

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18710

研究課題名(和文)フラクトオリゴ糖の極短期間摂取による腸内環境変動の解析

研究課題名(英文)Analysis of intestinal environmental change by intake of fructooligosaccharide in the ultra-short term

研究代表者

加藤 完 (Kato, Tamotsu)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・特別研究員

研究者番号：20632946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：プレバイオティクスの1つであるフラクトオリゴ糖(FOS)の摂取はマウスの糞便中IgA量を増加させることが報告されている。プレバイオティクスが宿主に影響を与えるまでのメカニズムを調べるために、FOS摂取後数時間単位での糞便を回収し、腸内環境の変動を解析した。FOSの摂取は数時間で腸内細菌の構成を変動させ、その後腸内代謝産物の構成を変化させた。宿主からの反応である糞便中IgA量は腸内環境の変動以降に生じており、腸内細菌の変動が宿主に与えるまでのメカニズムの一端を示した。

研究成果の概要(英文)：Fructooligosaccharides (FOS), one of the prebiotics, has been reported to increase the amount of fecal IgA in mice. To investigate the mechanism of prebiotics influencing to the host, feces were collected every several hours after FOS intakes and the change in intestinal environment was analyzed. Intake of FOS changed microbiota composition in several hours and then changed metabolic profiles. The amount of fecal IgA which is a reaction from the host occurred after the change in the intestinal environment. As a result, we showed a part of the mechanism that the change of microbiota influence to the host.

研究分野：腸内細菌学

キーワード：腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

腸内には、多数の腸内細菌が存在しており、これらの働きによって宿主の健康もしくは疾病に大きな影響を与えることが報告されている。腸内細菌は腸管の中で腸内細菌叢という一種のコロニーを形成しており、腸内細菌叢構成は食事や宿主の健康状態などによって日々変化している。しかしながら多様な菌種に加え、宿主からの反応も加えた腸内環境での腸内細菌叢の変動を予測することは困難である。

積極的に腸内細菌叢の構成に影響を与える方法として、プロバイオティクスやプレバイオティクスなどが知られており、一般にも多くの健康補助食品が普及している。プロバイオティクスやプレバイオティクスは、それぞれに宿主にとっての有用菌の増大や腸内細菌叢の安定化、または代謝産物などによる腸内環境の制御や宿主への影響などが報告されている。プレバイオティクスに含まれる食物繊維やオリゴ糖は、その構造の違いから多くの種類が存在し、それぞれに宿主に与える健康効果が違うことが報告されている。フラクトオリゴ糖(FOS)は、善玉菌の数を増加させヒトの腸内環境を改善することで健康維持に寄与するプレバイオティクスである。しかしながら、腸内では多種類の腸内細菌に加えこれらが産生する代謝産物、また宿主からの反応などによる複雑な複合微生物系を構成しており、その詳細なメカニズムについては不明な点が多い。これまでに報告されている FOS の効果は、長期間摂取による善玉菌の増加、宿主腸管においては IgA の腸管への輸送に關与する pIgR の発現上昇、また IgA 産生細胞である形質細胞の増加による Ig 量増加などが報告されているが一方で我々はマウスを用いて FOS を摂取させることで 1-2 日後には糞便中の IgA 量が増加することを明らかにしている。本研究ではこの現象に伴う短期間での腸内細菌叢の変動および代謝産物の変化がどのように生じているかを明らかにすることを目的としている。

2. 研究の目的

フラクトオリゴ糖は、いわゆる善玉菌の数を増加させ、ヒトの健康維持に寄与する食事成分である。しかし、有用効果の詳細なメカニズムは不明な点が多く、これをコントロールすることは困難である。我々はこれまでに腸内微生物叢と宿主細胞間の複雑な複合微生物系の詳細を明らかにするために、腸内環境を評価するためのマルチオミクス解析手法を考案している。本研究では、マウスを用いて短期間でのプレバイオティクスによる腸内環境の変動および宿主の免疫機能の変動をより詳細に評価し、宿主-微生物間のクロストークのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

BALB/cA マウス、雄、8 週齢(日本クレア)を購入し、腸内細菌叢の安定化のため動物実験施設内で 2 週間馴化を行う。AIN93G 合成餌のセルロース分を FOS に置換した合成餌を試験食とし、マウスに摂取させ糞便回収を行う。マウスから回収した糞便は、同一サンプルを使用するために 1 晩凍結乾燥を行い、破碎した後に DNA 抽出、代謝物解析、糞便中 IgA 測定用として取り分けた。

凍結乾燥糞便はジルコニアビーズおよび SDS 溶液により菌体破碎を行い、フェノール・クロロホルム精製、RNase 処理、PEG 沈殿を行うことで糞便中の DNA を抽出した。抽出した DNA は菌に特異的な 16SrRNA 遺伝子の V4 領域をターゲットとして PCR 増幅を行い、Miseq (Illumina) を使用してシーケンシングを行った。得られた塩基配列は Qiime ソフトウェアを用いて各サンプルの菌の構成情報を取得した。

同様に測り取った凍結乾燥糞便は NMR 装置を用いてメタボローム測定を行った。1H のデータ測定から代謝物プロファイルを数値情報として得た。加えて糞便中の IgA 量は ELISA 法によって測定した。

4. 研究成果

(1) これまでの研究からマウスにフラクトオリゴ糖を摂取させた際に糞便中の IgA 量が増加することが報告されている。我々も 28 日間におよぶ時系列での糞便中 IgA 量の測定を行った結果、糞便中の IgA 量はフラクトオリゴ糖を摂取してから 1~2 日で増加し始めることが明らかになった。短期間での糞便中 IgA 量の増加時の腸内環境変動との関係を調べるために以下の動物実験を行った。

BALB/cA マウスを日本クレアから購入し、AIN93G 餌(オリエンタル酵母)で 2 週間馴化を行った後、AIN93G 餌の成分中のセルロース分を FOS に変更した 5% FOS 餌を摂取させ、0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36, 48 時間後に糞便を回収し、糞便中の細菌叢の構成および代謝物、糞便中 IgA 量の増減の測定を行った。菌叢解析の結果からは 4~8 時間で Lactobacillus の増加、12 時間以降に Bacteroides および Parabacteroides が増加した。Lactobacillus の増加は一時的なものであり 8 時間以降では減少していたが、Bacteroides および Parabacteroides は FOS の摂取中減少することはなかった。

これらの菌の変動に關連して代謝物の変動を NMR 測定により確認したところ Lactobacillus の増加と關連して乳酸の増加が見られ、酢酸、酪酸、プロピオン酸などは 12 時間後までに一度減少し、それ以降で増加する傾向が見られた。酢酸、酪酸、プロピオン酸などは FOS の摂取による菌の構成が変動

し、一時的な代謝不良が起きたことも考えられる。また糖に関連するピークは FOS 摂食直後大きく増加するがその後減少した。このことから FOS の摂食直後は腸内細菌による分解が行われず素通りしていたオリゴ糖が時間経過により分解されることが確認できた。これらの結果は複雑な腸内細菌および代謝物との関係性を極短期間での変動に着目することで明らかにしている。

加えて、フラクトオリゴ糖の摂取により 16~20 時間後に有意に糞便中の IgA 量が増加し始め、その後 48 時間まで IgA 量は大きく増加していた。これまでの研究からも FOS の摂取により糞便中 IgA 量は 1 週間~1 ヶ月という単位で増加し続けることが明らかになっていることから糞便中 IgA の増加のきっかけに *Bacteroides* や *Parabacteroides* などが関与している可能性が高いと考えられた。再現性を取るために複数回短期間での糞便のサンプリング等を行ったが、時間経過による糞便中 IgA 量の増加のタイミングは実験の都度、最大で 24 時間程度変動した。実験開始時の細菌叢の構成によって FOS を利用できる菌の多少が影響していることが考えられる。

(2) FOS 摂取での腸内環境の変動が非常に短期間で起きていることから、糞便の時間経過だけを追うのではなく腸管部位での変動を追う必要がある。そこで同様に BALB/cA マウスに FOS を摂取させ時間毎に解剖を行い、小腸上部、小腸下部、盲腸、大腸の内容物を回収し細菌叢の解析を行った。

前項での糞便での解析結果と同様に盲腸や大腸内容物内で一時的な *Lactobacillus* の増加が見られ、また *Bacteroides* の増加も確認された。小腸の多くは *Lactobacillus* に占められているため、FOS の摂取により小腸部の *Lactobacillus* が盲腸部、大腸部へと影響を及ぼしたことが考えられる。また内容物中の IgA 量を測定したところ腸管の上部から下部へと時間経過による IgA 量の増加が見られた。加えて FOS の摂取による各部位での菌量の増減を調べるために、各菌に特異的なプライマーを用いて realtime qPCR を行い、FOS 摂取前後での相対値を比較したところ、短期間では小腸内での *Lactobacillus* が大きく増加し、また小腸、盲腸、大腸での *Bacteroides* は小腸での *Lactobacillus* 増加以降に増加することが示された。

以上のことから FOS の摂取による腸内環境への影響は小腸上部から生じており、これによる *Lactobacillus* や *Bacteroides* の増加が腸管下部へ影響を与えることで結果として糞便中の IgA 量の増加を引き起こしていることが予想される。

(3) 次に宿主側の反応を調べるために FOS 摂取 1 日後の BALB/cA マウスを解剖し、小腸(十二指腸、空腸、回腸部など)、盲腸、大

腸の各部位を回収した。腸管内への IgA 産生に關与する pIgR 遺伝子の発現変動を調べるために RT qPCR を行ったところ、FOS 摂食前と有意な変動は見られなかった。この結果は FOS による短期間での糞便中 IgA の増加が腸管内への排出が活性化したためでなく別のメカニズムが関わっていることが予想された。より詳細な解析を行うために FOS 摂食前および FOS 摂食後 1 日後の回腸および盲腸組織のマイクロアレイ解析を行った。いくつかの遺伝子においては変動が見られたものの、どちらの組織においても遺伝子変動は大きくなく、FOS 摂取後短期間での宿主遺伝子変動は大きなものでないことが示唆された。しかしながら、今回の解析では FOS 摂取 1 日後のサンプルのみ解析を行ったため、FOS の影響の現れる時間の個体差や状況の違いなどにより結果がうまく評価できていなかった可能性がある。今後複数の時間での遺伝子解析が必要であるかもしれない。

同様に小腸、大腸組織および胸腺、脾臓等の各種臓器においていくつかの IgA 産生に關与する細胞種についてフローサイトメーターによる解析を行ったが有意な変動は見られなかった。

(4) 以上のことからプレバイオティクスであるフラクトオリゴ糖の摂取は短期的に腸内環境を劇的に変更する効果が認められたがこれまでの FOS 長期摂取での報告にあるような宿主側での変動は見られなかった。これは腸内環境の変動が宿主側での遺伝子変動および腸管免疫系に影響を与えるためのタイムラグが存在するためであると考えられる。今後はこのタイムラグを加味した上で、宿主へ影響を与えるメカニズムを解明していきたいと考えている。

また複数回の試験により、FOS により変動する腸内細菌種が異なる場合も多く、ある 1 種の菌が重要であるというより菌叢全体としての機能の変化が重要であると考えられる。今回の研究によりフラクトオリゴ糖の摂取における免疫系への反応は腸内細菌および代謝物等の変化を受け、それらが宿主へと影響を与えることで生じる現象であることが示されている。つまり FOS の摂取、腸内細菌叢の構成の変化、代謝産物の構成の変化、などが時系列で生じており結果として宿主に対しての効果を生み出している。

近年の腸内細菌とヒトの健康を考える上で、現象のみでなく複雑系として腸内環境を捉え、これらを紐解くことが重要であろうと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 完 (KATO, Tamotsu)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・特別研究員
研究者番号：20632946

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()