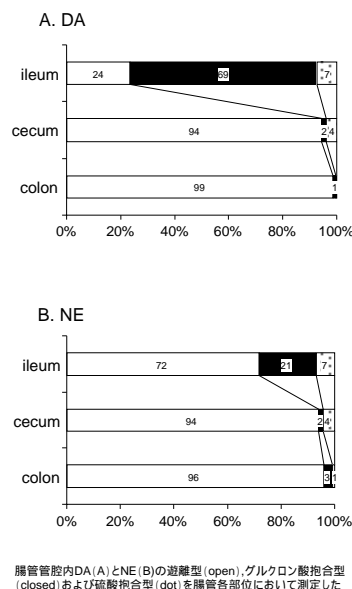
図1. 腸管各部位におけるCA濃度



腸管管腔内 (lumen) および腸管壁 (tissue) におけるドーパミン (DA: ●), ノルエピネフリン (NE: ○) はHPLCによって測定した。\*\*\*  $P < 0.001$

2) 腸管管腔内における遊離型、抱合型 CA  
次に腸管管腔内の回腸、盲腸、大腸における遊離型、抱合型 CA 濃度について検討した。図 2 に示したように、回腸においては、全体の 76% の DA、28% の NE が抱合型であったが、盲腸、大腸においては、大部分が遊離型として存在していた。

図2. SPFマウスにおける遊離型、抱合型CAの腸内分布



#### 3) GF マウスにおける腸管内 CA

上の結果は、回腸内の抱合型 CA が下部消化管内で脱抱合され、遊離型に変換されている可能性を示唆する。そこで、この反応に腸内細菌由来の GUS が関与しているか否かを明らかにするために GF マウスにおける腸管管腔内 CA 濃度を測定した。図 3 に示したように、GF マウスの遊離型 CA 濃度は、SPF マウスと比較すると著しく低かった。一方、両群間で盲腸壁に含まれる CA 濃度に有意差は認めなかった。次に GF マウスの腸管管腔内における抱合型 CA について検討した。図 4 に示したように、GF マウスの CA はいずれの腸管部位においても DA の 90% 以上、NE の約 50% は抱合型であった。

図3. GF, SPFマウスにおける盲腸内CA濃度

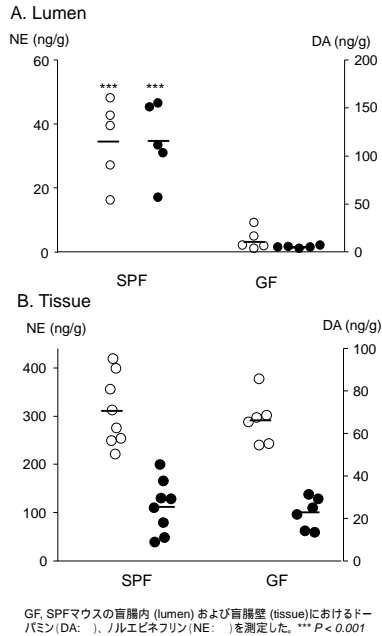
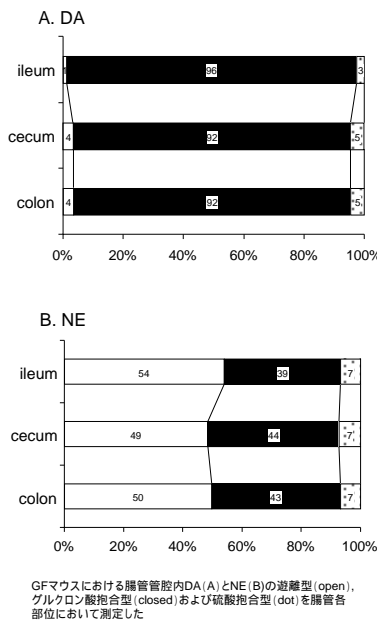
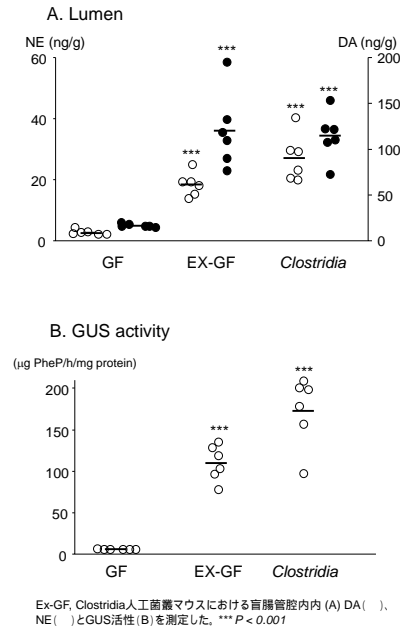


図4. GFマウスにおける遊離型, 抱合型CAの腸内分布



4) 人工菌叢マウスにおける盲腸管腔内 CA  
 以上の結果は、“腸管管腔内 CA は腸内細菌由来の GUS の作用により遊離型に変換される”ことを示唆している。そこで EX-GF と *Clostridia* cocktail で構成された人工菌叢マウスにおける盲腸内の CA 濃度と GUS 活性を検討した。図 5 で示したように GUS 活性に富む EX-GF, *Clostridia* 人工菌叢マウスでは、盲腸管腔内に遊離型 CA が SPF と同程度に存在していた。

図5. 人工菌叢マウスにおける盲腸内CAとGUS活性



5) 大腸菌 GUS 欠損株を用いた人工菌叢マウスにおける腸管管腔内 CA の検討

細菌由来 GUS が管腔内における遊離型 CA の誘導に不可欠であることを証明するために GUS を欠損した大腸菌株 (JW1609:  $\Delta$ GUS) とその親株 (BW25113) のみから構成された人工菌叢マウスを作製し、管腔内 CA について検討した。図 6 に示したように、 $\Delta$ GUS マウスでは、DA の 70%, NE の 29% が抱合型であるが、BW25113 マウスでは、その割合はそれぞれ 29%, 15%と有意に減少していた。それに対応して、BW25113 マウスでは、 $\Delta$ GUS マウスと比較し、遊離型の割合が有意に増加していた。

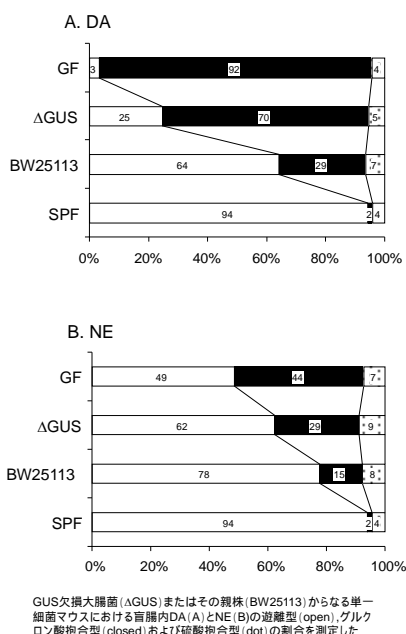
以上の結果は、管腔内 CA 生成のためには細菌由来の GUS が不可欠であることを示している。

このように腸管管腔内には DA, NE が 1-10  $\mu$ M 存在しており、その生成には腸内細菌の存在が不可欠であることが初めて明らかとなった。その機序として、腸内細菌由来の GUS による脱グルクロン酸抱合が主たる役割を演じていることがわかった。この結果は、食物中に含まれる CA または体内各所で生成された CA は肝臓でグルクロン酸抱合され、

胆管を経て腸管内へ分泌され、腸内細菌による脱抱合によって遊離型として生成されるという一連の過程を示している。以上の結果を Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 誌に報告したが、F1000 に注目論文として取り上げられるなど (In F1000Prime, 01 Feb 2013; DOI: 10.3410/f.717972997.793469811) 海外からの注目も高い。

腸管管腔内に存在する CA は、IKS や水分・電解質吸収に関わるばかりでなく、多くの未知の生理機能や内臓知覚過敏などの病態形成に関わっていることが予想され、さらに研究を推進していきたい。

図6. GUS活性による遊離型CAの誘導



## 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 4 件)

須藤 信行、薬物治療のほかにすべきこと生活習慣の見直しとストレス解消のすすめ腸内フローラとストレス、皮膚の科学、査読有、12 巻、2013、37-41

Nishino R, Mikami K, Takahashi H, Tomonaga S, Furuse M, Hiramoto T, Aiba Y,

Koga Y, Sudo N. Commensal microbiota modulate murine behaviors in a strictly contamination-free environment confirmed by culture-based methods.

Neurogastroenterol Motil. 査読有. 25(6). 2013. 521-8. doi: 10.1111/nmo.12110. Epub 2013 Mar 11.

Asano Y, Hiramoto T, Nishino R, Aiba Y, Kimura T, Yoshihara K, Koga Y, Sudo N. Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 査読有. 303(11). 2012. G1288-95. doi: 10.1152/ajpgi.00341.2012. Epub 2012 Oct 11.

Sudo N. Role of microbiome in regulating the HPA axis and its relevance to allergy. Chem Immunol Allergy. 査読有. 98. 2012. 163-75. doi: 10.1159/000336510. Epub 2012 Jun 26.

[学会発表](計 5 件)

朝野 泰成、平本 哲哉、須藤 信行、腸内細菌による腸管管腔内カテコラミンの制御、第 53 回日本心身医学会総会、2012 年 5 月 26 日、鹿児島

Sudo N. Gut microbiota modulates host stress response and behavior.

International Probiotics Symposium in Tokyo. Jun. 8, 2012.

須藤 信行、腸内細菌研究の動向と心身医学との接点、第 54 回日本心身医学会総会、2013 年 6 月 27 日、神奈川

須藤 信行、腸内細菌とこころの発達、第 13 回抗加齢医学の実際 2013、2013 年 9 月 16 日、東京都

須藤 信行、ストレス関連疾患の病態と治療、第 62 回東北支部主催生涯教育講演会、2014 年 2 月 25 日、宮城県

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

須藤 信行 (Sudo, Nobuyuki)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：60304812

### (2)研究分担者

古賀 泰裕 (Koga, Yasuhiro)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：60170221