

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460181

研究課題名(和文) 乳酸菌由来DNAの腸管における抗炎症作用に関する研究

研究課題名(英文) The anti-inflammatory effects of DNA from lactic acid bacteria in the intestine

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：乳酸菌 *Lactobacillus casei* のゲノムDNA上に発見した抗炎症作用を示す14種のオリゴDNA中で最も高頻度に含まれるODN 7F (TTTTGCCG)が上皮細胞および免疫細胞において抗炎症作用を示し、IBDモデルマウスの症状を軽減したことより、7Fが新たなIBD予防・治療薬となる可能性を示した。さらに、7Fの抗炎症作用にはTLR9が関与すること、また、その作用の発現にはTLR9だけではなくHsp90を介したHsp70の発現増加が重要であることなど、抗炎症作用の機序の一部を明らかにし、乳酸菌から特定した抗炎症作用を持つODNの創薬への可能性を示した。

研究成果の概要(英文)： We identified 14 novel anti-inflammatory oligodeoxynucleotide (ODN) from the genomic DNA of *Lactobacillus casei* using Caco-2 cells. In particular, the ODN 7F (TTTTGCCG) also showed the anti-inflammatory effects in THP-1 cells used as immune cell model and oral administration of 7F ameliorated the severity of colitis in dextran sodium sulfate-induced mouse model of IBD. In addition, the anti-inflammatory effects of 7F were mainly regulated by an increase in heat shock protein (Hsp) 70 expression through TLR9 and Hsp90. Our results suggested that the anti-inflammatory effects of live LAB is dependent on their genomic DNA and ODN identified from LAB genomic DNA possess the potential for treating IBD.

研究分野：生物系薬学

キーワード：乳酸菌 ゲノムDNA 抗炎症作用 オリゴデオキシヌクレオチド TLR9 Hsp90 Hsp70

1. 研究開始当初の背景

ヒトの体内や自然界に広く存在し、宿主に多くの有益な効果をもたらす乳酸菌は、食品や医薬品として利用されている。また、抗炎症作用を持つ乳酸菌の摂取は、厚生労働省より難病に指定されている炎症性腸疾患 (IBD) 患者の症状を改善することから、いまだ治療法のない疾患に対する新たな治療薬としても期待されている (Bibiloni et al, *Am J Gastroenterol* 2005)。しかし、免疫力の低下した患者に対する乳酸菌の摂取は、敗血症を引き起こす可能性があるため、その使用は制限されることが多い (Porras et al, *Inflamm Bowel Dis* 2006)。また、乳酸菌の抗炎症作用機構はまた不明の部分が多く、副作用をなくすためにその機構の解明は必須となる。上記の問題点を解決するために、乳酸菌の菌体内や細胞壁、菌体外分泌物などに含まれる抗炎症成分の特定が行われている (表 1)。

表 1. 乳酸菌に含まれる抗炎症成分

菌体内成分	ゲノムDNA	Jijon et al, <i>Gastroenterology</i> (2004)
	二本鎖RNA	Kawashima et al, <i>Immunity</i> (2013)
細胞壁成分	ペプチドグリカン	Matsumoto et al, <i>Immunology</i> (2009)
	リポテイコ酸	Miyachi et al, <i>Lett Appl Microbiol</i> (2008)
菌体外分泌物	菌体外多糖 (EPS)	Bleau et al, <i>J Appl Microbiol</i> (2010)

また、乳酸菌の抗炎症作用の強さは、菌種により異なることが知られている。研究代表者は、この違いが乳酸菌の抗炎症成分であるゲノム DNA に依存する可能性を示し (Hiramatsu et al, *Microbes Infect.* 2013) さらに、乳酸菌 *Lactobacillus casei* のゲノム DNA から、上皮細胞において抗炎症作用を示す 14 種類の短い配列 (オリゴデオキシヌクレオチド: ODN) を特定した。特に、最も強い抗炎症作用を示した ODN-7F (TTTTGCCG) は、*L. casei* に高頻度に含まれていたことから、*L. casei* のゲノム DNA の抗炎症作用は ODN の頻度に依存する可能性が高いことが示唆された。

表 2. Candidate anti-inflammatory ODN

Sense		Anti-sense	
No.	Sequence (5' → 3')	No.	Sequence (5' → 3')
3F	TGGCTGTT	3R	AACAGCCA
4F	TTGCCGCA	4R	TGCGGCAA
5F	GATTATCG	5R	CGATAATC
6F	CGCCATTT	6R	AAATGGCG
7F	TTTTGCCG	7R	CGGCAAAA
8F	TTGTCACC	8R	GGTGACAA
9F	CATCAAAG	9R	CTTTGATG

2. 研究の目的

本研究では、免疫細胞と大腸炎モデルマウスにおける ODN の抗炎症作用およびその作用機構を検討し、ODN を利用した抗炎症薬を創出するための基礎的研究を行う。さらに、乳酸菌の生菌およびゲノム DNA の抗炎症作用の強さが菌種により異なる原因の解明を目指す。炎症には、上皮細胞だけでなく免疫細胞も深く関与するため、したがって、本研究では、ODN の免疫細胞における抗炎症作用を評価する。さらに、IBD モデルマウスに対する治療効果の検討およびその作用機構の解明を行うことで、ODN を臨床応用に展開するための基盤を作る。また、他の乳酸菌のゲノム DNA に高頻度に含まれる ODN を特定し、乳酸菌の生菌およびゲノム DNA の抗炎症作用の強さが菌種で異なる原因の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) ヒトマクロファージ様細胞株 THP-1 に対する ODN の抗炎症作用の確認

THP-1 細胞 (3×10⁶ cells/well/2 ml) を 6 well プレートに分注し、100ng/ml PMA (Phorbol Myristate Acetate) の存在下、48 時間インキュベートすることで、マクロファージ様細胞に分化させた。次に、3 μg/ml LPS の存在下、最終濃度が 30 μM となるように 1F (CAAACTA、抗炎症作用を示さない ODN)、7F、7R、8F を曝露し、24 時間インキュベートした。そして、細胞内タンパク質抽出物を作製し、iNOS、COX-2 の発現量をそれぞれウエスタンブロットおよび ELISA により測定した。

(2) IBD モデルの DSS (デキストラン硫酸ナトリウム) 誘発性大腸炎マウスに対する ODN の予防・治療効果の評価

DSS 誘発性大腸炎マウスは、6 週齢の雄の C57BL/6N マウスに 3% DSS 溶液を 7 日間飲水として与えることで作製した。ODN の経口投与 (2 nmol/g mouse) は、DSS の投与を開始する 6 日前より 2 日おきに 5 回行った。DSS の投与 0 日目より、毎日、体重の測定、下痢および血便の観察を行い、スコア化した。そして、それぞれのスコアを合計し、DAI を算出した。DSS 投与 7 日目にマウスを解剖し、大腸を摘出した。大腸の長さを測定後、タンパク質および RNA をそれぞれ抽出した。タンパク質抽出物は、MPO 活性の測定に使用した。また、RNA 抽出物は、逆転写後、real-time PCR を用いた MIP-2、iNOS、COX-2 mRNA の発現量の測定に使用した。(3) ODN の抗炎症作用への TLR9、Hsp70、Hsp90 の関与の評価

TLR9、Hsp70 の評価:

Caco-2 細胞 (2×10⁵ cells/well/500μl) を 24 well プレートに分注し、TLR9-siRNA または、Hsp-70-siRNA のトランスフェクションを 24 時間行った。ネガティブコントロールとして各々の scramble-siRNA を用いた。次に、1 mM H₂O₂ の存在下、1F および 7F (30μM)

を曝露した。48時間インキュベートした後、培養上清の回収および細胞内タンパク質の抽出を行った。培養上清中のIL-8濃度はELISAにより測定した。また、TLR9、Hsp70に特異的な抗体を用いたウエスタンブロットにより、細胞内タンパク質のTLR9、Hsp70発現量を測定して、7FによるIL-8遊離抑制作用へのTLR9とHsp70の発現抑制の関与を評価した。

Hsp90の評価:

ある種のODNはHsp90に結合することで、そのATPase活性を阻害してNF- κ Bの核内移行を抑制する作用を持つHsp70の発現を増加させることが報告されているので、1Fまたは7Fをストレプトアビジンおよびビオチンを介して、アガロース樹脂に結合させた。この複合体(10, 20, 40, 80 μ l)を1 μ gのrHsp90と反応させrHsp90を結合させた。樹脂を遠心、洗浄後、熱処理によってrHsp90とODNの結合を解離し、結合したrHsp90をウエスタンブロットにより検出して結合能を評価した。rHsp90(50 ng/ml)を用いて、ATPase活性を測定した。ODNによるATPase活性の阻害は、反応系に1Fまたは7F(3, 10, 30 μ M)を添加することで評価した。ATPase活性は、ATPがADPに変換される際に遊離するリン酸を、マラカイトグリーンとモリブデン酸アンモニウムにより発色させることで測定した。

(4) 乳酸菌および他の細菌のゲノムDNAの抗炎症作用にODNの頻度が与える影響の検討

ゲノムDNAの完全長塩基配列がNCBIデータベースで公開されている*Lactobacillus*属乳酸菌のゲノムDNA情報を用いて、14種類の抗炎症作用を持つODNがゲノムDNA 10⁶ bpあたり何個存在するかを算出した。

4. 研究成果

(1) 免疫細胞およびマウス大腸炎におけるODNの抗炎症作用の検討

腸管における炎症には、上皮細胞だけでなく、免疫細胞も重要な役割を果たす。そこで、ヒトマクロファージ様細胞株THP-1にIBDの原因の一つとして知られるLPSを添加し、炎症の指標となるiNOSおよびCOX-2の発現増加を測定することにより、免疫細胞におけるODNの抗炎症作用を評価した。その結果、7FのみがLPSによるiNOSおよびCOX-2の両方の発現増加を抑制した(Fig. 1)。これらの結果は、免疫細胞において、7Fが強い抗炎症作用を持つことを示した。

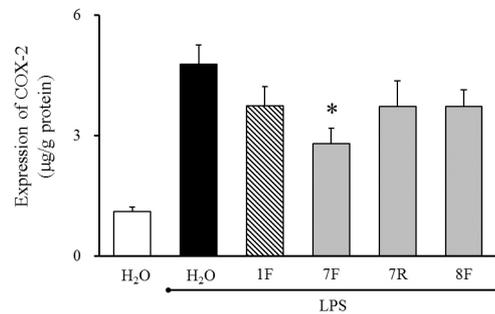
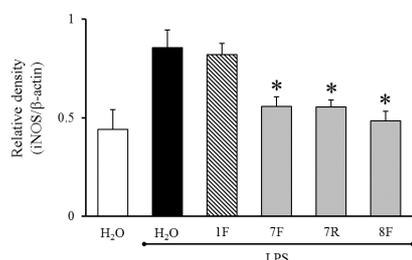


Fig. 1. LPSを曝露したTHP-1細胞における*L. casei*由来ODNのiNOSおよびCOX-2発現抑制作用(* $P < 0.05$ vs LPS+H₂O)

デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)をマウスに自由飲水させることにより、IBDモデルマウスを作製することができるので、3%DSSを7日間与える6日前よりODNを2日おきに経口投与し、ODNのマウス大腸炎に対する症状軽減作用を検討した。その結果、7Fの投与により、体重減少・下痢・血便の程度から算出したdisease activity index(DAI)の値が減少した(Fig. 2)。さらに、7Fの投与は、大腸の短縮および好中球遊走の指標であるMPO活性の増加についても抑制作用を示した(Fig. 3)。また、IL-8のマウスホモログであるmacrophage inflammatory protein-2(MIP-2)、COX-2、iNOSの大腸におけるmRNA発現量は、7F投与群のみで、その発現増加が抑制された(Fig. 4)。これらの結果は、7FがIBDモデルマウスの症状を軽減することを明らかにした。

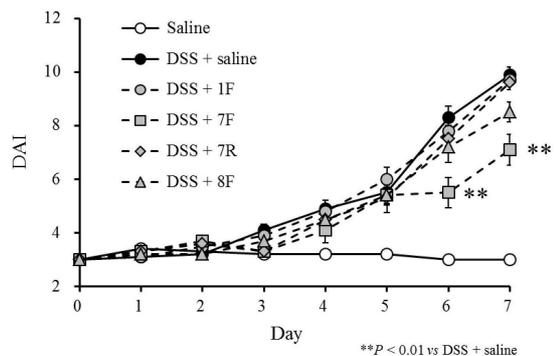


Fig. 2. 7FによるDSS誘発性マウス大腸炎の症状軽減作用 (** $P < 0.01$ vs DSS + saline)

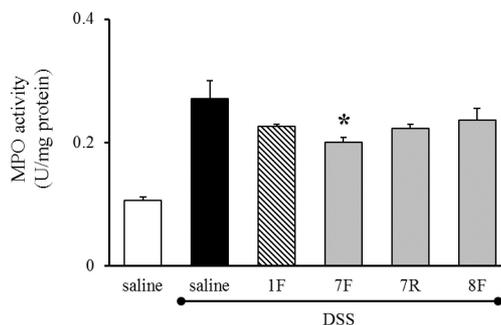


Fig. 3. 7FによるDSS誘発性マウス大腸炎のMPO活性減少作用

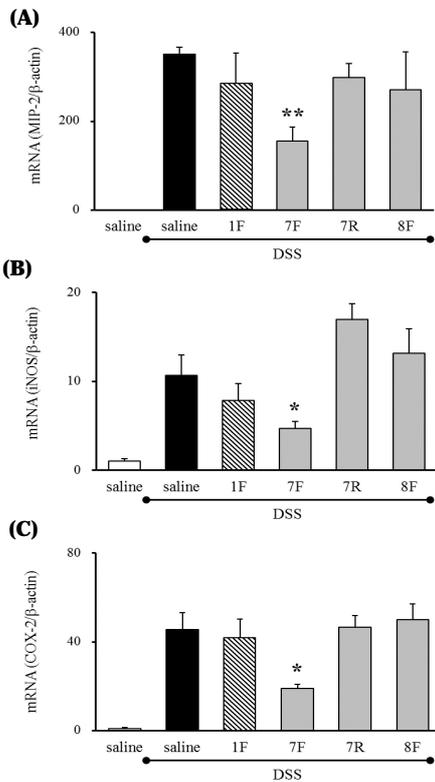


Fig. 4. DSS を投与したマウス大腸における 7F の MIP-2 (A)、iNOS (B)、COX-2 (C) mRNA 発現抑制作用

(3) ODN の抗炎症作用への TLR9、Hsp70 の関与

Caco-2 細胞の TLR9-siRNA 処理により、TLR9 の発現が抑制されることを確認した。siRNA 未処理細胞および scramble TLR9-siRNA 処理細胞において、7F は IL-8 の遊離を抑制した (siRNA 未処置: 376 ± 68 , scramble TLR9-siRNA: 315 ± 45 pg/ml)。また、TLR9-siRNA 処理細胞においても、7F は H_2O_2 による IL-8 の遊離を抑制した (526 ± 83 vs. 793 ± 25 pg/ml, $P < 0.05$)。しかし、TLR9-siRNA 処理細胞に H_2O_2 と 7F を曝露した場合の IL-8 遊離量は、siRNA 未処理細胞および scramble TLR9-siRNA 処理細胞の場合の IL-8 遊離量と比較して、有意に高かった (526 ± 83 vs. 376 ± 68 , 315 ± 45 pg/ml, $P < 0.05$) (Fig. 4)。これらの結果は、TLR9 の発現抑制が 7F による IL-8 遊離抑制作用を部分的に消失させることを示した。7F の IL-8 遊離抑制作用には、TLR9 非依存的な経路が存在する可能性が示されたので、乳酸菌の抗炎症作用機構の一つである Hsp70 が関与するかを検討した。RNAi 法を用いて、Hsp70 の発現を抑制した Caco-2 細胞を作製し、Hsp70 の発現抑制が 7F による IL-8 遊離抑制作用に与える影響を検討した。Hsp70-siRNA 処理により Caco-2 細胞における Hsp70 の発現が抑制されていることを確認した。7F による IL-8 遊離抑制作用に Hsp70 の発現抑制が与える影響を検討した。その結果、siRNA

未処理細胞および scramble Hsp70-siRNA 処理細胞では、7F は H_2O_2 による IL-8 の遊離を抑制した (siRNA 未処置: 366 ± 62 , scramble Hsp70-siRNA: 315 ± 45 pg/ml)。しかし、Hsp70-siRNA 処理細胞では、7F は H_2O_2 による IL-8 の遊離に影響を与えなかった (647 ± 131 pg/ml)。また、siRNA 未処理細胞、scramble Hsp70-siRNA 処理細胞と Hsp70-siRNA 処理細胞において、7F を曝露した細胞の IL-8 遊離量に有意な差が見られた ($P < 0.05$) (Fig. 6)。これらの結果は、Hsp70 の発現抑制が 7F による IL-8 遊離抑制作用を完全に消失させることを示した。

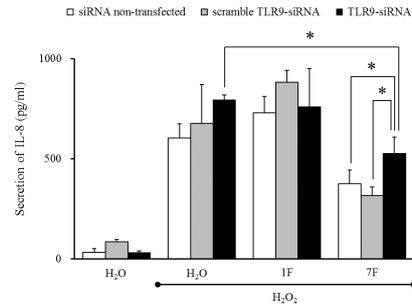


Fig. 5. TLR9 の発現抑制が 7F の IL-8 遊離抑制作用に与える影響

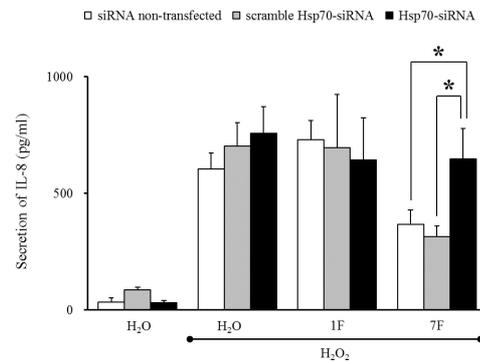


Fig. 6. Hsp70 の発現抑制が 7F の IL-8 遊離抑制作用に与える影響

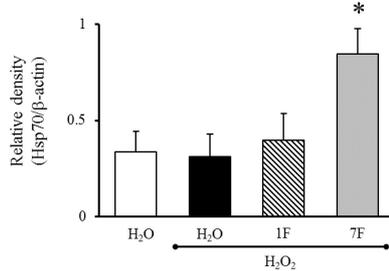
(4) Caco-2 細胞、DSS 誘発性大腸炎マウスにおける抗炎症作用を持つ ODN の Hsp70 発現誘導作用

上皮細胞における 7F の抗炎症作用機構に Hsp70 が関与することが明らかとなったので、7F を曝露した Caco-2 細胞および経口投与したマウス大腸における Hsp70 の発現増加について検討した。

Caco-2 細胞およびマウス大腸において、Hsp70 は恒常的に発現していた。また、 H_2O_2 の曝露および DSS の投与により、Hsp70 の発現量に差は見られなかった。一方、7F の曝露は Caco-2 細胞における Hsp70 の発現量を 2.7 倍に、7F の経口投与はマウス大腸における Hsp70 の発現量を 2.2 倍に増加させた ($P < 0.05$) (Fig7.(A) (B))。しかし、1F の曝露および投与は、Hsp70 の発現量に影響を与えなかった。これらの結果より、7F が Hsp70

の発現を増加させることで、抗炎症作用を示すことが示唆された。

(A)



(B)

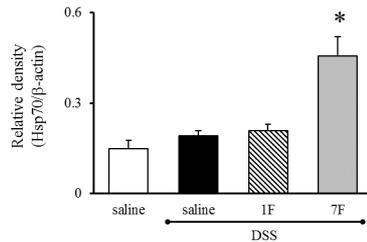


Fig. 7. 7F による Caco-2 細胞 (A) およびマウス大腸 (B) における Hsp70 発現量の増加

(5) 抗炎症作用を持つ ODN の Hsp90 への結合と Hsp90 の ATPase 活性阻害作用

7F は TLR9 非依存的な経路を介して、Hsp70 の発現を増加させることが示唆された。Hsp70 の発現増加の作用機構の一つとして、Hsp90 への結合およびその ATPase 活性の阻害が知られているので、Hsp90 組換え体 (rHsp90) を用いて、7F の rHsp90 に対する親和性および rHsp90 の ATPase 活性に与える影響を検討した。1F とアガロース樹脂を用いた場合、80 μ l で Hsp90 が検出された。一方、7F とアガロース樹脂を用いた場合、20、40、80 μ l で Hsp90 が検出された。また、ODN を結合させていないアガロース樹脂では、Hsp90 は検出されなかった (Fig. 8)。以上の結果、7F の rHsp90 に対する親和性は、1F より高いことが示された。

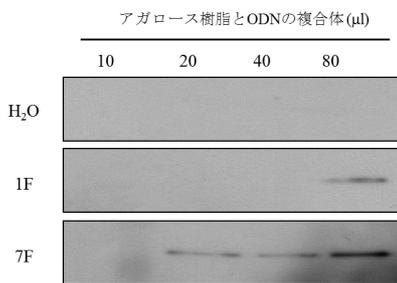


Fig. 8. 1F および 7F の rHsp90 に対する親和性

rHsp90 (50 ng/ μ l) を用いて、その ATPase 活性及ばず ODN の影響を反応系に 1F または 7F (3, 10, 30 μ M) を添加することで調べた。その結果、3 および 10 μ M の 7F は rHsp90 の ATPase 活性に影響を与えなかったが、30 μ M の 7F は rHsp90 単独と比較し、ATPase 活性を有意に抑制した (12.1 \pm 0.7 vs. 21.0 \pm 2.4 nmol/mg/min, $P < 0.05$) (Fig.

9)。一方、1F はすべての濃度で、rHsp90 の ATPase 活性に影響を与えなかった。この結果は、7F が用量依存的に rHsp90 の ATPase 活性を阻害することを示した。

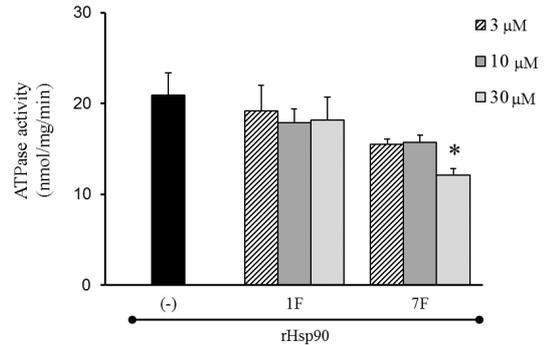


Fig. 9. 7F による rHsp90 の ATPase 活性の阻害作用

(6) 7F の抗炎症作用機構

RNAi により TLR9 の発現を抑制した Caco-2 細胞では、7F の IL-8 遊離抑制作用は完全には消失しなかった。この結果は、7F の抗炎症作用には TLR9 の関与しない経路も存在する可能性を示した。そこで、TLR9 以外の作用機構として、heat shock protein (Hsp) に着目した。7F と Hsp の関係について検討した結果、7F は Hsp90 に高い親和性を持ち、その ATPase 活性を阻害することを明らかにした。さらに、7F は Caco-2 細胞およびマウス大腸で Hsp70 の発現を増加させた。また、RNAi により Hsp70 の発現を抑制した Caco-2 細胞では、7F の IL-8 遊離抑制作用が完全に消失した。これらの結果は、7F の抗炎症作用に、TLR9 および Hsp90 を介した Hsp70 の発現増加という 2 つの経路が関与することを示唆した (Fig. 10)。

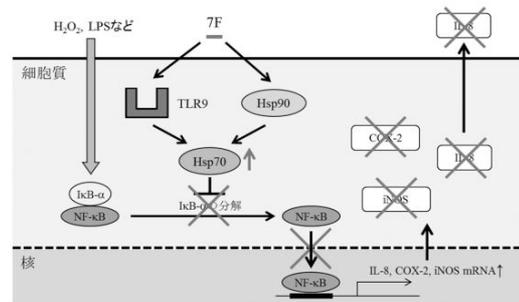


Fig. 10. 7F の抗炎症作用機構

(7) *Lactobacillus* 属のゲノム DNA 内に含まれる抗炎症作用を持つ ODN の頻度の算出

IL-8 遊離抑制作用を示した 14 種類の ODN (表 2) が 5 種類の *Lactobacillus* 属 (La: *L. acidophilus*, Lc: *L. casei*, Lg: *L. gasseri*, Lp: *L. plantarum*, Lr: *L. reuteri*) のゲノム DNA にどの程度の頻度で含まれているかを検討した。現在、3 種類の La、7 種類の Lc、1 種類の Lg、6 種類の Lp、5 種類の Lr のゲノム DNA の完全長ゲノムが NCBI データ

ースで公開されているので、これらのゲノム DNA 情報を用いて、14 種類の抗炎症作用を持つ ODN がゲノム DNA 10⁶ bp あたり何個存在するかを算出した。その結果、各乳酸菌のゲノム DNA において、3F、3R、5F、5R、8F、8R、9F、9R の塩基配列の頻度は同程度であった。一方、4F、4R、6F、6R、7F、7R の塩基配列は、他の 4 種類の *Lactobacillus* 属と比較して、Lc のゲノム DNA に高頻度に含まれていた。特に、7F および 7R の Lc ゲノム DNA における頻度は、最も高かった (127~129/10⁶ bp)。また、7 種類の Lc ゲノム DNA 間の 7F および 7R の頻度は、同程度であった (表 3)。この結果は、7F および 7R は、*Lactobacillus* 属ではなく、Lc のすべての株に特有の抗炎症作用を示す ODN であることが示唆された。

表 3 7 種類の Lc ゲノム DNA における 7F と 7R の頻度

Species	Strain	7F および 7R の頻度 (コピー数 / 10 ⁶ bp)
Lc	ATCC334	127
	LOCK919	129
	BD-II	128
	BL23	129
	LC2W	129
	W56	129
	str. Zhang	132

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 1 件)

Hiramatsu Y., Satho T., Hyakutake M., Irie K., Mishima K., Miake F., Kashige N. The anti-inflammatory effects of a high-frequency oligodeoxynucleotide from the genomic DNA of *Lactobacillus casei*. *Int. Immunopharmacol.* 2014 23(1):139-47 査読有り
doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.013.

[学会発表](計 7 件)

鹿志毛 信広, 平松 征洋, 前田 稔, 佐藤朝光, 中島 幸彦, 見明史雄
Lactobacillus plantarum D2905 株による TLR-9 を介した Caco-2 細胞からの Elafin の分泌促進
日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月、横浜市
丸山 真理子, 平松 征洋, 佐藤朝光, 梶原 由紀, 入江 圭一, 上田 紗織, 前田 稔, 中島 幸彦, 鹿志毛 信広, 見明史雄
クルマエビ腸管由来乳酸菌によるマウス腸管における抗菌ペプチド発現誘導作用

日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月、神戸市

辻 春香, 佐藤朝光, 平松 征洋, 前田 稔, 入江 圭一, 見明史雄, 鹿志毛 信広
Lactobacillus plantarum D2905 株のゲノム解析

日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月、神戸市

中村 智美, 百武 美香, 入江 圭一, 江川 さおり, 佐藤朝光, 中島 幸彦, 山下 郁太, 三島 健一, 鹿志毛 信広, 見明史雄
DSS 誘発性潰瘍性大腸炎におけるマトリックスメタロプロテアーゼ阻害因子 TIMPs の挙動、

日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月、神戸市

Hyakutake M., Satho T., Nakamura T., Irie K., Hiramatsu Y., Ueda S., Fukumitsu Y., Nakashima Y., Kashige N., Miake F.
Influence of oral administration of mosquito isolated enterococcus bacteria to dextran sodium sulfate induced murine colitis.

Joint International Tropical Medicine Meeting 2014, Bangkok, Thailand

田中 雄望, 上村 亮平, 古賀 貴之, 片山 彩香, 山田 佳奈, 横山 三都香, 樋口 椎菜, 佐藤朝光, 鹿志毛 信広, 見明史雄, 廣村 信, 戸田 晶久

アトピー性皮膚炎モデルマウスにおける新種乳酸菌 m-13 の薬物代謝系に及ぼす影響
第 31 回日本薬学会九州支部会、2014 年 12 月、福岡市

上田 紗織, 佐藤朝光, 入江 圭一, 平松 征洋, 福光 由起, 奥山 由季子, 福田 愛海, 中島 幸彦, 鹿志毛 信広, 見明史雄
蚊の中腸から単離した *Enterococcus* 属乳酸菌の新種提案
日本乳酸菌学会 2014 年度大会、2014 年 7 月、広島市

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

見明史雄 (Miake, Fumio)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号: 50248522

佐藤朝光 (Satho, Tomomitsu)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号: 90369025

(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