

腸粘膜上皮細胞の遺伝子発現に対するプロバイオティクス株ならびに常在性腸内細菌定着の影響

島 龍一郎、梅崎 良則 (ヤクルト中央研究所)

常在性細菌は宿主腸粘膜の生理学的・免疫学的機能の発達に重要な役割を担っている<sup>1)</sup>。無菌動物に腸内フローラを強制的に定着させる実験手法(通常化)は、宿主動物の生後から離乳期にかけて観察される腸内フローラ形成と宿主応答過程をよく反映しており、腸内フローラの生理的な役割を短時間に観察する実験システムとして繁用されている。また近年、宿主細胞および腸内菌側のゲノム解析の進展により、宿主側の応答を遺伝子発現として網羅的に解析することが可能となり、腸内菌についても代表的な菌種のゲノム解析から宿主依存性に関与する遺伝子情報が集まりつつある<sup>2)</sup>。そこで、本発表では腸粘膜機能の修飾を介して生理効果を発揮することが期待されるプロバイオティクス(PB)株に焦点をあて、常在性細菌と比較しながら宿主・腸内菌の相互作用(クロストーク)を遺伝子発現より解析することを試みた。PB株としては細菌学的な性質を異にする *Lactobacillus casei* Shirota 株(LcS)、*Bifidobacterium breve* Yakult 株(BbrY)の2株、常在性細菌としてセグメント細菌(SFB)を選択した。遺伝子発現は EDTA 法により腸上皮細胞を分画し、CodeLink のマイクロレイ、定量的 PCR 法を用いて解析した。

無菌マウスに PB 株及び SFB を定着させ(3日目)、無菌マウスに対して2倍以上に遺伝子発現が増強、抑制された遺伝子数を評価すると、LcS は大腸より小腸の遺伝子発現に対する影響が大きく、BbrY は対照的に小腸より大腸で大きな影響を示した。常在菌 SFB は小腸と大腸のいずれにおいても変動した遺伝子数は両 PB 株より多く、総じて通常化に近い応答であった。Gene Ontology Consortium のデータベースに基づいて遺伝子を8個の機能カテゴリーに分類すると、小腸では LcS によって生体防御、転写/翻訳、SFB では細胞間・細胞内シグナル伝達、輸送カテゴリー遺伝子の発現増強が顕著であった。大腸では BbrY は転写/翻訳、細胞間・細胞内シグナル伝達カテゴリーの増強が顕著で、この傾向は SFB と似ていたが、LcS とは異なっていた。またアレイプロファイル解析(GenMapp、UCSF)においても、小腸では LcS、大腸では BbrY 定着で細胞周期の進行に関与する遺伝子群の発現増強が認められた。

腸の機能面に注目して定量的 PCR 法で解析を行った結果、パネート細胞由来 cryptdin、その活性化酵素 matrilysin 遺伝子の発現は、LcS、BbrY 両 Pb 株で共に強い発現促進を示した。特に LcS による発現量は通常化以上であった。炎症時の腸組織の再構築に関与する pancreatitis-associated protein (PAP) は、LcS 定着により通常化より弱いが顕著な発現促進が認められた。ムチン(mucin3)は、BbrY で通常化と同様に発現減少を示した。消化吸収に関与する諸遺伝子にも特徴的な発現が認められた。

**【結論】** PB 株 LcS、BbrY は、それぞれ小腸、大腸の上皮細胞の遺伝子発現に対し、より強い影響を与えていることが示唆された。特に LcS 株は、小腸上皮細胞の生体防御に関与する cryptdin、matrilysin、PAP、及び消化吸収に関与する SI 等の遺伝子発現を促進した。

謝辞：本研究をするにあたりマイクロアレイ解析にご協力頂きました東北大学医学部の福島浩平先生並びに、実験を行うにあたり協力していただいた研究室の方々に感謝申し上げます。

#### 参考文献

1. Umesaki Y. et al., Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. *Microbes Infect.* (2000) 2 (11): 1343-51.
2. Fukushima K. et al., Non-pathogenic bacteria modulate colonic epithelial gene expression in germ-free mice. *Scand. J. Gastroenterol.* (2003): 38 (6): 626-34.

## The impacts of commensal bacteria and probiotic strains on gene expression of the intestinal epithelial cells

Tatsuichiro Shima and Yoshinori Umesaki  
Yakult Central Institute for Microbiological Research

Commensal bacteria play an important role for development of physiological and immunological functions in the intestine<sup>1)</sup>. The conventionalization of germ-free (GF) mice by oral administration of fecal bacteria is currently used to clarify the physiological roles of the commensal bacteria. Conventionalization is thought to be an experimental system to reflect a physiological process during a weaning period in a short time. Recent advancements of genomic analysis of hosts and enteric bacteria make it possible to analyze the host responses to the enteric bacteria based on the gene expression and host-dependence of the intestinal bacteria<sup>2)</sup>. In this study, we tried to investigate the interactions between hosts and intestinal bacteria including probiotics based on the gene expression of the intestinal epithelial cells. Probiotics are expected to exert beneficial effects on the host, through improvements of the intestinal functions and modification of intestinal immune system. *Lactobacillus casei* strain Shirota (LcS) and *Bifidobacterium breve* strain Yakult (BbrY), and segment filamentous bacteria (SFB) were used as probiotic strains and indigenous bacteria, respectively. Epithelial cells were isolated with ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) treatment and subjected to microarray (Codelink) and quantitative real-time PCR analyses.

The monoassociation of LcS with GF mice affected more strongly the gene expressions of the epithelial cells of the small intestine than those of the large intestine, and conversely, BbrY-association affected more strongly those of the large intestine than those of the small intestine, based on the numbers of genes with more than two-fold up- or down-regulation. SFB, a kind of indigenous bacteria, affected much strongly the gene expressions in both in the small intestine and the large intestine compared to the probiotic strains in the mice. In the small intestine, analysis of functional categories of the genes up-regulated based on Gene Ontology Consortium indicated that LcS evidently affected the gene expressions in defense/immunity and transcription/translation category. In the large intestine, BbrY affected the gene expressions of cell communication/signal transduction category. The radar chart pattern of the functional category of up-regulated genes by SFB-association in the large intestine was similar to that by BbrY-association but different from that by LcS. Array profile analysis (GenMapp, UCSF) showed that the genes involving cell cycle in the

small intestine and the large intestine were evidently affected by LcS and BbrY, respectively.

The analysis with quantitative RT-PCR method exhibited that the gene expressions of cryptdin and matrilysin in the paneth cells were highly induced by both probiotic strains, LcS and BbrY. Particularly, the degree of the enhancement of gene expressions by LcS was greater than that by conventionalization. Pancreatitis-associated protein (PAP), involving the reconstitution of tissue organization under inflammation, was strongly expressed by LcS-association, although to a lesser extent by conventionalization. The expression of mucin gene (*muc3*) was repressed by BbrY-association as observed in conventionalization process.

**Conclusion :** LcS and BbrY strongly influenced on the gene expression strongly in the ileal and colonic epithelial cells, respectively. Particularly, the gene expressions of cryptdin, matrilysin, and PAP for defense system and sucrase-isomaltase complex for digestion and absorption were significantly elevated by LcS in the small intestine.

**Acknowledgements :** We wish to thank Dr. K. Fukushima (Tohoku University, School of Medicine, Japan) for support for Microarray analyses and our colleagues, Drs S. Matsumoto, A. Imaoka, H. Setoyama and T. Hara help for advices.

## **References**

1. Umesaki Y. et al. Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. *Microbes Infect.* (2000) 2 (11): 1343-51.
2. Fukushima K. et al. Non-pathogenic bacteria modulate colonic epithelial gene expression in germ-free mice. *Scand. J. Gastroenterol.* (2003): 38 (6): 626-34.