

乳酸菌由来DNAの腸管における抗炎症作用に関する研究

平松 征洋

福岡大学薬学部微生物薬品化学教室 〒814-0180 福岡県福岡市城南区七隈8-19-1

The anti-inflammatory effects of DNA from lactic acid bacteria in the intestine

Yukihiro Hiramatsu

Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University,
8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

The aim of this study is to investigate the anti-inflammatory effects of DNA from lactic acid bacteria (LAB) and lead to the development of new therapeutic approaches to ameliorate inflammatory bowel disease (IBD). We compared the anti-inflammatory effects of genomic DNA from five *Lactobacillus* species on interleukin (IL)-8 secretion and nuclear factor (NF)- κ B/inhibitor of NF- κ B (I κ B)- α system activation in Caco-2 cells used as an intestinal epithelial cell model. Comparison of these effects between five *Lactobacillus* species showed that the anti-inflammatory effects of genomic DNA from *Lactobacillus acidophilus* are lower than those of the other species. In addition, toll-like receptor (TLR) 9, a specific receptor of bacterial DNA, was one of the major pathways responsible for the anti-inflammatory effects of LAB genomic DNA. Furthermore, we identified 14 novel anti-inflammatory oligodeoxynucleotide (ODN) from the genomic DNA of *Lactobacillus casei* using Caco-2 cells. In particular, the ODN 7 F (TTTTGCGG) also showed the anti-inflammatory effects in THP-1 cells used as immune cell model and oral administration of 7 F ameliorated the severity of colitis in dextran sodium sulfate-induced mouse model of IBD. In addition, the anti-inflammatory effects of 7 F were mainly regulated by an increase in heat shock protein (Hsp) 70 expression through TLR 9 and Hsp 90. 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.

Keywords: anti-inflammatory effect; genomic DNA; heat shock protein; lactic acid bacteria; oligodeoxynucleotide, toll-like receptor 9

【緒言】



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 (Inflammatory Bowel Disease: 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 (Table 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。

Table 1. The difference of genomic DNA and ODN

	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 抽出行程が煩雑		安価で合成可能

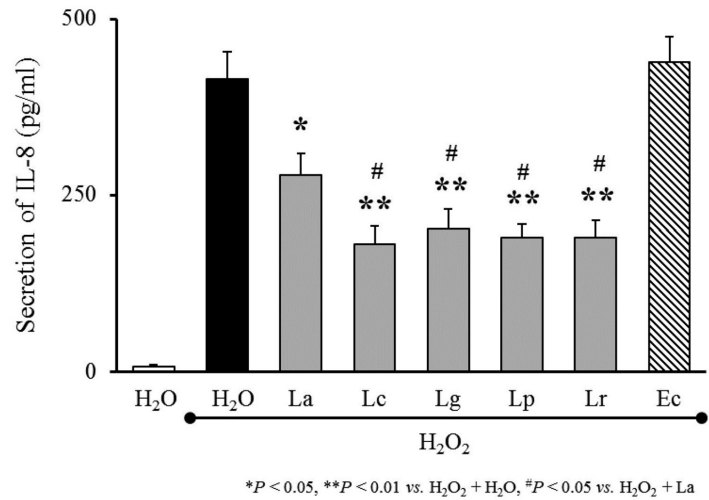
【実験方法・結果】

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 (Table 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 (Fig. 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 (Fig. 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。

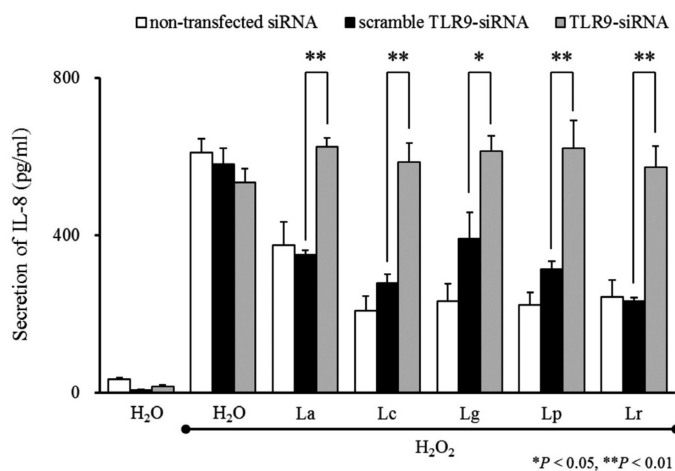
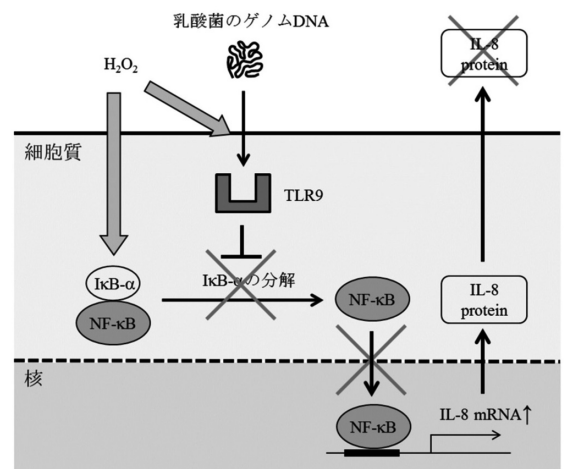
Table 2. Bacteria used in this study

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)

**Fig. 1.** The anti-inflammatory effect by genomic DNA of five *Lactobacillus* species

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(Fig. 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(Fig. 3)。

**Fig. 2.** Mediation by TLR9 of the anti-inflammatory effect by genomic DNA of *Lactobacillus* species**Fig. 3.** The mechanism of the anti-inflammatory effects by genomic DNA of *Lactobacillus* species

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 (Table 3)。

Table 3. Candidate anti-inflammatory ODN

Sense		Anti-sense	
No.	Sequence (5' → 3')	No.	Sequence (5' → 3')
1F	CAAAACTA	1R	TAGTTTTG
2F	GATGGTCA	2R	TGACCATC
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

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 (Fig. 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。

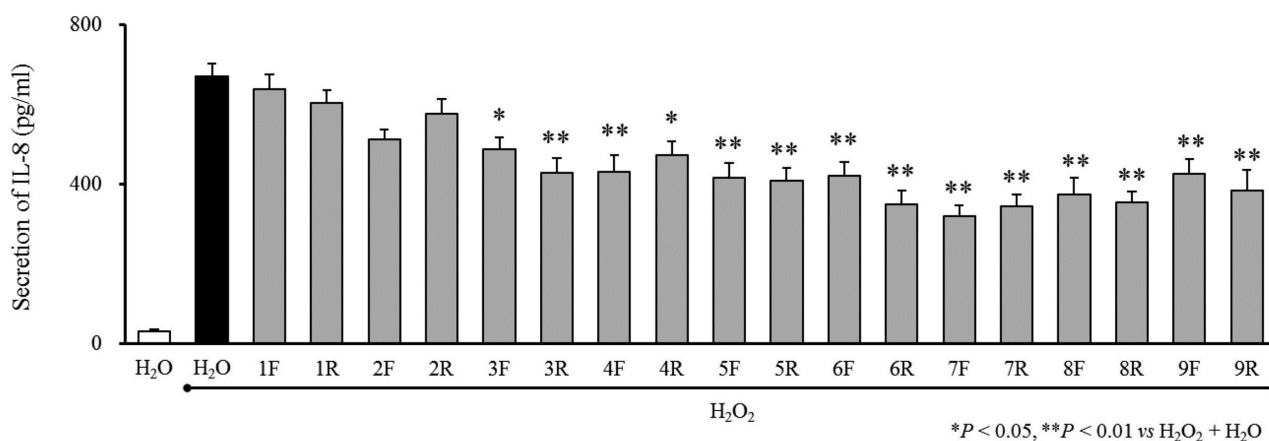


Fig. 4. The anti-inflammatory effect by ODN in Caco-2 cells

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 (Fig. 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。

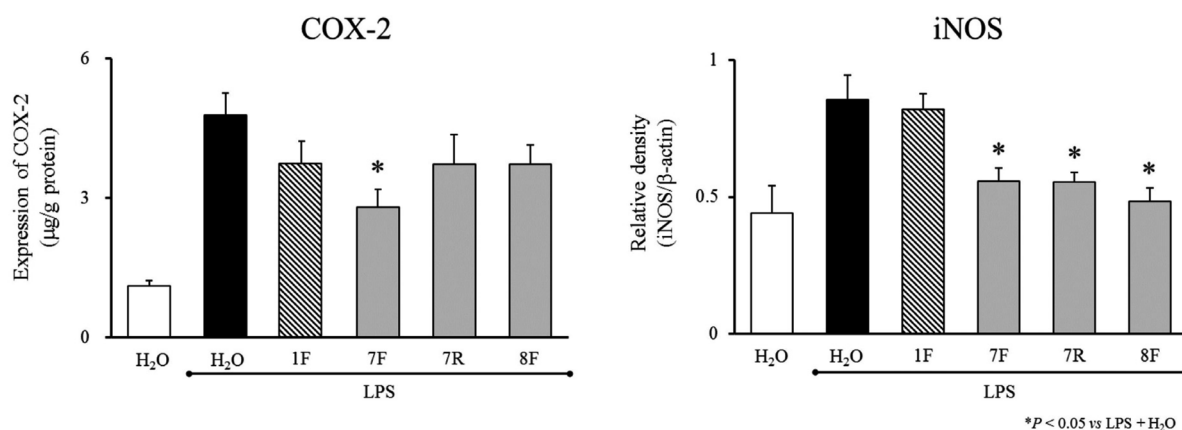


Fig. 5. The anti-inflammatory effects by ODN in THP-1 cells

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 (Fig. 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。

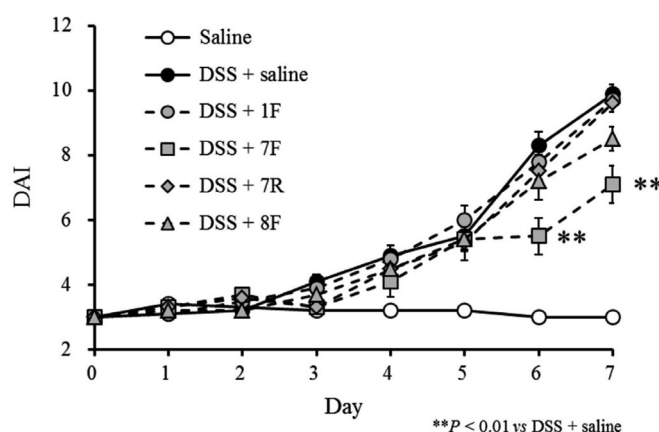


Fig. 6. The ameliorating effect by oral administration of ODN in DSS-induced murine colitis

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

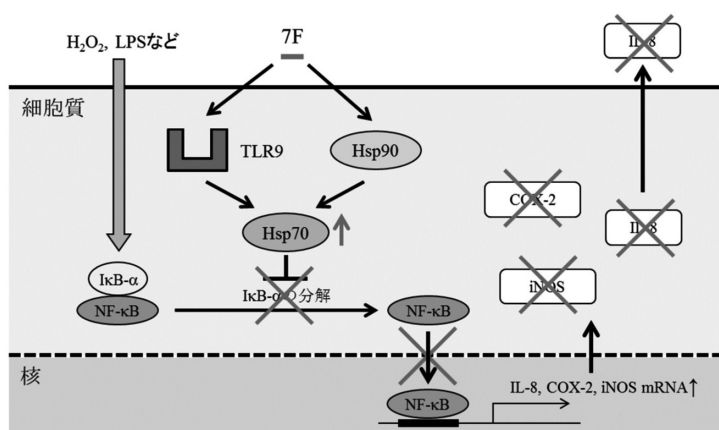


Fig. 7. The mechanism of the anti-inflammatory effects by ODN

る物質は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[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(Fig. 7)。

【考察】

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。

【参考文献】

- [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.