

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860516

研究課題名(和文)慢性腸炎による線維化を改善する新規腸内細菌由来活性物質の同定とその治療効果の解析

研究課題名(英文)The therapeutic effects of novel probiotics-derived molecules on the intestinal inflammation and fibrosis in chronic colitis models

研究代表者

嘉島 伸(KASHIMA, Shin)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：10548655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Lactobacillus brevis由来活性物質である長鎖ポリリン酸の作用について、各種マウス腸炎モデルを用い検討した。その結果、長鎖ポリリン酸はDSS腸炎およびTNBS腸炎モデルの組織学的炎症・線維化を有意に改善し、炎症性サイトカインであるIL-1 やTNF の発現、線維化関連分子であるTGF- $\beta$ 1やコラーゲンの発現を有意に減少させた。さらに、ポリリン酸は腸管上皮細胞および免疫担当細胞に直接作用し、過剰に分泌される炎症性サイトカインや線維化関連サイトカインを制御することも明らかにした。この成果によって、菌由来活性物質を用いた新たな治療薬開発の基盤的成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：This study investigated whether polyphosphate (poly P), an active molecule derived from Lactobacillus brevis, could improve the inflammation and fibrosis in DSS-induced and TNBS-induced colitis models. The histological inflammation and fibrosis were improved, and the levels of IL-1 and TNF as well as TGF- $\beta$ 1 and collagens were decreased in the group administered poly P. To clarify the mechanism responsible for the observed effects, Caco-2/BBE and THP-1 cells were treated with LPS to induce inflammation. CCD-18 cells were treated with TGF- $\beta$ 1 to induce fibrosis. The expressions of IL-1 and TGF- $\beta$ 1 in Caco-2/BBE cells and of TNF in THP-1 cells were reduced by poly P. Poly P did not affect the expression of collagens and CTGF in CCD-18 cells. These results indicate that poly P regulates intestinal inflammation and fibrosis by down-regulating the expression of inflammation- and fibrosis-associated mediators in the intestinal epithelia and immune cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：プロバイオティクス 腸管炎症 腸管線維化 ポリリン酸

1. 研究開始当初の背景

クローン病は、主に若年者に発症する原因不明の慢性炎症性腸疾患であり、小腸・大腸を中心とした全消化管に難治性の浮腫や潰瘍を認める。その結果、強い腸管の線維化をきたし、高度な腸管狭窄や腸閉塞などの重篤な合併症を引き起こす。このような病状に対して有効性が証明されている内科治療はなく、現状では発症から10年以内に70%以上のクローン病症例に対して何らかの腸管手術が行われている(Bernell O, Ann Surg 2000)。

一方、クローン病患者では種々の遺伝子多型が認められ、特に微生物認識機構に関係する遺伝子異常が指摘されている。また、以前からクローン病患者では健常者と異なった腸内細菌叢を形成していることが知られている(Qin J, Nature, 2010)。すなわち、クローン病の発症や重篤化には宿主と腸内細菌との相互作用の破たんが関与しているものと考えられている。私はこれまでの preliminary な研究成果から、麦芽乳酸菌由来の活性物質であるポリリン酸をマウス慢性腸炎モデルに投与することで、炎症による腸管障害が改善すること、腸管狭窄の原因となる組織の線維化が著しく軽減すること、線維化促進因子である TGFβ や CTGF の過剰発現が正常化されることをつきとめた。

2. 研究の目的

以上の preliminary な成果を発展させ、本研究では以下の2点を目的とする。

(1)慢性炎症による線維化を抑制する菌由来活性物質の同定。

(2)菌由来活性物質による慢性腸炎モデルにおける線維化抑制効果の解明、の二点を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)乳酸菌・ビフィズス菌およびバシラス菌などの腸内細菌の培養上清から各種カラムを用いて分離し、質量分析器を用いて活性物質の構造を決定する。

(2)腸炎マウスモデル(DSS、TNBS)におけるポリリン酸の抗炎症・抗線維化作用を免疫染色・Western Blot 法・real-time PCR 法を用いて検討する。腸管上皮細胞・単球系細胞・腸管線維芽細胞の細胞株を用いて、ポリリン酸が腸管のどの細胞に作用するかを real-time PCR 法を用いて検討する。

4. 研究成果

(1)各種乳酸菌およびビフィズス菌、バシラス菌の培養上清を作製した。これらの培養上清には種々の程度の Hsp 誘導活性が見られたが、これまでに同定した competence and sporulation factor およびポリリン酸が腸管保護活性物質であると推定され、他に腸管保護活性を持つ物質は同定されていない。一方で、抗腫瘍活性を持つ培養上清が得られてお

り、現在、活性物質の同定を試みている。

(2)DSS 腸炎モデルにおいて、ポリリン酸の注腸投与により、腸管短縮の改善、組織学的炎症の改善及び組織学的線維化(図1)の改善作用が見られた。

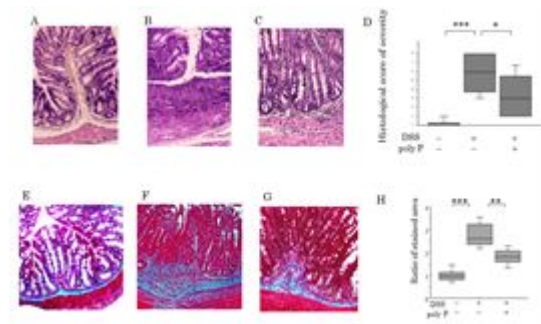


図1.DSS 腸炎モデルにおけるポリリン酸の組織学的炎症及び線維化の改善効果

(A:対照群、B:DSS+PBS 群、C:DSS+ポリリン酸群 (HE 染色)、D:組織学的スコア、E:対照群、F:DSS+PBS 群、G:DSS+ポリリン酸群 (Masson Trichrome 染色)、H:膠原線維面積比) \*:P<0.05、\*\*:P<0.01、\*\*\*:P<0.001)

その機序としては炎症により過剰発現した TGF-β1、Smad4、CTGF などの線維化関連分子の産生抑制(図2)及び炎症性サイトカイン(IL-1β、TNFα、IFNγ)の発現抑制が関与していることが明らかになった(図3)。

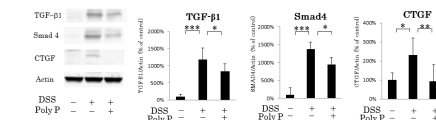


図2.ポリリン酸投与による DSS 腸炎モデルにおける線維化関連分子の変化 (Western Blotting 法) \*:P<0.05、\*\*:P<0.01、\*\*\*:P<0.001)

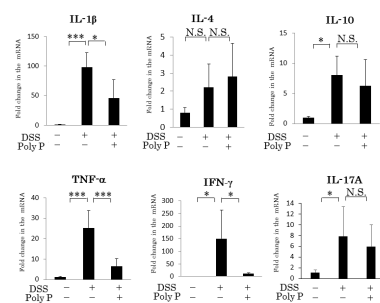


図3.ポリリン酸投与による DSS 腸炎モデルの腸管組織中の炎症関連サイトカインの変化 (real-time PCR 法) \*:P<0.05、\*\*\*:P<0.001)

(3) TNBS 腸炎モデルにおいて、ポリリン酸の注腸投与により、組織学的炎症の改善及び組織学的線維化(図4)の改善作用が見られた。

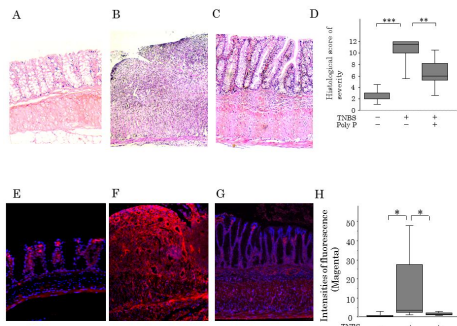


図 4. TNBS 腸炎モデルにおけるポリリン酸の組織学的炎症及び線維化の改善効果 (A: 対照群, B: TNBS+PBS 群, C: TNBS+ポリリン酸群 (HE 染色), D: 組織学的スコア, E: 対照群, F: TNBS+PBS 群, G: TNBS+ポリリン酸群 (collagen の蛍光免疫染色), H: 蛍光強度比 \*: $P<0.05$ 、\*\*: $P<0.01$ 、\*\*\*: $P<0.001$ ))

(4) 腸管組織を構成する、上皮細胞、単球系細胞、線維芽細胞を用いて、ポリリン酸の標的細胞を検討した結果、ポリリン酸は腸管上皮からの TGF- $\beta$ 1 の発現を抑制することで TGF- $\beta$ 1 刺激による腸管線維芽細胞からの collagen 産生を抑制することが明らかになった(図 5)。

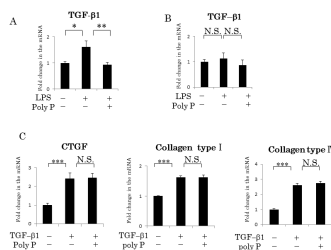


図 5. ポリリン酸投与による各種細胞株における線維化関連分子の変化 (A: 腸管上皮細胞 LPS 刺激下での TGF- $\beta$ 1 の変化, B: 単球系細胞 LPS 刺激下での TGF- $\beta$ 1 の変化, C: 腸管線維芽細胞 TGF- $\beta$ 1 刺激下での変化 real-time PCR 法 \*: $P<0.05$ 、\*\*: $P<0.01$ 、\*\*\*: $P<0.001$ ))

また、腸管上皮細胞に対しては IL-1 $\beta$  の発現抑制作用を、マクロファージに対しては TNF $\alpha$  の発現抑制作用を発揮することが明らかになり、標的細胞によって異なる作用をもつことが示された(図 6)。

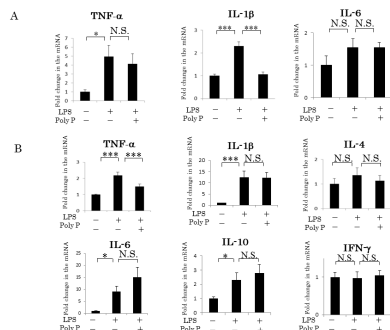


図 6: ポリリン酸投与による炎症性サイトカインの変化 (A: 腸管上皮細胞 LPS 刺激下での変化, B: 単球系細胞 LPS 刺激下での変化 real-time PCR 法 \*: $P<0.05$ 、\*\*: $P<0.01$ 、\*\*\*: $P<0.001$ ))

## 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 7 件)

Shin Kashima, Mikihiro Fujiya, Hiroaki

Konishi, Nobuhiro Ueno, Yuhei Inaba, Kentaro Moriichi, Hiroki Tanabe, Katsuya Ikuta, Takaaki Ohtake, Yutaka Kohgo.

Polyphosphate, an active molecule derived from probiotic *Lactobacillus brevis*, improves the fibrosis in murine colitis. *Translational Research*. 2015 Feb 19. pii: S1931-5244(15)00069-9. DOI: 10.1016/j.tsl.2015.02.002.

Fujibayashi S, Goto T, Sasajima J, Utsumi T, Dokoshi T, Sakatani A, Tanaka K, Nomura Y, Ueno N, Kashima S, Inaba Y, Moriichi K, Fujiya M, Kohgo Y. Intraductal cholangioscopic visualization of moving fasciola hepatica. *Gastrointestinal Endoscopy* (in press).

Dokoshi T, Fujiya M, Tanaka T, Sakatani A, Inaba Y, Ueno N, Kashima S, Goto T, Sasajima J, Tominaga M, Ito T, Moriichi K, Tanabe H, Ikuta K, Ohtake T, Kohgo Y. A randomized study on the effectiveness of prophylactic clipping during endoscopic resection of colon polyps for the prevention of delayed bleeding. *Biomed Research International* (Journal of Biomedicine and Biotechnology) Volume 2015, Article ID 490272, 6 pages, 2015.

Fujiya M, Kashima S, Ikuta K, Dokoshi T, Sakatani A, Tanaka K, Ando K, Ueno N, Tominaga M, Inaba Y, Ito T, Moriichi K, Tanabe H, Saitoh Y, Kohgo Y. Decreased numbers of vascular networks and irregular

vessels on narrow-band imaging are useful findings for distinguishing intestinal lymphoma from lymphoid hyperplasia. *Gastrointestinal Endoscopy* 80(6):1064-71, 2014.

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 (Journal of Biomedicine and Biotechnology)* Volume 2013, Article ID 879491, 5 pages, 2015

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.

田中一之、安藤勝祥、上野伸展、後藤拓磨、嘉島伸、稲場勇平、伊藤貴博、盛一健太郎、藤谷幹浩、高後裕。空腸憩室からの大量出血に対してダブルバルーン内視鏡により完全止血し得た 1 例 *日本内科学会雑誌* 102(8):2050-2, 2013.

〔学会発表〕(計 27 件)

高後 裕、藤谷幹浩、上野伸展、野村好紀、嘉島伸、盛一健太郎、前本篤男、蘆田知史、田邊裕貴。腸内細菌由来物質による IBD の病勢制御に関する研究。厚生労働科学研究費委託費難治性疾患等実用化研究事業「独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究」平成 26 年度第 2 回総会 2015.1.23 東京

高後 裕、○藤谷幹浩、上野伸展、嘉島伸、堂腰達矢、坂谷 慧、田中一之、野村好紀、

笹島順平、盛一健太郎、安藤勝祥、田邊裕貴、蘆田知史。抗 CD3 抗体誘発小腸炎モデルを用いた新規難治性小腸潰瘍治療法の探索。厚生労働科学研究費委託費難治性疾患等実用化研究事業「独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究」平成 26 年度第 2 回総会 2015.1.23 東京

Ueno N, Fujiya M, Konishi H, Sakatani A, Tanaka K, Dokoshi T, Ando K, Kashima S, Inaba Y, Moriichi K, Kohgo Y. Oral dietary administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 alters the gut microbiome and ameliorates experimental colitis in mice. 2014 *Advanced in Inflammatory Bowel Disease.* 2014.12.4 Orland.

Moriichi K, Fujiya M, Ijiri M, Tanaka K, Sakatani A, Dokoshi T, Ando K, Ueno N, Kashima S, Inaba Y, Ito T, Kohgo Y. Quantitative autofluorescence imaging can objectively assess the severity of ulcerative colitis. *UEGW 2014* 2014.10.18 Vienna.

内海 辰哉、盛一健太郎、藤谷幹浩、田中一之、坂谷 慧、堂腰達矢、藤林周吾、安藤勝祥、上野伸展、嘉島伸、後藤拓磨、笹島順平、稲場勇平、伊藤貴博、高後 裕  
バレット食道表在癌の臨床的検討第 88 回日本消化器内視鏡学会 2014.10.24 神戸

上野伸展、岩間琢也、内海辰哉、坂谷 慧、田中一之、堂腰達矢、藤林周吾、嘉島伸、後藤拓磨、笹島順平、稲場勇平、盛一健太郎、藤谷幹浩、高後 裕。当院における大腸粘膜下層切開剥離術 (ESD) 安全性の検討。第 109 回日本消化器内視鏡学会北海道支部例会 2014.9.6 札幌

嘉島伸、藤谷幹浩、高後 裕。消化管悪性リンパ腫診断における Narrow band imaging (NBI) 観察の有用性。第 115 回日本

消化器病学会北海道支部例会 2014.9.6 札幌

藤谷幹浩, 嘉島伸, 高後裕. 乳酸菌由来長鎖ポリリン酸による抗炎症効果および線維化改善効果のメカニズム解析第 51 回日本消化器免疫学会総会 2014.7.10 京都

田中一之, 内海辰哉, 坂谷慧, 堂腰達矢, 藤林周吾, 安藤勝祥, 野村好紀, 上野伸展, 嘉島伸, 後藤拓磨, 笹島順平, 稲場勇平, 伊藤貴博, 盛一健太郎, 藤谷幹浩, 高後裕 早期大腸癌内視鏡治療の 予後延長効果に影響する因子の解析 第 87 回日本消化器内視鏡学会総会 2014.5.15 福岡

Konishi H, Fujiya M, Ando K, Tanaka K, Sakatani A, Dokoshi T, Inaba Y, Fujibayashi S, Goto T, Kashima S, Ueno N, Sasajima J, Ito T, Tanaka H, Ikuta K, Kohgo Y. MicroRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells through the autophagosomal degradation of hnRNP A1. DDW 2014 (AGA) 2014.5.6 Chicago.

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. DDW2014 (AGA) 2014.5.6 Chicago.

Sakatani A, Fujiya M, Tanaka K, Dokoshi T, Fujibayashi S, Ando K, Ueno N, Goto T, Kashima S, Sasajima J, Inaba Y, Ito T, Moriichi K, Sato R, Kohgo Y. Usefulness of NBI for differentiating colon neoplasms from non-neoplasms: Based on results of our institutional experience and a meta-analysis of comparative studies. DDW2014 (ASGE) 2014.5.6 Chicago.

堂腰達矢, 内海辰哉, 坂谷慧, 田中一之, 藤林周吾, 野村好紀, 上野伸展, 嘉島伸, 後藤拓磨, 稲場勇平, 伊藤貴博, 盛一健太郎, 藤谷幹浩, 高後裕. 当院における胃腫瘍性病変に対する ESD の治療成績と医療費原価の検討. 第 100 回日本消化器病学会総会 2014.4.26 東京

上野伸展, 坂谷慧, 田中一之, 堂腰達矢, 安藤勝祥, 嘉島伸, 後藤拓磨, 笹島順平, 稲場勇平, 伊藤貴博, 盛一健太郎, 藤谷幹浩, 高後裕. 新規麦芽乳酸菌 (*Lactobacillus brevis* SBC8803) 死菌による腸内細菌叢の変化と抗炎症作用に関する検討. 第 100 回日本消化器病学会総会 2014.4.24 東京

安藤勝祥, 坂谷慧, 堂腰達矢, 田中一之, 藤林周吾, 上野伸展, 嘉島伸, 後藤拓磨, 笹島順平, 稲場勇平, 伊藤貴博, 盛一健太郎, 田邊裕貴, 藤谷幹浩, 高後裕. 炎症性腸疾患における静脈血栓症の頻度・危険因子と発症リスクの階層化に関する検討. 第 100 回日本消化器病学会総会 2014.4.23 東京

田中一之, 盛一健太郎, 坂谷慧, 堂腰達矢, 藤林周吾, 安藤勝祥, 上野伸展, 嘉島伸, 後藤拓磨, 笹島順平, 稲場勇平, 伊藤貴博, 藤谷幹浩, 高後裕. 高齢者における早期大腸癌に対する内視鏡的治療の予後因子の検討 第 111 回日本内科学会講演会 2014.4.13 東京

田中一之, 上野伸展, 石井貴大, 坂谷慧, 堂腰達矢, 藤林周吾, 安藤勝祥, 後藤拓磨, 嘉島伸, 笹島順平, 稲場勇平, 伊藤貴博, 盛一健太郎, 藤谷幹浩, 高後裕. 食道 adenosquamous carcinoma (腺扁平上皮癌) の一例 第 113 回日本消化器病学会北海道支部例会, 第 107 回日本消化器内視鏡学会北海道支部例会 2014.3.2 札幌

上野伸展, 藤谷幹浩, 嘉島伸, 坂谷慧, 田中一之, 堂腰達矢, 藤林周吾, 安藤勝祥, 後藤拓磨, 笹島順平, 稲場勇平, 伊藤貴博, 盛一健太郎, 高後裕 小腸リンパ腫における画

像強調観察の有用性 第 51 回小腸研究会  
2013.11.9 名古屋

伊藤貴博, 坂谷 慧, 田中一之, 堂腰達矢,  
安藤勝祥, 上野伸展, 嘉島 伸, 富永素矢,  
稲場勇平, 盛一健太郎, 田邊裕貴, 藤谷幹浩,  
河野 透, 高後 裕. 潰瘍性大腸炎術後  
pouchitis 発症の予測に関する検討 第 54 回  
日本消化器病学会大会 2013.10.10 東京

Fujiya M, Tominaga M, Moriichi K, Tanaka  
K, Dokoshi T, Sakatani A, Ando K, Ueno N,  
Kashima S, Inaba Y, Ito T, Tanabe H, Ikuta  
K, Kohgo Y. The operative time for  
endoscopic submucosal dissection can be  
estimated based on the size and  
endoscopically described area of the  
lesion. 1st International Conference of  
Federation of Asian Clinical Oncology  
(FACO) 2013.9.26 Xiamen

⑲田中一之、内海辰哉、佐々木貴弘、坂谷 慧、  
堂腰達矢、藤林周吾、藤谷幹浩、安藤勝祥、  
上野伸展、嘉島 伸、後藤拓磨、笹島順平、  
稲場勇平、伊藤貴博、盛一健太郎、高後裕 .  
ダブルバルーン内視鏡にて診断しえた空腸  
MALT リンパ腫の 1 例 第 107 回日本消化器内  
視鏡学会北海道支部例会 2013.9.1 札幌

⑳坂谷 慧、藤谷幹浩、嘉島 伸、内海辰哉、  
佐々木貴弘、田中一之、堂腰達矢、藤林周吾、  
安藤勝祥、上野伸展、後藤拓磨、笹島順平、  
稲場勇平、伊藤貴博、盛一健太郎、高後裕 .  
クローン病の上部消化管病変の診断精度と  
一致率の検討 第 113 回日本消化器病学会北  
海道支部例会 2013.8.31 札幌

㉑藤谷幹浩、嘉島 伸、高後 裕 . 乳酸菌由  
来長鎖ポリリン酸を用いた新しい腸炎治療  
の開発 第 50 回消化器免疫学会 2013.8.2 東  
京

㉒藤谷幹浩, 坂谷慧, 嘉島伸, 田中一之, 堂  
腰達矢, 藤林周吾, 安藤勝祥, 稲場勇平, 伊  
藤貴博, 後藤拓磨, 笹嶋順平, 田邊裕貴, 高  
後裕 . 上部消化管病変を指標にした 炎症性

腸疾患診断の可能性 . 第 43 回日本消化器が  
ん検診学会北海道地方会 2013.07.13 札幌

㉓Konishi 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. DDW2013  
(AGA) . 2013.05.21. Orland

㉔Sakatani 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. DDW2013 (AGA). 2013.05.21.  
Orland

㉕ Sakatani A, Fujiya M, Kashima S, Tanabe  
H, Dokoshi T, Tanaka K, Ando K, Ueno N,  
Tominaga M, Inaba Y, Ito T, Moriichi K,  
Kohgo Y. A bamboo-like appearance is a  
characteristic finding of the upper GI in  
patients with Crohn 's disease. DDW2013  
(ASGE) . 2013.05.18. Orland  
〔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〕  
ホームページ等  
<http://>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

嘉島 伸 (KASHIMA, Shin)  
旭川医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 10548655