

令和 3 年 4 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05487

研究課題名(和文)高性能腸内細菌培養装置による生体大腸における異常腸内細菌叢の是正戦略を立てる

研究課題名(英文) Construction of strategy to remedy dysbiosis state using in vitro human colonic microbiota model

研究代表者

佐々木 建吾 (Sasaki, Kengo)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・客員准教授

研究者番号：50558301

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)：潰瘍性大腸炎は大腸の粘膜に炎症ができる病気であり、欧米のみならず日本でも患者数が増加してきているが、根治的治療は確立されていない。発症には腸内細菌叢の乱れが関連していることが近年、注目されている。一方、腸内細菌叢に関する評価は動物給餌試験やヒト介入試験によるin vivo系で行われてきたが、コストや倫理的制限の問題点が存在する。しかし、in vitro系による潰瘍性大腸炎の代謝プロファイルの再現は困難とされていた。そこで、本研究ではin vitro培養系ヒト腸内細菌叢モデルにて潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢を模した上でその代謝プロファイル、特に酪酸生成減を再現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本システムは潰瘍性大腸炎患者のヒト腸内細菌叢における種数や多様性を保持した世界初のモデルである。さらに今までの他のシステムである多連式システムでは再現が不可能であった酪酸生成の減少を、本システムは再現している。酪酸生成を実際のヒト腸管内で計測することは困難である。また、酪酸は制御性T細胞の生成を誘導して炎症を抑制することが知られている。本システムはLachnospiraceae科の減少とそれに付随する酪酸生成の減収を再現できる系であり、潰瘍性大腸炎患者の腸内環境を迅速に評価できる系である。

研究成果の概要(英文)：Ulcerative colitis is a disease that cause inflammation of the mucous membrane of the large intestine, and the number of patients is increasing not only in Europe and the United States but also in Japan, but no curative treatment has been established. In recent years, it has been noted that the onset is associated with disturbance of the intestinal flora. On the other hand, the evaluation of the intestinal flora has been performed in vivo by animal feeding tests and human intervention tests, but there are problems of cost and ethical restrictions. However, it has been difficult to reproduce the metabolic profile of ulcerative colitis by in vitro system. Therefore, in this study, we simulated the intestinal flora of patients with ulcerative colitis using an in vitro culture human intestinal flora model, and reproduced its metabolic profile, especially the decrease in butyric acid production.

研究分野：応用微生物学

キーワード：腸内細菌 潰瘍性大腸炎 培養系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1000 菌種以上、100 兆個にも及び腸内細菌叢 (腸内フローラ) は宿主に栄養分 (短鎖脂肪酸やビタミンなど) を供給して、腸管免疫系に作用して恒常性維持に重要な役割を果たしていることが知られている。正常な腸内細菌叢が攪乱された状態 (dysbiosis) は、腸管だけでなく腸管外さまざまな疾病に関与するとされている。

ある種の食品には疾病予防や回復、体調調整、老化抑制などの助けとなる成分が含まれており、これらの機能をもった食品が機能性食品とされる。食品成分の機能性評価は動物給餌試験やヒト介入試験の *in vivo* 系で行われてきたが、倫理的制限が低く繰り返し評価が可能な *in vitro* 系での腸管内の細菌叢を模したモデルの開発が待たれている。我々は神戸大学にて培養系ヒト大腸細菌叢モデル (KUHIMM: Kobe University Human Intestinal Microbiota Model) を開発した。本技術はヒト糞便を培養スターターとしている。KUHIMM は以下の特徴を有している。

培養後にヒト大腸内の菌種や菌多様性を保持していた、偏性嫌気性細菌が優勢であった、難培養とされている細菌種も増殖していた、代謝プロファイルを維持していた、すなわち、短鎖脂肪酸の構成比が実際のヒト大腸内に近いものであった。

2. 研究の目的

疾患患者の腸内細菌叢の dysbiosis 状態を構築することを目指した。潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis: UC) は大腸に限定されて炎症反応が過剰に進行する発症メカニズム不明の炎症性腸疾患であり、その根治的治療法は確立されていない。もともとは欧米で多いことが知られていたが、日本でも患者数は年々増加しており医療受給者交付数は現在 16 万人を超えている。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体の準備と KUHIMM の運転

13 人の健常人ボランティアおよび 13 人の UC 患者ボランティアより、臨床検体の提供を受けた。

KUHIMM の運転には 8 連培養装置 (Bio Jr. 8; ABLE, 東京) を使用した。

(2) 臨床検体および発酵液中より DNA 抽出を行った。すなわち、サンプルをフェノール・ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) と混合し、ガラスビーズを使用した物理的破碎により抽出した。クリーンアップ後に、DNA は TE buffer に溶出した。

細菌の 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域を標的としたプライマーを使用して、PCR 増幅した。PCR 産物は MiSeq シークエンサ (Illumina) に供して配列を得た。配列は QIIME により解析した。

KUHIMM 中の低級脂肪酸濃度は高速液体クロマトグラフに Aminex HPX-87H column を設置して検出した。

4. 研究成果

(1) UC 患者における異常な腸内細菌叢の再現

メタ 16S 解析を行った結果、健常人および UC 患者ともに細菌種数は臨床検体中のものが KUHIMM 発酵液中に再現されており、多様性 (細菌の多様性の指数) も再現されていた。一方、臨床検体における種数や多様性について、健常人と UC 患者で有意な差は認められず、この傾向は KUHIMM 発酵液中でも同様であった。全菌量も健常人と患者で有意な差は認められない。

ただし、臨床検体中において、細菌叢の構成は健常人と UC 患者で異なっていた。この腸内細菌叢の違いは、KUHIMM 中に再現されていた。DNA 配列の大部分は、Actinobacteria、Bacteroidetes、Firmicutes、Proteobacteria、Verrucomicrobia 門に属していた。科レベルで評価した結果、興味深い事に *Lachnospiraceae* 科に関連する菌の割合が健常人の臨床検体中に比べて UC 患者臨床検体中で減少しており、同様に KUHIMM 培養液中でも *Lachnospiraceae* 科に関連する菌の割合が UC 患者のもので減少していた (図 1)。過去の知見においても *Lachnospiraceae* 科の菌が UC 患者で減少することが報告されており、我々の知見と一致している。

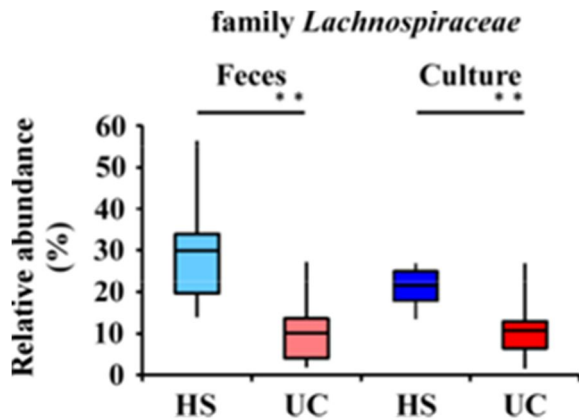


図1 *Lachnospiraceae* 科の割合。HS: healthy subject。Feces:臨床検体。Culture:KUHIMM 発酵液。**は統計的に有意な差があることを示す (P<0.05)。

(2) UC 患者モデルにおける酪酸生成の減少

短鎖脂肪酸は腸内細菌叢と宿主の健康を左右するシグナル物質となる。そのため、KUHIMM 発酵液中における健常人と UC 患者の短鎖脂肪酸の生成を調べた。発酵 30 時間後には酢酸が主要な産物であり次にプロピオン酸・酪酸が主要な産物であった。興味深いことに KUHIMM 発酵液中において、酪酸生成が UC 患者のもので健常人と比べて有意に減少していた (図2)。

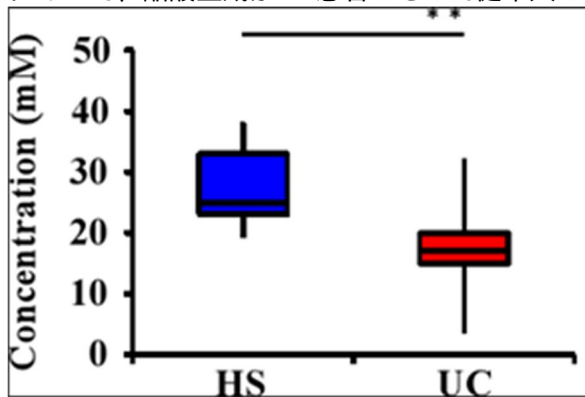


図2 KUHIMM 発酵液中における酪酸生成。**は統計的に有意な差があることを示す (P<0.05)。

Lachnospiraceae 科の菌は哺乳動物の腸管内において大部分を占めており、酪酸生成に重要な役割を果たしている。実際に KUHIMM において *Lachnospiraceae* 科の菌の割合と酪酸生成濃度には正の相関が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5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 Yoshida Naofumi, Sasaki Kengo, Sasaki Daisuke, Yamashita Tomoya, Fukuda Hajime, Hayashi Tomohiro, Tabata Tokiko, Osawa Ro, Hirata Ken-ichi, Kondo Akihiko	4. 巻 26
2. 論文標題 Effect of Resistant Starch on the Gut Microbiota and Its Metabolites in Patients with Coronary Artery Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 705 ~ 719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.47415	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 Sasaki Kengo, Inoue Jun, Sasaki Daisuke, Hoshi Namiko, Shirai Tomokazu, Fukuda Itsuko, Azuma Takeshi, Kondo Akihiko, Osawa Ro	4. 巻 14
2. 論文標題 Construction of a Model Culture System of Human Colonic Microbiota to Detect Decreased Lachnospiraceae Abundance and Butyrogenesis in the Feces of Ulcerative Colitis Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 1800555 ~ 1800555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/biot.201800555	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 Sasaki Daisuke, Sasaki Kengo, Tsuge Yota, Kondo Akihiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Less biomass and intracellular glutamate in anodic biofilms lead to efficient electricity generation by microbial fuel cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnology for Biofuels	6. 最初と最後の頁 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13068-019-1414-y	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 SHINOHARA Ryohei, SASAKI Kengo, INOUE Jun, HOSHI Namiko, FUKUDA Itsuko, SASAKI Daisuke, KONDO Akihiko, OSAWA Ro	4. 巻 38
2. 論文標題 Butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene associated with the genus Roseburia is decreased in the gut microbiota of Japanese patients with ulcerative colitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 159 ~ 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12938/bmfh.18-029	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 Sasaki Daisuke, Sasaki Kengo, Kadowaki Yasushi, Aotsuka Yasuyuki, Kondo Akihiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Bifidogenic and butyrogenic effects of young barely leaf extract in an in vitro human colonic microbiota model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13568-019-0911-5	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 生田直子、篠原涼平、佐々木大介、佐々木建吾	4. 巻 60
2. 論文標題 培養系ヒト腸内細菌叢モデルKUHIMMを利用した食物繊維の影響評価	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 New Food Industry	6. 最初と最後の頁 37-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 佐々木大介、佐々木建吾、近藤昭彦、大澤朗	4. 巻 22
2. 論文標題 in vitro培養システムによる食物繊維のヒト腸内細菌叢への影響評価	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本食物繊維学会誌	6. 最初と最後の頁 63-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 佐々木建吾・吉田尚史・佐々木大介・大澤朗・山下智也・近藤昭彦
2. 発表標題 冠動脈疾患患者大腸フローラモデルによる候補投与物の調査
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木建吾・佐々木大介・森田仁彦・柘植陽太・近藤昭彦
2. 発表標題 バイオ電気化学的システムによる複合微生物系の制御
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kengo Sasaki
2. 発表標題 Regulation of Complex Microbial Communities to Develop a Sustainable and Healthy Society
3. 学会等名 KSBB Fall Meeting and International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kengo Sasaki
2. 発表標題 Designing microbial consortium for efficient utilization
3. 学会等名 Asian Synthetic Biology Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木建吾
2. 発表標題 健康・持続可能社会の構築に向けた複合微生物系（ヒト腸管・バイオガス発酵槽内）の制御
3. 学会等名 日本生物工学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木建吾
2. 発表標題 In vitro培養系ヒト腸内細菌叢モデルによる潰瘍性大腸炎患者の代謝プロファイル異常の検出
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kengo Sasaki
2. 発表標題 A Model Culture System for the in Vitro Human Colonic Microbiota of Ulcerative Colitis
3. 学会等名 International Conference Microbiome Engineering (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 星奈美子
2. 発表標題 単槽培養系ヒト大腸細菌叢モデルを利用した潰瘍性大腸炎の病態評価の検討
3. 学会等名 第22回腸内細菌学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 腸内環境改善組成物	発明者 盤若明日香・坪田潤・佐々木建吾・佐々木大介・近藤昭	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-065869号	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 整腸用組成物、善玉菌の培養方法、並びに飲食品、医薬部外品、又は医薬品	発明者 佐々木建吾・佐々木大介・門脇靖司・青塚康幸	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-158205号	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 食物繊維の哺乳動物腸内での分解性能または有機酸生産能を評価する方法	発明者 佐々木大介・佐々木建吾・近藤昭彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-56736号	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/sasaki_kengo.html

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
研究 分 担 者	星 奈美子 (Hoshi Namiko) (40645214)	神戸大学・医学部附属病院・講師 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------