

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860712

研究課題名(和文)多発性硬化症を改善させる善玉菌の探索

研究課題名(英文)The effects of dietary yeasts on experimental autoimmune encephalomyelitis

研究代表者

高田 和城(Takata, Kazuhiro)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20573223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では日常的に摂取される発酵食品に含まれる酵母において、経口摂取により神経免疫疾患である多発性硬化症モデルを改善させる善玉菌について探索を行った。18種類の酵母の内、カンジダ・ケフィールにおいて、抑制性T細胞、樹状細胞の誘導作用を認め、炎症性サイトカインの減少と炎症性T細胞の減少を腸管において認め、全身の炎症反応の抑制と症状の改善を認めた。そのメカニズムとしてカンジダ・ケフィール投与群の腸内細菌叢の変化を介したものであることを明らかにした。以上より本研究は食習慣や腸内細菌叢の改善が多発性硬化症の新しい治療法となりうることを示す重要な研究である。

研究成果の概要(英文)：The intestinal microflora affects the pathogenesis of several autoimmune diseases by influencing immune system function. We aimed to investigate the effects of various dietary yeasts contained in fermented foods on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of multiple sclerosis (MS). The effects of eight yeasts selected from 18 types of yeasts contained in fermented foods were examined. Of these, administration of *Candida kefir* ameliorated the severity of EAE. Reduced numbers of inflammatory cells, and increased regulatory T cells and dendritic cells were observed. Analysis of microflora of *C. kefir*-treated mice demonstrated decreased *Bacteroides* compared to control flora. Transfer of intestinal microbiota also resulted in decreased *Bacteroides* and ameliorated symptoms of EAE. Thus, oral administration of *C. kefir* ameliorated EAE by altering the microflora. In addition, our findings also suggested the potential health benefits of dietary yeasts.

研究分野：神経内科

キーワード：多発性硬化症 腸管免疫 酵母

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (MS) は主に若年女性が罹患する中枢神経の自己免疫性炎症性疾患であり、若年者における運動障害の原因として最も多い神経難病である。MS の発症にはインターロイキン 17 産生 CD4 陽性 T 細胞 (Th17 細胞) が重要な働きをしており、そして Th17 細胞を抑制するものとして抑制性 T 細胞 (Treg 細胞) が重要である。

MS の発症要因として食習慣の変化が挙げられ (Kotzamani et al Neurology 2012)、我が国における多発性硬化症の患者数は近年急速に増加している。また、腸内細菌が免疫動態に影響し発症に関与している炎症性腸疾患 (クローン病、潰瘍性大腸炎) の患者数は増加しており、食習慣の変化が影響する MS においても患者数が増加している。

自己免疫疾患で重要な Th17 細胞や Treg 細胞が特定の腸内細菌で誘導されることが近年報告されており (Ivanov et al Cell 2009, Atarashi et al Science 2012)、またヒトでの炎症性腸疾患患者において Proteobacteria が増加すること (Daniel N et al PNAS 2007) や、動物モデルにおいて脂肪食などの食習慣を変化させると腸内細菌 *Bilophila wadsworthia* が増加し炎症性腸疾患を増悪させること (Devkota et al Nature 2012) はこれまでも報告されてきている。このことは、腸内細菌叢の制御が自己免疫疾患の治療法となることを示唆している。一方、現在多発性硬化症の治療法としてインターフェロン療法や各種モノクローナル抗体などが開発され使用されているが、非常に高額 (患者一人当たり年間約 200 ~ 300 万円) であり、また患者が若年者であることから長期投与に伴う副作用などの問題もあり患者負担および医療経済的な観点からも安価で患者負担が少ない治療法が求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は食習慣を改善させることにより多発性硬化症を抑制することであり、そのために近年摂取量が減少していると考えられる発酵食品に含まれている酵母に着目し、多発性硬化症モデルである自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に対し炎症抑制作用を持つものを見出し、多発性硬化症の治療につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

食品中に含まれる 18 種類の酵母を培養し、オートクレーブにより死菌を作成した。これら酵母死菌と腸管粘膜下層細胞を反応させ IL-10, TNF- α の産生パターンによりグループを分割しそれぞれの群において、経口摂取による EAE への作用について検討を行った。検討を行った酵母の内、*Candida kefyr* において EAE の抑制効果を認めたためその作用機序についても検討を行った。

4. 研究成果

1) *Candida kefyr* 経口摂取により EAE は抑制される。

一次スクリーニングの後に選択した 8 種類の酵母で検討を行った中では *Candida kefyr* (*C. kefyr*) 投与群においてのみ有意に EAE の抑制効果が認められた (図 1)。

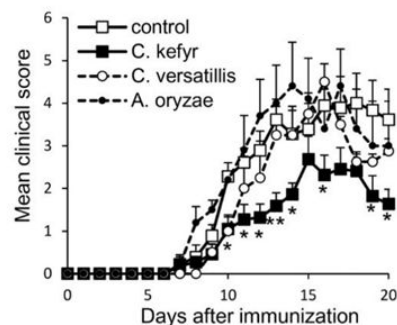


図 1 . *C. kefyr* による EAE 抑制作用

また炎症の抑制作用は中枢神経における細胞浸潤の減少、所属リンパ節における炎症性サイトカインの減少により確認することができた。

2) *C. kefyr* の経口投与は腸管における炎

症性サイトカインおよび Th17 細胞の抑制と同時に制御性 T 細胞と樹状細胞を誘導する。

C. kefyр 経口投与後の腸管 explant によるサイトカイン産生を検討すると C. kefyр 投与群において炎症性サイトカインである IL-6 の産生抑制、および抑制性サイトカインである IL-10 の産生増加を認めた。また腸管粘膜下層における Th17 細胞の減少、腸間膜リンパ節における Foxp3 陽性 T 細胞、抑制性 CD103 陽性樹状細胞の増加を認め、これらによる EAE の抑制が考えられた。

3) C. kefyр 経口投与は腸内細菌叢を変化させる。

C. kefyр 投与後の腸内細菌叢解析では C. kefyр を投与することにより継時的に Lactobacillae の増加、Bacteroides の減少させることを見出した (図 2)。

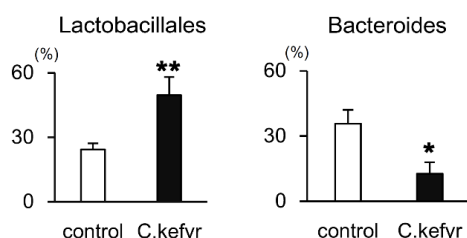


図 2 .C. kefyр による腸内細菌叢の変化

4) C. kefyр 投与後の腸内細菌叢は EAE を改善させる。

さらに C. kefyр の EAE 抑制作用が変化した腸内細菌叢を介したものであるかを検討するために、コントロール群および投与群の腸内細菌叢(糞便)を移入することによる EAE の臨床スコアに与える影響について検討を行った (図 3)。

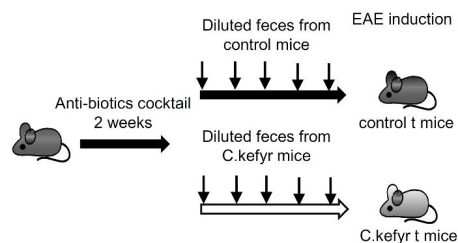


図 3 . 腸内細菌叢の移入

コントロール群、C. kefyр 投与群の腸内細菌叢をそれぞれ比較すると、通常に経口摂取させたとき同様に Bacteroides の有意な減少を再現することができ、C. kefyр 投与群の腸内細菌叢投与群のマウスにおいて有意に EAE の改善効果を認めた (図 4)。

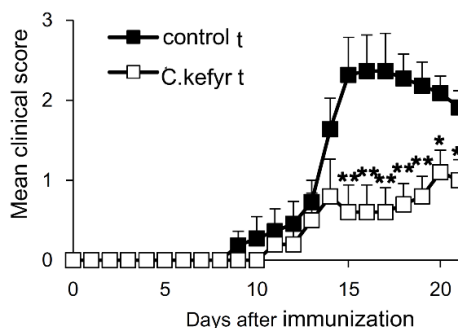


図 4 .C. kefyр 群腸内細菌叢による EAE の改善

5) 実験的大腸炎モデルにおいても C. kefyр 経口投与は抑制効果を示す。

近年多発性硬化症同様にわが国で増加している疾患に炎症性腸疾患が挙げられ、その増加の要因に食習慣の変化が関与していることが示唆されている。私たちは実験的脳脊髄炎モデルに加え、デキストラン硫酸を経口投与することにより誘導される自己免疫性大腸炎モデルにおいても C. kefyр の効果の検討を行った。このモデルにおいても検討を行った 4 種類の酵母の内 C. kefyр においてのみ有意な体重減少抑制作用など炎症抑制作用を示した (図 5)。

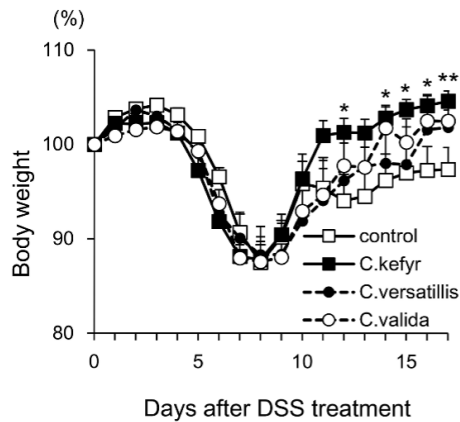


図 5 . C. kefyr による DSS 腸炎の改善

以上のことから、C. kefyr の経口摂取は腸内細菌叢を改善することにより腸管および全身の免疫動態を変化させ、多発性硬化症モデルである EAE や炎症性腸疾患モデルである DSS 腸炎モデルの症状を改善していると考えられる。このことより本研究は食習慣の改善や腸内細菌叢の改善そのものが多発性硬化症のみならず炎症性腸疾患などの多くの自己免疫疾患のの治療法となりうることを示している。

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 2 件)

1) “Dietary Yeasts Reduce Inflammation in Central Nerve System via Microflora”

Takata K, Tomita T, Okuno T et al.

Annals of Clinical and Translational Neurology 2015; 2(1): 56–66

DOI: 10.1002/acn3.153.

2) “¹¹C-Acetate PET Imaging in Patients with Multiple Sclerosis.”

Takata K, Kato H, Shimosegawa E et al.

PLoS One. 2014 Nov 4;9(11):e1111598.

DOI: 10.1371/journal.pone.01111598.

[学会発表](計 6 件)

1) Takata K et al. “Intestinal microflora modified by *Candida kefyr* reduces the susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis” 2014 Joint ACTRIMS-ECTRIMS Meeting; Sep 2014, Boston, USA

2) Takata K et al. “Dietary Component, As an Environmental Factor, Affects The Development Of EAE” 7th Congress of the Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis; Nov 2013, Kyoto, Japan

3) 高田和城、中辻裕司、木下允、奥野龍禎、甲田亨、佐古田三郎、望月秀樹

食餌成分(酵母)の腸管免疫を介した多発性硬化症病態への関与

第26回日本神経免疫学会

金沢歌劇座(2014年9月:石川県・金沢)

4) 高田和城、中辻裕司、木下允、奥野龍禎、甲田亨、富田貴之、武井雅也、萩原幸一郎、佐古田三郎、望月秀樹

食餌成分(酵母)の腸管免疫を介した多発性硬化症病態への影響

第55回日本神経学会

福岡国際会議場(2014年5月福岡県・福岡市)

5) 高田和城、甲田亨、奥野龍禎、木下允、富田貴之、武井雅也、萩原幸一郎、望月秀樹、佐古田三郎、中辻裕司

食餌成分の腸管免疫を介した多発性硬化症病態への関与

第25回日本神経免疫学会

海峡メッセ(2013年12月:山口県・下関市)

6) 高田和城、Joseph A Honorat、甲田亨、多田智、木下允、奥野龍禎、中辻裕司、

望月 秀樹、佐古田 三郎

食品中成分による多発性硬化症モデルの増悪

第 54 回日本神経学会

東京国際フォーラム (2013 年 5 月 : 東京都)

〔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://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/neuro1/myweb6/Top.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

高田 和城 (TAKATA Kazuhiro)

大阪大学・医学部神経内科・医員

研究者番号 : 20573223