

令和元年6月18日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09324

研究課題名(和文)糖質制限食の腸内細菌・腸管免疫に与える影響

研究課題名(英文) Impact of low-carbohydrate diet on the gut microbiota and mucosal immunity

研究代表者

小林 拓 (Kobayashi, Taku)

北里大学・北里研究所病院・副センター長

研究者番号：10424144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：食事と腸内細菌、腸内免疫の関係を明らかにするため、(I)マウス(II)ヒトに大別して以下の研究を行った。マウスに高脂肪食や糖質制限食を給餌したところ腸内細菌叢はClostridium cluster XI、Lactobacillales、PrevotellaがNFD群に比べHFLCD群で有意に増加し、Bacteroidesは有意に減少していた。人における意義を検討・確認するため、糖尿病患者の糖質制限食教育プログラムとリンクさせることで、日本人糖尿病患者の腸内細菌叢、糖質制限食による腸内細菌叢変化、糖質制限食有効例と無効例もしくは中止例の腸内細菌叢変化の有無、について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖質制限食はカロリーについての制限がないにも関わらず、急性期の効果としての血糖コントロール改善のみならず、肥満を改善する効果もあり、その有効性は広く認知され社会的に大きなブームとなっている。この糖質制限食の腸内細菌に対する影響、腸管免疫に対する影響を科学的に調べることは非常に重要と考える。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the relationship between diet and enterobacteria and intestinal immunity, the following studies were conducted by roughly dividing into (I) mouse (II) human. Bacterial flora increased in Clostridium cluster XI, Lactobacillales, and Prevotella compared with NFD group when mice were fed a high-fat or carbohydrate-restricted diet, and Bacteroides decreased considerably. . By linking with a carbohydrate-restricted diet education program for diabetic patients to examine and confirm their significance in humans, intestinal microflora in Japanese diabetic patients, intestinal microflora changes by carbohydrate-restricted diet, carbohydrate-restricted diet Most of the effective and ineffective cases were examined for the presence or absence of intestinal flora change in the discontinued cases.

研究分野：消化器内科

キーワード：糖質制限

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

戦後の生活習慣の変化は、日本人の栄養状態を画的に改善したが、特に欧米化とも呼ばれるその脂質等の過剰摂取は肥満、糖尿病、高脂血症、高血圧などの生活習慣病を増加させ、脳卒中や心疾患は日本人の死因のそれぞれ上位を占め、大きな社会問題となってきた。

消化器領域で同様に著明に増加している疾患として炎症性腸疾患 (inflammatory bowel diseases; IBD) がある。特に IBD は潰瘍性大腸炎とクローン病を合わせ 20 万人を越え、10 年間で約 2 倍に増加しており、現在もその増加には陰りが見えない。この IBD の増加も脂質摂取量の増加によると捉えられているが、視点を変えてみると、IBD の増加が糖質摂取比率と逆相関していると見ることもできる

IBD については、無菌状態ではマウス腸炎モデルの多くが発症しないこと (Sellon K et al. Infect Immun 1998)、抗菌薬の投与が症状を変化させうること、IBD 患者で腸内細菌叢の変化 (多様性の低下) が認められること (Sartor RB et al. Am J Gastroenterol 2012)、腸内細菌との相互作用に関係している遺伝子に変異が見られる頻度が多いこと (Jostins L et al. Nature 2012) などから、その病態への腸内細菌の関与は確実とみなされ、最近ではその是正を目的とした糞便移植治療なども注目されている。IBD、特にクローン病において高脂肪食が増悪要因であることはよく知られており、脂肪制限食が臨床効果を示すことなどから、高脂肪食が腸管粘膜免疫に与える影響は盛んに研究されてきた。我々もマウスにおいて高脂肪食 3 週間の給餌により腸内細菌叢の変化をきたすことを確認し、腸内細菌叢の変化が腸管免疫異常の一因となっている可能性が想定されているが、そのメカニズムの全容は明らかにされたとは言い難い。さらに興味深いことに、近年、IBD をはじめとした消化管疾患だけでなく、食生活の欧米化とともに増加しつつある多疾患すなわち、肥満 (Turnbaugh et al. Nature 2009)、糖尿病 (Tilg et al. Gut 2014)、動脈硬化、それぞれの発症と進展にも腸内細菌叢の変化が関与していることが明らかになってきた。

厳格な血糖管理を行うことで、糖尿病の細小血管合併症の発症・進展を抑制しうることが証明されてきた。糖尿病の治療には、食事療法、運動療法、薬物療法の 3 つが存在するが、最も重要で基盤となる治療は食事療法である。糖尿病食事療法は、従来エネルギー制限を基本として行われており、その有効性は広く認められている。しかし、実際は患者の空腹感やカロリー計算の煩雑さから遵守率が低いことが問題点として指摘されている。そのような中で近年、海外における DIRECT 試験に続き、分担研究者の山田は日本人糖尿病患者においても糖質制限食が有効であることを報告した (Yamada Y, Yamada S et al. Intern Med 2014)。さらに、糖質制限食はカロリーについての制限がないにも関わらず、急性期の効果としての血糖コントロール改善のみならず、中長期的には肥満を改善する効果もあり、その有効性は広く認知されるようになってきている。食事の栄養素比率を変えることにより腸内細菌叢の構成が急速かつ劇的に変化することが知られており、糖質制限食の血糖改善作用と抗肥満作用は、一部は腸内細菌叢の変化を介している可能性も想定されるが、これまで糖尿病患者に対する糖質制限食導入前後で腸内細菌叢の変化を観察した報告はない。しかし、エネルギー制限をせずに炭水化物と糖を減量するその内容を見てみると、皮肉なことに、米食を中心とした伝統的な和食への回帰とは“正反対”で、相対的に摂取脂質やたんぱく質を増加させるため、むしろ“超欧米化”とも呼ぶべき熱量比率となり、脂質が増悪要因となる IBD を悪化させる可能性を想起させる。

このように、糖質摂取 (制限) は、脂質摂取量増加に依存的もしくは非依存的に、腸内

細菌叢の変化を介して腸管免疫を変容させ、炎症性腸疾患の病態に関わっている可能性があるが、糖質制限食の腸管免疫への影響を調べた研究はない。

2. 研究の目的

本研究では、高脂肪食に加え特に糖質制限食に着目し、まずこれら食餌による腸内細菌叢の変化を調べる。また、糖質制限食の腸管免疫ならびに実験腸炎モデルを用いて IBD に与える影響を明らかにすることとする。さらには、この両者の関係、すなわち、腸管免疫・IBD への影響が、腸内細菌叢の変化を介するものなのかどうかを、無菌動物モデルを用いて証明する。

マウスを用いて行った上記検討のヒトにおける証明に関しても並行して検討を行う。現時点では IBD 患者に関する糖質制限の功罪を検討する臨床研究は予定していないが、糖尿病患者で糖質制限食を行う患者サンプルを用いて、糖質制限食の腸内細菌に与える影響と、糖質制限食による臨床効果（減量と血糖低下）が、腸内細菌叢の変化とどのように関連しているのかを調べる。このように本研究によって全体として食生活と腸内細菌、生活習慣、腸管免疫という重要なテーマに関し、特に糖質制限食、糖尿病、IBD に着目して明らかにすることを試みる。

3. 研究の方法

食事と腸内細菌、腸内免疫の関係を明らかにするため、(I)マウス(II)ヒトに大別して以下の研究を行う。マウスに高脂肪食や糖質制限食を給餌し腸内細菌(I-1)や腸管免疫系(I-2)の変化を確認し、さらにマウス腸炎モデルを用いて IBD への影響を検討する(I-3)。さらには無菌マウスを用いて行うこれらが腸内細菌叢の変化に依存するかどうかを検討する(I-4)。人における意義を検討・確認するため、糖尿病患者の糖質制限食教育プログラムとリンクさせることで、日本人糖尿病患者の腸内細菌叢、糖質制限食による腸内細菌叢変化、糖質制限食有効例と無効例もしくは中止例の腸内細菌叢変化の有無、について検討する(II)。

I については具体的に 6-7 週齢の C57BL/6 マウスに標準食 (normal fat diet ; NFD, たんぱく質:脂質:炭水化物 =29 % :13 % :58 %) または高脂肪低炭水化物食 (high fat low carbohydrate diet ; HFLCD, たんぱく質:脂質:炭水化物=20 % :60 % :20 %) を 6 週間与えた後屠殺し、血液・腸管及び糞便を採取し、以下の検討を行った。A) 肉眼および組織学的所見の評価。B) Cytometric Beads Array 法による腸管器官培養上清中及び血清中におけるサイトカインの測定。C) T-RFLP 法による糞便中の腸内細菌叢の構成変化の解析。D) フローサイトメトリーによる腸管粘膜固有層より単離した単核細胞の細胞構成の解析。

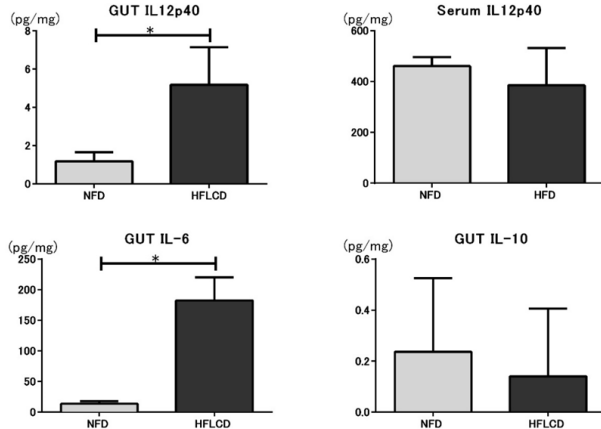
II については外来にて研究同意の取得後、入院予約を行う。入院日の昼食より糖質制限食を開始する。入院中は、通常の血糖コントロール/糖尿病教育入院と同様に治療、インスリン分泌能・糖尿病合併症の評価および患者教育を行う。原則としてインスリンおよび他の経口血糖降下薬は継続とするが、糖質制限食で良好な血糖管理が得られない場合は適宜治療薬の変更を行う。入院時、入院後に下記の評価項目を測定し、血糖の改善度や体重・体脂肪の変化などの臨床所見と合わせて解析、検討を行う。糖尿病被験者には、糞便サンプリングキットとして、RNAlater® Stabilization Solution(Ambion, Cat. No. #7020)3mL とジルコニアビーズ(φ2.5 mm)10 粒入りの採便管が配布された。入院前、入院 4 日目、入院 8 日目、入院 14 日目に被験者自身が糞便を採取し、糞便採取直後に採便管を 10 秒間振ることにより RNAlater と糞便を良く懸濁した。採便した資料は、DNA 抽出したうえで

メタ 16S 解析を行った。

4. 研究成果

I) マウス

A) NFD 群に比べ HFLCD 群の腸管は短く比重量は減少していた。組織学的所見では大きな差は見られなかった。B) 腸管培養上清中に分泌された IL-6 及び IL-12p40 とともに NFD 群に比べ HFLCD 群で有意に高値であった(図 1)。C) 腸内細菌叢は Clostridium cluster XI、Lactobacillales、Prevotella が NFD 群に比べ HFLCD 群で有意に増加し、



Bacteroides は有意に減少していた。

D) フローサイトメトリーでは小腸と大腸の間に相違の見られなかった NFD 群に対し、HFLCD 群は小腸のマクロファージが大腸に比べて有意に減少していた。

(図) 腸管器官培養上清中のサイトカイン産生

II) ヒトにおける研究

27 例の糞便データを取得した。

A) 多様性解析

症例毎の OTU 数の経時変化を解析した。個人毎に変化の様子は異なるが 4 日目で多様性が増大するような傾向が認められた。

B) クラスタ解析

糖質制限食開始 4 日間の腸内細菌叢へのインパクトが大きいことが示唆された。約半数では菌叢の変化が個人間の差を超えなかったことが明らかになった。個人間を超えた変化は 4 日目が多く、それらの症例の多くはその後も変化した菌叢を維持していた。

C) メタゲノム解析

入院 0 日、入院 4 日後、入院 13 日目の糞便メタゲノム解析データを、Bray-Curtis 法により統計解析した。被験者別に糖質制限食介入に伴う腸内細菌叢の変動を確認したところ、24 人中 13 人が糖質制限食による腸内細菌叢の変動がなく、11 人が変動していたことが判った。特に、腸内細菌叢の変動がある症例では、4 日目のデータがある 10 人中 9 人が、糖質制限食 4 日で腸内細菌叢が変動することから、糖質制限食による腸内細菌叢の変動は早期に起こることが示された。

D) 糖質制限食治療に伴い変動する菌の抽出

入院 0 日、入院 4 日目、入院 13 日目の糞便メタゲノム解析データから、経時的に増加し、健常者と同等な存在量を示す菌種と、入院とともに減少し、健常者と同等な存在量を示す菌種が存在した。健常人のメタゲノムリードは、BMI<25 とし、DDBJ 公的データベースよりダウンロードした。メタゲノム解析の特長は種レベルの解像度があり、リード数により増減が評価できることである。経時的に増加し、健常者と同様な存在量を示す菌種は、7 菌種同定された。経時的に減少した 20 菌種のうち、Bacteroides に属する菌の 7 菌種、

Prevotella, *Clostridium* に属する菌種であった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Toyonaga T, Matsuura M, Mori K, Honzawa Y, Minami N, Yamada S, **Kobayashi T**, Hibi T, Nakase H. Lipocalin 2 prevents intestinal inflammation by enhancing phagocytic bacterial clearance in macrophages. *Sci Rep*. 2016 Oct 13;6:35014. doi: 10.1038/srep35014. (査読あり)
<https://www.nature.com/articles/srep35014>
2. Yamada S. Paradigm Shifts in Nutrition Therapy for Type 2 Diabetes. *Keio J Med*. 2017 Sep 26;66(3):33-43 doi: 10.2302/kjm.2016-0016-IR (査読あり)
3. 小林拓 :炎症性腸疾患と腸内細菌(3)食事の欧米化と腸内細菌の変化 *INTESTINE* Vol.21 No.4(2-3)2017.7 p310-314 (査読なし)
4. Ueno A, Jeffery L, **Kobayashi T**, Hibi T, Ghosh S, Jijon H. Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease. *J Autoimmun*. 2018 Feb;87:38-49. doi: 10.1016/j.jaut.2017.12.004. (査読あり)
5. 小林拓 連載「免疫病動物モデルの特長と限界」炎症性腸疾患動物モデル 炎症と免疫 26(2) 2018.3 p162-166 (査読なし)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 黒沼智、小林拓、他。マウスへの高脂肪低炭水化物食給餌による大腸炎と腸内細菌への影響 日本消化器免疫学会 2016.7.14 東京
2. 山田悟 おいしく楽しく食べて健康に 東京都糖尿病協会第 15 回糖尿病市民セミナー 2017.2.5 東京
3. 山田悟 糖質制限の正しい知識と実践法 日本抗加齢医学会 2017.3.12 東京
4. 根本華歩、小林拓、他 高脂肪低炭水化物食がマウスの腸管及び腸内細菌叢に与える影響 第 21 回日本病態栄養学会 2018

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山田 悟

ローマ字氏名：(YAMADA, Satoru)

所属研究機関名：北里大学

部局名：北里研究所病院

職名：部長(医師)

研究者番号 (8 桁): 10286487

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。