

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893136

研究課題名(和文) パイエル板共生細菌と腸管炎症との関わり

研究課題名(英文) Association between intestinal inflammation and indigenous bacteria inhabit in Peyer's patch

研究代表者

日山 智史 (Hiyama, Satoshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座助教

研究者番号：10735335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウスのパイエル板(PP)からレーザーマイクロダイセクション法(LMD)にて上皮を除いたリンパ組織のみを回収したところ、DNAの抽出が可能であった。PP、心臓(陰性コントロール)よりLMDにてDNAを抽出し、同定された菌種数を検討したところ、PPでは心臓と比し多い傾向があった。以上よりPPには回収可能な細菌が存在することが示唆された。

またPP、心臓、糞便それぞれに存在する菌種をメタゲノム解析にて検討したところ、3群いずれも異なる細菌叢を有する可能性が示唆された。コンタミネーションの可能性を完全に否定できないが、PPに特異的な菌種が存在する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Lymphoid tissue was resected from Peyer's patches (PP) of the wild-type mice using laser microdissection method (LMD). When we analyzed the number of bacteria from the extracted DNA from PP and heart (negative control) using LMD, the number of bacteria involved in PP had higher tendency compared with those from heart. This indicates that detectable number of bacteria inhabits inside of PP. Moreover, the profiles of bacteria identified from PP, heart and feces samples was evaluated using metagenomics analysis, which revealed that each group showed distinct profiles. Although potential contamination cannot be denied completely, this data suggests the possibility that specific bacteria species might exist inside of PP.

研究分野：消化器病学

キーワード：パイエル板 腸管免疫

1. 研究開始当初の背景

パイエル板は粘膜免疫誘導組織とも言われ、腸管から侵入する抗原を取り込み、抗原に対する免疫を調節している。すなわち、抗原を取り込む組織であるパイエル板を介した免疫応答において、管腔内から侵入する腸内細菌や食物性抗原が粘膜免疫誘導の方向性に重要な役割を与えると考えられる。腸内には 100 兆個もの細菌群が存在しているが、パイエル板内には、Alcaligenes 属を中心とした腸管管腔内と異なった細菌群が生体と共生していることが我々のグループの共同研究で明らかとなっている。また、ヒトのパイエル板内にも Alcaligenes 属の細菌が共生していることが示されているが、ヒトの疾患との関係は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

パイエル板内の共生細菌群を網羅的に解析し、炎症性腸疾患や NSAID 腸炎などの腸管炎症との関連を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

パイエル板の表面には多数の腸管管腔内の細菌が付着しており、解析に影響を与えると考えられる。そこで、野生型マウスパイエル板の凍結切片を作成し、顕微鏡下にレーザーマイクロダイセクション法(LMD)にて上皮を除いたリンパ組織のみを回収する。得られたリンパ組織より Power Soil DNA extraction kit (MOBIO)にて DNA を抽出し、16sRNA universal primer により細菌由来核酸を PCR により増幅する。得られた PCR 産物を次世代シーケンサーにより解析し、解析に必要な細菌由来核酸を得る方法を確立する。

4. 研究成果

野生型マウスのパイエル板 (PP) からレーザーマイクロダイセクション法(LMD)にて上皮を除いたリンパ組織のみを回収したところ、DNA の抽出が可能であった。PP、心臓

(陰性コントロール)より LMD にて DNA を抽出し、同定された菌種数を検討したところ、PP では心臓と比し多い傾向があった。以上より PP には回収可能な細菌が存在することが示唆された。またメタゲノム解析を行い、パイエル板、心臓、糞便それぞれに存在する菌種の profile を主成分分析にて検討したところ、3 群いずれも異なる細菌叢を有している可能性が示唆された。特に糞便との比較にて、パイエル板では Staphylococcus 属、Propionibacterium 属や Lactobacillus 属の割合が多いという結果が得られた。これらの菌はいずれも腸管内や皮膚に存在する菌であり、コンタミネーションの可能性を完全に否定することができず、今後の課題として残っているが、同様の組織採取法にて各組織で菌種の差が見られることから、パイエル板に特異的な菌種が存在し免疫応答に関与する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計6件)

1. Shinzaki S, Ishii M, Fujii H, Iijima H, Wakamatsu K, Kawai S, Shiraishi E, Hiyama S, Inoue T, Hayashi Y, Kuwahara R, Takamatsu S, Kamada Y, Morii E, Tsujii M, Takehara T, Miyoshi E: N-acetylglucosaminyltransferase v exacerbates murine colitis with macrophage dysfunction and enhances colitic tumorigenesis. J Gastroenterol 2015
2. Shiraishi E, Iijima H, Shinzaki S, Nakajima S, Inoue T, Hiyama S, Kawai S, Araki M, Yamaguchi T, Hayashi Y, Fujii H, Nishida T, Tsujii M, Takehara T: Vitamin k deficiency leads to exacerbation of murine dextran sulfated

- sodium-induced colitis. J Gastroenterol 2015
3. Fujii H, Shinzaki S, Iijima H, Wakamatsu K, Iwamoto C, Sobajima T, Kuwahara R, Hiyama S, Hayashi Y, Takamatsu S, Uozumi N, Kamada Y, Tsujii M, Taniguchi N, Takehara T, Miyoshi E: Core Fucosylation on T cells, Required for Activation of T-cell Receptor Signaling and Induction of Colitis in Mice, is Increased in Patients with Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology 2016
 4. Ying J, Tsujii M, Kondo J, Hayashi Y, Kato M, Akasaka T, Inoue T, Shiraishi E, Hiyama S, Tsujii Y, Maekawa A, Kawai S, Fujinaga T, Araki M, Shinzaki S, Watabe K, Nishida T, Iijima H, Takehara T: The effectiveness of an anti-human il-6 receptor monoclonal antibody combined with chemotherapy to target colon cancer stem-like cells. Int J Oncol 2015;46:1551-1559
 5. Yoshihara T, Shinzaki S, Hiyama S, Murai K, Takehara T: Metastatic colon neuroendocrine carcinoma found in a patient with ulcerative colitis during annual endoscopic surveillance. Gastrointest Endosc 2016
 6. 長井健悟 新崎信一郎, 加藤元彦, 日山智史, 薬師神崇行, 西田勉, 飯島英樹, 大川和良, 辻井正彦, 竹原徹郎: S状結腸周囲腫瘍を併発した大腸型クローン病に対し抗菌薬併用下での生物学的製剤使用が有効であった1例 日本消化器病学会雑誌 112 巻 4 号 707-713 2015

〔学会発表〕(計3件)

1. Satoshi Hiyama, Hideki Iijima, Shinichiro Shinzaki, Syuuko Iwatani, Toshio Yamaguchi, Manabu Araki, Shoichiro Kawai, Yoshito Hayashi, Tetsuo Takehara. 2015. Endoscopic appearance of Peyer's patches predicts sustained clinical remission in ulcerative colitis patients. In UEGW. Barcelona, Spain
2. Toshio Yamaguchi, Hideki Iijima, Satoshi Hiyama, Manabu Araki, Shinichiro Shinzaki, Shoichiro Kawai, Yoshito Hayashi, Masahiko Tsujii, Tetsuo Takehara. 2015. Endoscopic appearance of Peyer's patches predicts sustained clinical remission in ulcerative colitis patients. In AOCC. Beijing, China
3. 日山智史, 飯島英樹, 竹原徹郎. 2016. 炎症性腸疾患患者の小腸パイエル板に対するNBI拡大内視鏡観察の臨床的有用性. 第102回日本消化器病学会総会. 東京

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日山 智史 (SATOSHI HIYAMA)
大阪大学医学系研究科 寄附講座助教
研究者番号: 10735335

(2) 研究分担者

辻井 正彦 (MASAHIKO TUJII)
東大阪市立総合病院 院長
研究者番号: 40303937

飯島 英樹 (HIDEKI IIJIMA)
大阪大学医学系研究科 講師
研究者番号: 90444520

新崎 信一郎 (SHINICHIRO SHINZAKI)
大阪大学医学系研究科 助教

研究者番号： 60546860

(3)連携研究者

飯田 哲也 (TETUYA IIDA)

大阪大学微生物病研究所 教授

研究者番号：90221746