

氏名（本籍） ひらまつ ゆきひろ
平松 征洋 (福岡県)

学位の種類 博士（薬学）

報告番号 甲第 1509 号

学位授与の日付 平成 26 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）

学位論文題目

乳酸菌由来 DNA の腸管における抗炎症作用に関する研究

論文審査委員（主査）	福岡大学	教授	鹿志毛 信広
（副査）	福岡大学	教授	見明 史雄
	福岡大学	教授	本田 申一郎

乳酸菌由来 DNA の腸管における抗炎症作用に関する研究

福岡大学大学院薬学研究科

微生物薬品化学教室

PD110509 平松 征洋

【諸言】

ヒト腸管に共生する乳酸菌は、宿主に多くの有益な効果をもたらすため、健康食品や医薬品として利用されている。抗炎症作用は乳酸菌の持つ作用の一つであり、腸管における過剰な炎症の抑制に寄与している。事実、生菌の乳酸菌の摂取が多くの大腸炎モデル動物や炎症性腸疾患 (IBD)患者の症状を軽減することが報告されている [1,2]。これまでの研究で、抗炎症作用の強い乳酸菌の探索が行われており、この過程で、生菌の乳酸菌の抗炎症作用の強さが菌種により異なることが明らかとなった [3,4]。現在、この違いの原因を解明するために、乳酸菌に含まれる主要な抗炎症成分の特定が行われている。本研究では、乳酸菌の抗炎症成分の一つであるゲノム DNA [5]に着目し、生菌の乳酸菌の抗炎症作用の強さが異なる原因の解明を試みた。また、乳酸菌のゲノム DNA の抗炎症作用機構に関する詳細な研究は、これまでに行われていない。よって、本研究では、細菌の DNA を特異的に認識する受容体 toll-like receptor (TLR) 9 [6]に着目し、乳酸菌のゲノム DNA の抗炎症作用機構についても検討した。

一方、乳酸菌のゲノム DNA は、生菌の乳酸菌より強い抗炎症作用を示すため、IBD の予防・治療薬として期待されている。しかし、ゲノム DNA は、高分子量である、合成できない等の医薬品としての問題点を持つ。この問題を解決するために、乳酸菌のゲノム DNA に含まれる抗炎症作用を持つ短い配列の存在に注目した。30 塩基以下の配列からなる一本鎖 DNA はオリゴデオキシヌクレオチド (ODN)と呼ばれており、これまでに免疫賦活作用や抗炎症作用を持つ ODN が報告されている [7,8]。ODN は、分子量 5,000 以下であり、合成可能であることから、ゲノム DNA の医薬品としての問題点を克服することができる (表 1)。

本研究では、乳酸菌のゲノム DNA から強い抗炎症作用を示す ODN を特定し、上皮細胞および免疫細胞における抗炎症作用、大腸炎マウスに対する症状軽減作用を評価することにより、新たな IBD 予防・治療薬の創出を試みた。また、TLR9 および heat shock protein (Hsp)に着目し、ODN の抗炎症作用機構についても検討した。

表 1. ゲノム DNA と ODN の比較

	ゲノム DNA	ゲノム DNA の一部を利用	ODN
			
分子量	6 × 10 ¹⁰ 以上 (100 万 bp 以上)		5,000 以下
安定性	分解しやすい		ゲノム DNA と比較すると良好
製造	合成不可能 抽出工程が煩雑		安価で合成可能

1. 菌種による乳酸菌のゲノム DNA の抗炎症作用の比較

ヒト腸管に多く存在する乳酸菌の一種である *Lactobacillus* 属のゲノム DNA による抗炎症作用の強さを比較した。抗炎症作用は、ヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 に IBD の原因の一つとして知られる H_2O_2 [9] を添加し、炎症の指標となる interleukin (IL)-8 の遊離、nuclear factor (NF)- κ B の核内移行および inhibitor of NF- κ B (I κ B)- α の分解 [10] を測定することにより評価した。その結果、5 種類の *Lactobacillus* 属 (表 2) のゲノム DNA が H_2O_2 による IL-8 の遊離を抑制することを明らかにした (図 1)。この作用は、大腸菌のゲノム DNA には見られなかったことから、ゲノム DNA による抗炎症作用は乳酸菌に特異的であると考えられる。また、La のゲノム DNA の作用は他の 4 種類の *Lactobacillus* 属より弱かった (図 1)。同様の結果は、5 種類の *Lactobacillus* 属のゲノム DNA による NF- κ B の核内移行および I κ B- α の分解抑制作用についても得られた。これまでに、乳酸菌の生菌においても、La の抗炎症作用は、他の *Lactobacillus* 属より弱いことが明らかとなっている [3,4]。生菌の乳酸菌と乳酸菌のゲノム DNA において、菌種による抗炎症作用の強さの違いが一致したため、生菌の乳酸菌の菌種による抗炎症作用の強さの違いがゲノム DNA に依存する可能性がある。

表 2. 本研究で使した菌種

乳酸菌	<i>L. acidophilus</i> (La)
	<i>L. casei</i> (Lc)
	<i>L. gasseri</i> (Lg)
	<i>L. plantarum</i> (Lp)
	<i>L. reuteri</i> (Lr)
大腸菌	<i>Escherichia coli</i> (Ec)

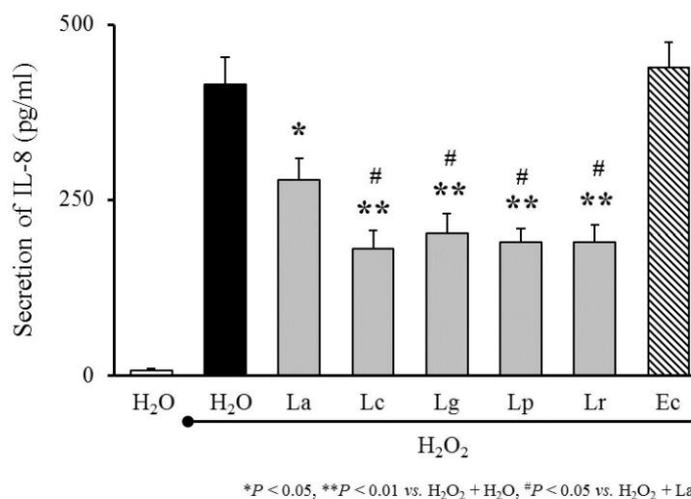


図 1. 5 種類の *Lactobacillus* 属のゲノム DNA の抗炎症作用

2. 乳酸菌のゲノム DNA による抗炎症作用機構の解明

本研究では、腸管上皮細胞による腸内の微生物の認識に関わる TLR に注目した。現在、ヒトでは 10 種類の TLR が同定されており [11]、細胞質内に局在する TLR9 は細菌のゲノム DNA を特異的に認識する。また、生菌の乳酸菌の抗炎症作用は、TLR9 が関与することが知られている [5]。よって、RNAi により TLR9 の発現を抑制した Caco-2 細胞を作製し、乳酸菌のゲノム DNA の抗炎症作用に TLR9 が与える影響を検討した。その結果、TLR9 の発現抑制により、5 種類の *Lactobacillus* 属のゲノム DNA による IL-8 遊離抑制作用は、完全に消失した (図

2)。同様に、NF-κB の核内移行および IκB-α の分解抑制作用も、TLR9 の発現抑制により弱くなっていた。また、H₂O₂ の存在下でのみ、乳酸菌のゲノム DNA は TLR9 の局在する Caco-2 細胞の細胞質内に侵入することが明らかとなった。これらの結果は、乳酸菌のゲノム DNA が Caco-2 細胞内に侵入後、TLR9 を介して、H₂O₂ による IκB-α 分解、NF-κB 核内移行、IL-8 の遊離を抑制することを示唆した (図 3)。

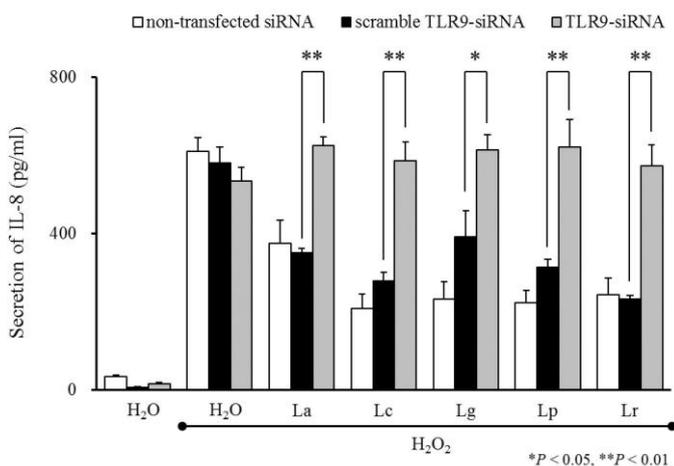


図 2. TLR9 が乳酸菌のゲノム DNA の抗炎症作用に与える影響

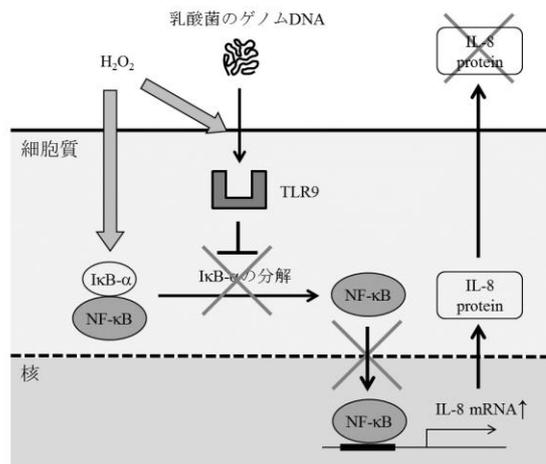


図 3. 乳酸菌のゲノム DNA の抗炎症作用機構

3. 抗炎症作用を持つ ODN の特定

抗炎症作用を示した Lc のゲノム DNA を断片化し、プラスミド pUC19 に挿入した。このプラスミドを大腸菌に形質転換した後、Lc のゲノム DNA 由来断片の挿入が確認できたクローンの中から、100 個を選択した。次に、これらのクローンからプラスミドを抽出し、Caco-2 細胞における IL-8 遊離抑制作用を検討した。その結果、24 個のプラスミドが抗炎症作用を示した。これらのプラスミドに含まれる Lc のゲノム DNA 由来配列には、8 塩基からなる 9 種類の配列が高頻度に存在していた。よって、それぞれの Sense 鎖、Anti-sense 鎖を合成し、18 種類の抗炎症作用を持つ ODN の候補とした (表 3)。

表 3. 抗炎症作用を持つ ODN の候補

Sense		Anti-sense	
No.	Sequence (5' → 3')	No.	Sequence (5' → 3')
1F	CAAACTA	1R	TAGTTTTG
2F	GATGGTCA	2R	TGACCATC
3F	TGGCTGTT	3R	AACAGCCA
4F	TTGCCGCA	4R	TGCGCAA
5F	GATTATCG	5R	CGATAATC
6F	CGCCATTT	6R	AAATGGCG
7F	TTTTGCCG	7R	CGCAAAA
8F	TTGTCACC	8R	GGTGACAA
9F	CATCAAAG	9R	CTTTGATG

この18種類のODNについてCaco-2細胞におけるIL-8遊離抑制作用を検討した結果、14種類のODNが抗炎症作用を示した(図4)。また、抗炎症作用を示したODNの5種類の*Lactobacillus*属のゲノムDNA内に含まれる頻度を算出した結果、特に7Fと7RがLcのゲノムDNAに高頻度に含まれていた。よって、以降の研究には、7Fと7R、*Lactobacillus*属間で頻度の差は見られないが抗炎症作用を示す8F、ネガティブコントロールとして1Fを使用した。

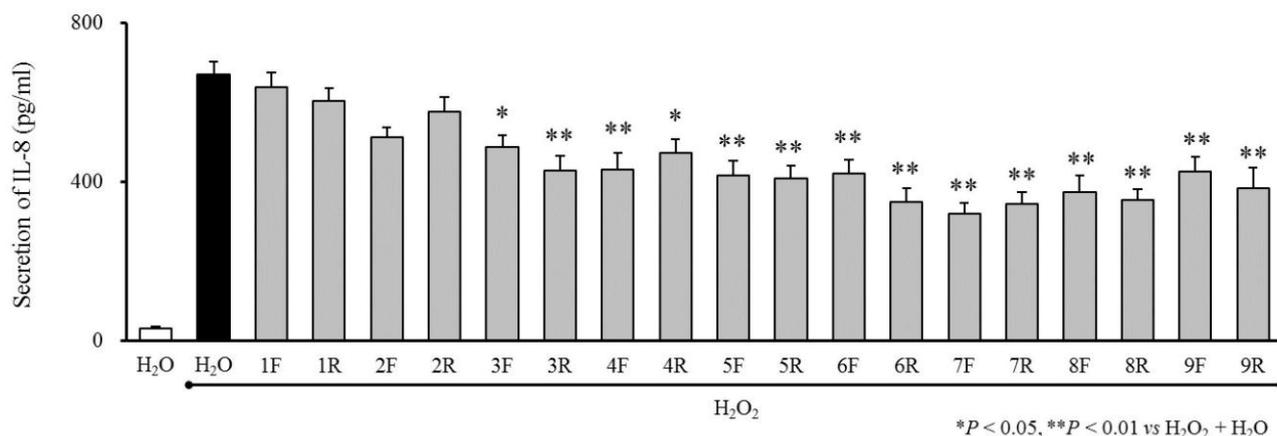


図4. ODNのCaco-2細胞における抗炎症作用

4. 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lipopolysaccharide (LPS) [12]を添加し、炎症の指標となるcyclooxygenase (COX)-2および誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現増加[13]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COX-2およびiNOSの両方の発現増加を抑制した(図5)。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。

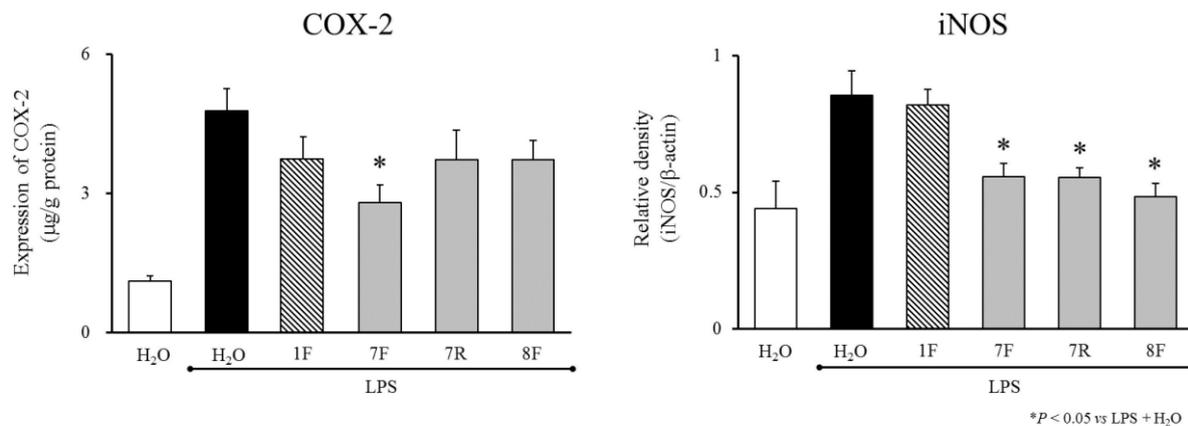


図5. ODNのTHP-1細胞における抗炎症作用

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 [14]。そこで、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 (図 6)。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 myeloperoxidase 活性の増加についても抑制作用を示した。また、IL-8 のマウスホモログである macrophage inflammatory protein-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。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。

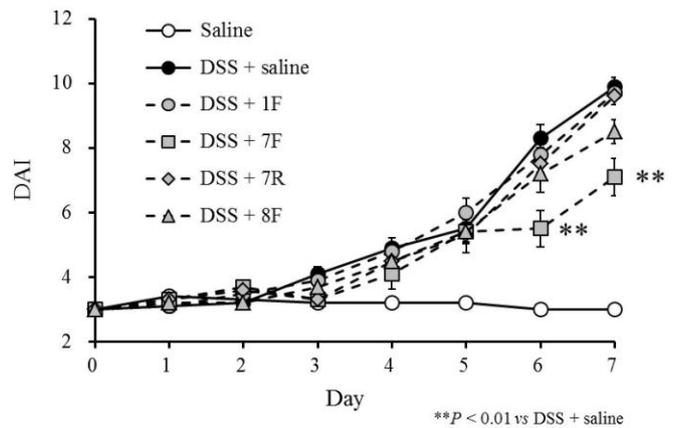


図 6. ODN のマウス大腸炎に対する症状軽減作用

5. 7F の抗炎症作用機構の解明

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。ある種の ODN は Hsp90 に結合すること [15]、Hsp90 に結合し、その ATPase 活性を阻害する物質は NF-κB 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 [16,17]。そこで、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 (図 7)。

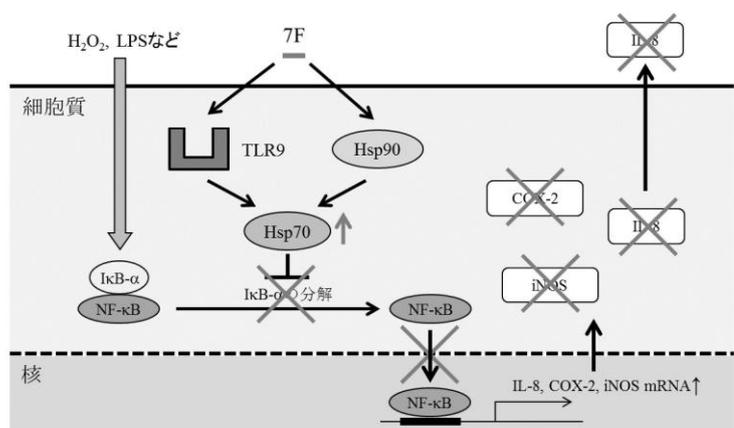


図 7. ODN の抗炎症作用機構

【総括】

本研究により、乳酸菌のゲノム DNA による抗炎症作用の強さが菌種により異なることが明らかとなり、生菌の乳酸菌の抗炎症作用の強さの違いがゲノム DNA に依存する可能性を示した。また、Lc のゲノム DNA に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から、7F が新たな IBD 予防・治療薬となる可能性を示すことができた。さらに、乳酸菌のゲノム DNA および 7F の抗炎症作用には TLR9 が関与すること、また、7F では 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を明らかにした。抗炎症作用機構の一端を解明できたことで、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広げることができたのではないかと考えられる。

【引用文献】

- [1] Herías MV *et al*, *Int J Food Microbiol* 2005;103(2):143-155.
- [2] Hart AL *et al*, *J Clin Gastroenterol* 2003;36(2):111-119.
- [3] Grimoud J *et al*, *Int J Food Microbiol* 2010;144(1):42-50.
- [4] Malago JJ *et al*, *Benef Microbes* 2010;1(2):121-130.
- [5] Rachmilewitz D *et al*, *Gastroenterology* 2004;126(2):520-528.
- [6] Hemmi H *et al*, *Nature* 2000;408(6813):740-745.
- [7] Iliev ID *et al*, *Cell Microbiol* 2005;7(3):403-414.
- [8] Bouladoux N *et al*, *Mucosal Immunol* 2012;5(6):623-34.
- [9] Cao W *et al*, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286(5):G833-843.
- [10] Yamamoto K *et al*, *Inflammation* 2003;27(3):123-128.
- [11] Kawai T *et al*, *Immunity* 2011;34(5):637-650.
- [12] Gardiner KR *et al*, *Gut* 1995;36(6):897-901.
- [13] Wang Q *et al*, *Life Sci* 2008;83(5-6):176-184.
- [14] Watt J *et al*, *Gut* 1973;14(6):506-510.
- [15] Bandholtz L *et al*, *Cell Mol Life Sci* 2003;60(2):422-429.
- [16] Kim HR *et al*, *IUBMB Life* 1999;48(4):429-433.
- [17] Guzhova IV *et al*, *Cell Stress Chaperones* 1997;2(2):132-139.