

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07790

研究課題名(和文) 腸内環境と腸管透過性との関連に着目した難消化性糖質による腸管免疫修飾機序の解析

研究課題名(英文) Immunomodulatory effects of non-digestible polysaccharides- a focus on their relationships to luminal environments and gut permeability

研究代表者

日野 真吾 (Hino, Shingo)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：70547025

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)：フラクトオリゴ糖(FOS)摂取に伴う腸内環境と宿主の腸管免疫機能との関連についてラットで解析を行った。フラクトオリゴ糖を添加した半精製飼料摂取初期に観察されるIgA分泌促進作用には軽度な粘膜炎症が関与し、盲腸でのムチン層の崩壊も観察された。一方、これら一連の応答は長期摂取時や非精製飼料摂取時には全てキャンセルされた。また、一連の応答は乳酸の蓄積とこれに伴う極端なpH低下といった腸内環境の変化によって誘導されると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フラクトオリゴ糖をはじめとする難消化性糖類の摂取は動物実験において免疫調節作用を示すことが報告されており、ヒトでの有用性についても研究が進められている。しかしながら、その作用機序は明確になっていない。本研究からフラクトオリゴ糖の免疫調節作用は、急速な発酵に伴う腸内環境の変化が軽度な粘膜炎症が関与することが明らかとなった。一方で、これらの応答は、長期摂取時やヒトの食事に比較的那物性等が近い非精製飼料では観察されないことが明らかとなった。以上から、難消化性糖類の摂取効果については、その摂取方法や添加する食事の種類を考慮して摂取する必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Relationships between immune parameters and the environmental factors were examined in the cecum of rats fed the diet containing fructooligosaccharides. Mucosal inflammation was involved in the IgA secretion promoting effect observed in the early stage of ingestion of the semi-purified diet containing fructooligosaccharides, and the mucin layer was disrupted in the cecum. On the other hand, these series of responses were all canceled during long-term intake and non-purified feed intake. In addition, a series of responses was considered to be induced by changes in the intestinal environment such as the accumulation of lactic acid and the accompanying drastic pH decrease.

研究分野：栄養化学

キーワード：フラクトオリゴ糖 腸内細菌叢 腸管免疫 IgA ラット

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難消化性オリゴ糖の摂取は乳酸産生菌数を増加させることや発酵産物である短鎖脂肪酸を増加させることが多数報告されている。このような大腸内環境の変化は、有害菌やタンパク質腐敗化合物の産生の減少を導くことや大腸上皮細胞にエネルギー基質を供給することで腸管恒常性の維持に寄与すると考えられている。これらのことに加え、ここ数年の研究で腸内細菌叢およびその代謝物が腸管免疫系の正常な発達、分化、機能発現やその恒常性維持に必須であることが急速に明らかになってきている。すなわち、大腸 IgA 産生に特定の細菌種が促進的に働くこと (Kawamoto et al., 2014) や酪酸が結腸の制御性 T 細胞の分化・増殖を誘導することなどが動物試験により明らかにされている。こうした背景から、整腸作用を有する食品素材として広く用いられている消化性オリゴ糖は、腸内細菌叢の改変を介して腸管免疫を制御しうる食事因子として注目されている。実際、動物試験では FOS やガラクトオリゴ糖などの摂取が、アレルギー応答を抑制すること、大腸炎からの回復を促進すること、IgA 分泌量を増加することなどが示されている。しかしながら、これらの作用機序は明らかになっていない。また、臨床試験も乳幼児、成人で行われているが、効果の有無については試験により結果が異なっており、コンセンサスが得られていない。したがって、難消化性オリゴ糖の摂取による免疫調節作用の理解と応用を達成するためには、難消化性オリゴ糖の摂取に伴う腸内環境の変化とそれに対する宿主応答を明らかにした上で、これらがどのように相互作用するのかを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本課題では、難消化性オリゴ糖の腸管免疫系への作用の理解とその応用を目指し、FOS 摂取初期に観察される腸管透過性亢進および粘膜炎症惹起の機序とこれら現象の普遍性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) FOS の摂取期間に伴う IgA 分泌、サイトカイン応答および腸内環境の変動

Wistar 系雄ラット(6 週齢)に AIN-76 組成に準じた半精製飼料と、これに FOS を 6% 添加した飼料を 7 または 56 日摂取させた。盲腸内容物の pH, IgA, 胆汁酸および有機酸濃度、盲腸粘膜のサイトカイン発現量、また盲腸組織ミクロペルオキシダーゼ (MPO) 活性を測定した。特に、FOS 摂取 7 日目には盲腸粘膜の IgA 形質細胞を FACS 解析で、pIgR タンパク質を western blot で測定した。FOS 摂取 7, 56 日目には経口投与した Cr-EDTA の尿中排泄量および腸間膜リンパ節 (MLN) への細菌透過量から腸管透過性の変動を測定した。また、同 7 日目には盲腸内容物を含む盲腸組織切片 (カルノア固定) を作成し、AB 染色および FISH-Muc2 抗体染色により盲腸上皮組織のムチン層を観察した。FOS 摂取 7, 56 日目には経口投与した Cr-EDTA の尿中排泄量および腸間膜リンパ節 (MLN) への細菌透過量から腸管透過性の変動を測定した。

(2) FOS の摂取期間に伴う腸内環境および腸内細菌叢の変動

Wistar 系雄ラット(6 週齢)に AIN-76 組成に準じた半精製飼料と、これに FOS を 6% 添加した飼料を 7 または 56 日摂取させた。盲腸内容物の pH, 有機酸濃度の測定および腸内細菌叢の網羅解析を行った。

(3) 飼料の基本組成の違いが FOS 短期摂取時の IgA 分泌およびサイトカイン応答および腸内環境に及ぼす影響

Wistar 系雄ラット(6 週齢)に AIN-76 組成に準じた半精製飼料(SP)または非精製飼料(NP)、これらに FOS を 6% 添加した飼料を 9 または 10 日摂取させた。盲腸内容物の pH, IgA および有機酸濃度および腸内細菌叢を測定した。盲腸粘膜のサイトカイン発現量、盲腸組織 MPO 活性を測定した。さらには、Cr-EDTA の糞便排泄量を指標とした消化管通過時間を測定した。

4. 研究成果

(1) FOS 短期摂取時における IgA 分泌およびサイトカイン応答

FOS 摂取初期 7 日の盲腸 IgA 濃度は、対照に比べ 10~20 倍上昇し、盲腸粘膜の IgA 形質細胞数と pIgR タンパク質の増加が認められた (図 1)。サイトカイン発現量は、IFN- γ , TNF- α , TGF- β に加え IL-10, 12, 17 の有意な上昇を示した (図 2)。また、尿中 Cr-EDTA 排泄量の有意な増加、MLN への細菌透過の顕在化、盲腸組織 MPO 活性の有意な上昇が認められた (図 3)。一方、FOS 摂取 56 日目の盲腸 IgA 濃度は対照と差がなく、FOS 摂取初期に認められた一連の応答はすべてキャンセルされた。明らかに、FOS 摂取初期の IgA 分泌促進作用には軽度な粘膜炎症が関与する。この粘膜炎症は、盲腸粘膜の密接結合関連タンパク質の変動や、盲腸内容物自由水が Caco2 細胞バリア機能に及ぼす影響の違いから説明することが出来なかった (data not shown)。一方、FOS 摂取 3, 7 日目では、盲腸上皮組織と内容物を隔てる明確なムチン層が観察されないことが明らかになった (図 4)。現在のところ、このムチン層の崩壊が上皮組織への細菌の接触頻度を高め、粘膜炎症を惹起すると考えている。また、主要な発酵産

物が短鎖脂肪酸となり pH も上昇する長期摂取時にはこれらの応答は観察されないことから、FOS 摂取初期の急速な発酵による乳酸の蓄積とこれに伴う極端な pH 低下に特徴づけられる一種の dysfermentation により粘膜炎症が惹起されると考えられた。

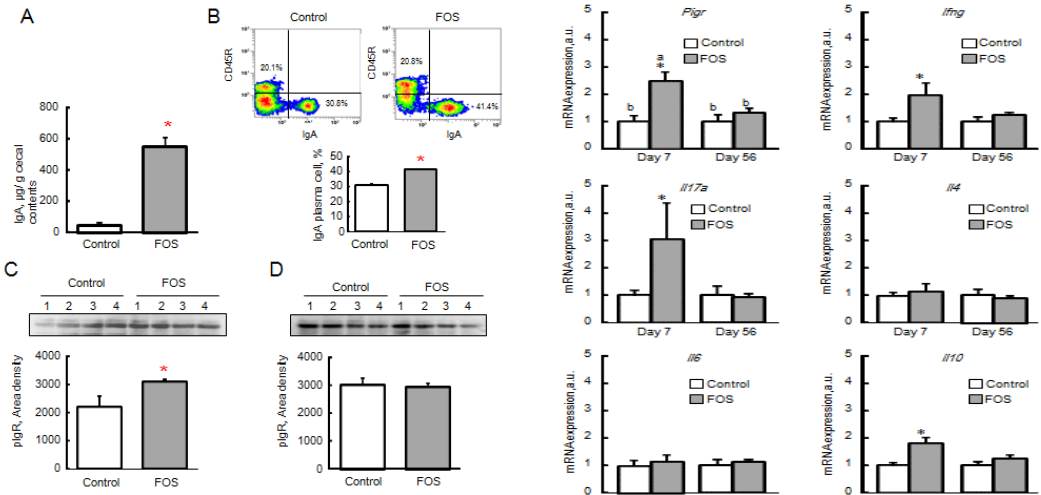


Figure 1 Cecal content IgA concentrations (A), number of IgA plasma cells in the cecal lamina propria (B), and amounts of pIgR protein in the cecum (C) and ileal mucosa (D) in male Wistar rats fed the FFP diet or a diet containing 60 g of FOS/kg for 7 d. Values are means \pm SEMs, n = 14 (IgA), n = 6 (IgA plasma cells) or n = 4 (pIgR). *Different from FFP, P<0.05.

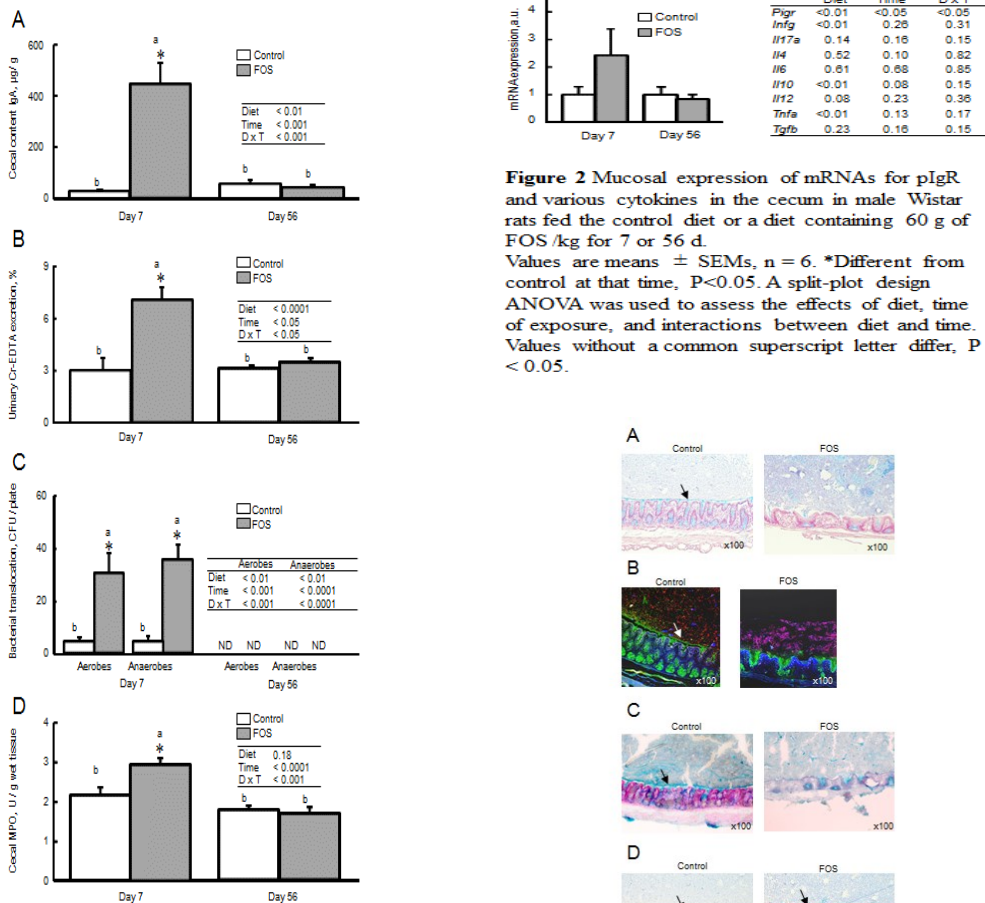


Figure 2 Mucosal expression of mRNAs for pIgR and various cytokines in the cecum in male Wistar rats fed the control diet or a diet containing 60 g of FOS/kg for 7 or 56 d. Values are means \pm SEMs, n = 6. *Different from control at that time, P<0.05. A split-plot design ANOVA was used to assess the effects of diet, time of exposure, and interactions between diet and time. Values without a common superscript letter differ, P < 0.05.

Figure 3 Cecal IgA concentrations (A), urinary Cr-EDTA excretion (B), bacterial translocation into MLNs (C), and MPO activity in the cecal tissue (D) of male Wistar rats fed the FFP diet or a diet containing 60 g of FOS/kg for 7 d or 56 d. Values are means \pm SEMs, n = 6. *Different from control at that time, P<0.05. A split-plot design ANOVA was used to assess the effects of diet, time of exposure, and interactions between diet and time. Values without a common superscript letter differ, P < 0.05. CFU, colony forming units; MLN, mesenteric lymphonode; MPO, myeloperoxidase; ND, not detected.

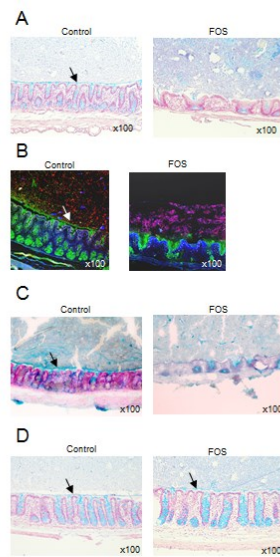


Figure 4 Cecum thin sections stained with Alcian blue (A, D); FISH that enable visualization of bacteria (red-purple) in combination with staining for Muc2 (green) (B); and cryo-thin sections stained with toluidine blue (C) prepared from rats fed the FFP or a diet containing 60 g of FOS/kg for 7 or 56 d (Expt. 3). Photos in A, B, and C show the tissues from rats fed the respective diets for 7 d, and photos in D show the tissues from rats fed the respective diets for 56 d. Black (A, C, D) and white (B) arrows indicate the mucus layer. Magnification, $\times 100$.

(2) FOS の摂取期間に伴う腸内環境および腸内細菌叢の変動

菌種の多様性 (α -diversity)は、対照群に比べ FOS 群で半減し、この多様性の減少は摂取 8wk でも回復しなかった (図 5)。この結果は、FOS 摂取によって腸内細菌叢を構成する半数の細菌種が死滅することを示しており、FOS 摂取によって腸内細菌叢が新たな構成へ遷移したことを意味している。一方、構成比を加味した菌種構成の類似度 (β -diversity)は、対照群と FOS 摂取 1wk 群間に比べ、対照群と FOS 摂取 8wk 群間で高く (図 5)、主要な細菌種は摂取期間の延長により復元し、FOS 摂取 8wk では、これらの細菌種をコアとした腸内細菌叢が再構築されたと考えられる。ある意味、腸内細菌叢の恒常性を示しているのかもしれない。

FOS 群で構成比の上位 20 を占める菌種を対象にして乳酸、酢酸、酪酸濃度との相関解析を行い、乳酸関連菌 13 菌種および酢酸・酪酸関連菌 15 菌種を同定した (図 6)。これらの菌種が、FOS 摂取初期における高濃度の乳酸、または、長期摂取における高濃度の酪酸に関連すると考えられた。ただし、ヒト腸内細菌叢での主要な酪酸産生菌は、*Roseburia faecis* を除き検出されなかった。ラットでは *R. faecis* に加え、酪酸産生菌である *Allobaculum stercoricanis*, *Eubacterium trutuosum* および *Clostridium* 属が酪酸産生を代替していると推定された。また、*R. faecis* は酢酸資化菌であり、FOS 長期摂取時には酢酸から酪酸を産生する metabolite-cross feeding が成立していると考えられた。一方、FOS 長期摂取時の乳酸濃度の低下は、*Bifidobacterium* 属(80%減)および *Lactobacillus* 属(90%減)の減少によると考えられた。

FOS 摂取ラットの腸内細菌叢は摂取期間の延長に伴い乳酸産生菌型から酪酸産生菌型に遷移する。この腸内細菌叢の遷移が、有機酸パターンが変化する要因であると考えられた。

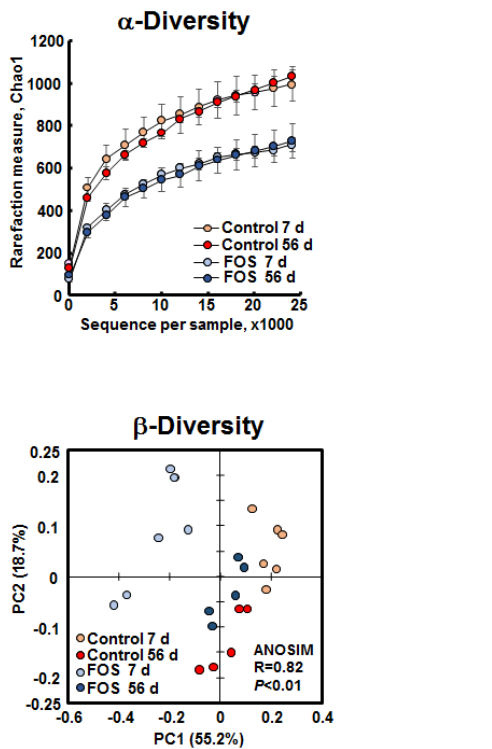


Figure 5. Rarefaction curves (α -diversity curves) and principal coordinate analysis plot based on weighted UniFrac (β -diversity) of the cecal contents in male Wistar rats fed the control diet or 60 g of FOS / kg diet for 7 or 56 d. Values are means \pm SEMs, $n = 6$. A two-way repeated measures ANOVA was used to assess the effects of FOS, diet, time of exposure, and interactions between them (α -diversity curves). ANOSIM was used to detect statistical significances between microbial compositions in different dietary groups (β -diversity).

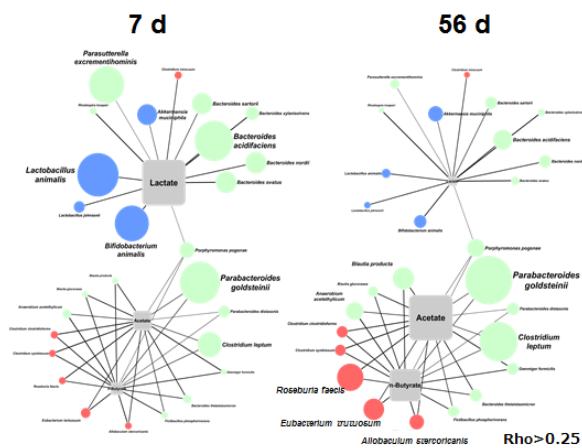


Figure 6. Correlation network between organic acid concentrations and microbiota of the cecal contents in male Wistar rats fed 60 g of FOS / kg diet for 7 or 56 d. Sizes of circles and squares show relative abundance of species and organic acid concentrations, respectively. An edge represents a spearman's rank correlation with a correlation coefficient ($Rho > 0.25$). Line types indicates P value of spearman's rank correlation (solid line, $P < 0.05$, dotted line, $0.05 \leq P < 0.10$). Blue and red circles indicate lactate and butyrate producing bacteria.

(3) 飼料の基本組成の違いが FOS 短期摂取時の IgA 分泌およびサイトカイン応答および腸内環境に及ぼす影響

FOS 添加は、SP において乳酸とコハク酸の蓄積をともなう強い酸性発酵をもたらしたが、NP では短鎖脂肪酸が主な代謝産物であった。尿中 Cr-EDTA 排泄を指標にした腸管透過性、腸管リンパ節への細菌転移、盲腸粘膜における MPO 活性およびサイトカイン遺伝子の発現は、SP に比べ FOS 添加 SP で有意に高かった (図 7)。しかし、これら一連の変動は NP と FOS 添加 NP の間では認められなかった。FOS 添加は、SP において盲腸上皮ムチン層を崩壊させたが、NP では認められなかった (図 8)。SP に比べ FOS 添加 SP では消化管通過時間が 3 倍長くなったが、NP と FOS 添加 NP ではそのような関係は無かった (図 9)。FOS 添加 SP では、種レベルでの腸内細菌の多様性が著しく低下した (図 10)。本試験の知見は、FOS 摂取に

よる腸管透過性および盲腸粘膜炎症への影響は、SP と NP ではまったく異なることを示している。FOS 添加 SP で認められる腸管透過性の上昇は、強酸性を示す盲腸内容物の停滞により、盲腸上皮ムチン層が崩壊したことで生じた可能性が示唆された。また、これらの結果をヒトに外挿した場合、不消化性の成分を多く含む一般の食事に難消化性オリゴ糖を取り入れても免疫調節作用は期待できないと考えられる。一方、比較的不消化性の成分が少ない食事を摂取している乳幼児期については一定の効果を期待できるのではないかと考えられた。

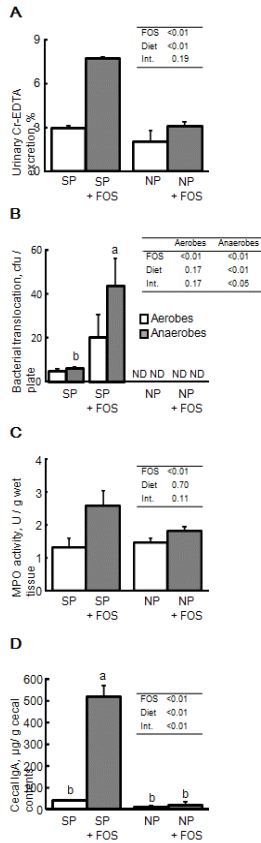


Figure 7. Urinary Cr-EDTA excretion (A), bacterial translocation into MLNs (B), MPO activity in the cecal tissue (C), and cecal IgA concentrations (D) of male Wistar rats fed one of the SP and NP with or without 60 g of FOS / kg diet for 9 d (experiment 1). Values are means \pm SEMs, $n = 6$. A two-way ANOVA was basically used to assess the effects of diet, time of exposure, and interactions between diet and time. When the interaction was significant, the multiple comparisons were further performed by Tukey-Kramer post hoc test. For cecal IgA concentrations and bacterial translocation, the nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare mean values because of unequal variance. The multiple comparisons were further performed by Steel-Dwass test. Values without a common superscript letter differ, $P < 0.05$.

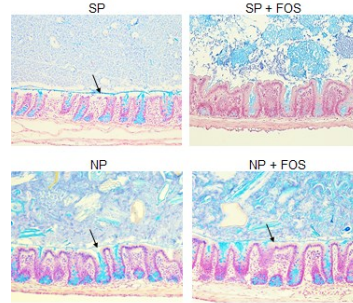


Figure 8. Cecum thin sections stained with Alcian blue prepared from male Wistar rats fed one of the SP and NP with or without 60 g of FOS / kg diet for 7 d. Black arrows on the photos indicate mucus layers between the epithelium and cecum digesta.

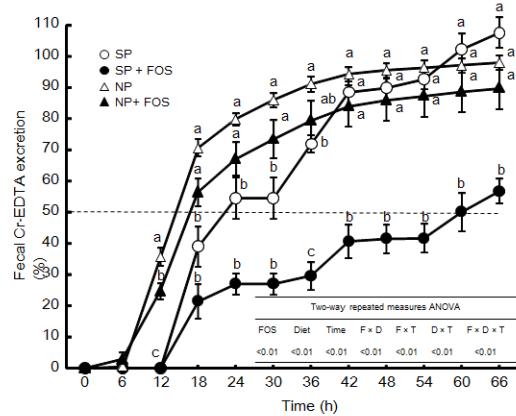


Figure 9. Fecal Cr-EDTA excretion in male Wistar rats fed one of the SP and NP with or without 60 g of FOS / kg diet for 7 d. Values are means \pm SEMs, $n = 6$. A two-way repeated measures ANOVA was used to assess the effects of FOS, diet, time of exposure, and interactions between them. When the interaction was significant, the multiple comparisons were further performed by Tukey-Kramer post hoc test. Values without a common superscript letter differ, $P < 0.05$.

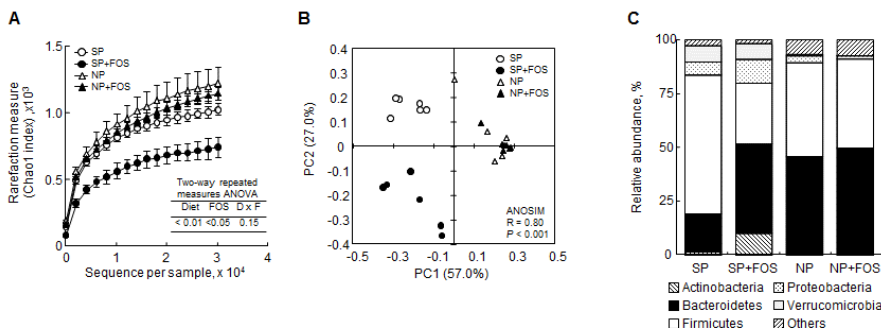


Figure 10. Rarefaction curves (α -diversity curves) (A), principal coordinate analysis plot based on weighted UniFrac (β -diversity) (B), and microbial compositions at the phyla level (C) of the cecal contents in male Wistar rats fed one of the SP and NP with or without 60 g of FOS / kg diet for 7 d. Values are means \pm SEMs, $n = 6$. A two-way repeated measures ANOVA was used to assess the effects of FOS, diet, time of exposure, and interactions between them (α -diversity curves). ANOSIM was used to detect statistical significances between microbial compositions in different dietary groups (β -diversity).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 GENDA Tomomi, KONDO Takashi, HINO Shingo, SUGIURA Shunsaku, NISHIMURA Naomichi, MORITA Tatsuya	4. 巻 64
2. 論文標題 The Impact of Fructo-Oligosaccharides on Gut Permeability and Inflammatory Responses in the Cecal Mucosa Quite Differs between Rats Fed Semi-Purified and Non-Purified Diets	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 357 ~ 366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3177/jnsv.64.357	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Genda Tomomi, Sasaki Yuta, Kondo Takashi, Hino Shingo, Nishimura Naomichi, Tsukahara Takamitsu, Sonoyama Kei, Morita Tatsuya	4. 巻 147
2. 論文標題 Fructo-oligosaccharide-Induced Transient Increases in Cecal Immunoglobulin A Concentrations in Rats Are Associated with Mucosal Inflammation in Response to Increased Gut Permeability	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 1900 ~ 1908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3945/jn.117.253955	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日野真吾, 源田知美, 森田達也
2. 発表標題 フラクトオリゴ糖摂取ラットにおける腸内細菌叢の遷移: metabolite-cross feedingの成立まで
3. 学会等名 日本食物繊維学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----