

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11087

研究課題名(和文) 飲酒習慣ならびに他の食習慣因子による腸内細菌叢の影響に関する臨床栄養学研究

研究課題名(英文) Alteration of oxidative-stress and related marker levels in mouse colonic tissues and fecal microbiota structures with chronic ethanol administration

研究代表者

大平 英夫 (Ohira, Hideo)

神戸学院大学・栄養学部・准教授

研究者番号：40351762

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)：マウスへのエタノール慢性経口投与は、結腸組織への酸化ストレスレベル上昇を誘導した。同様に炎症レベルは増加し、炎症抑制に関する制御性T細胞レベル低下を伴っていた。炎症性腸疾患で観察される菌叢構造と類似した腸内細菌叢変化が観察され、これは慢性エタノール摂取による結腸環境変化が、酸化ストレスの持続的産生に大きく関与することが示唆された。

併せて、終末糖化産物(AGEs)およびそれらの受容体(RAGE)レベルの上昇を誘導する結果を示し、エタノール継続摂取による大腸への慢性炎症、がん誘導は、結腸組織中の酸化ストレス増加、RAGEを介した炎症機序が部分的に寄与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

習慣的な多量飲酒は大腸がん発症リスクを増大させる一方、その要因については未だ不明な点が多い。本研究成果より、長期アルコール摂取が結腸内にて酸化ストレス増加を誘導し、腸内細菌叢構造を変化させることを示した。これらは、結腸組織への終末糖化産物蓄積の寄与も関わっていると推察された。今後、抗酸化作用を有した毎日の食習慣アプローチより、飲酒による慢性大腸炎、がん発症予防に繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：Chronic oral administration of ethanol in mice resulted in the elevation of colonic levels of oxidative stress markers, and this was consistently accompanied by elevated levels of inflammation-associated markers and a decreased level of regulatory T (Treg) cells. It also resulted in an alteration of mouse fecal microbiota structures, reminiscent of the alterations observed in human inflammatory bowel disease, and this appeared to be consistent with the proposed sustained generation of oxidative stress in the colonic environment during chronic ethanol consumption. Chronic ethanol administration results in elevated levels of advance glycation end products and their receptors (RAGE) in the colonic tissues in mice is also shown. Thus, enhancement of this pathway likely exacerbates the ethanol-induced inflammatory states of colonic tissues and might at least partly contribute to the pathogenesis of chronic colitis, ethanol-related colorectal cancer.

研究分野：臨床栄養学

キーワード：アルコール 飲酒習慣 腸内細菌 酸化ストレス 大腸がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

疫学研究より、習慣的多量飲酒は大腸がん発症リスク因子であり、その代表症例として、アルコール依存症患者（ア症患者）があげられるが、その発がん機序については不明な部分が多い。これまで、発がん物質に認定されているアセトアルデヒド（AcH）が、多量飲酒より腸管内に産生され、大腸がん発症の主要因であると信じられてきた。代表者の共同研究者である中山らのグループは、ア症患者と健常者の腸内細菌叢構造解析の結果、ア症患者では、偏性嫌気性菌の相対比減少と、通性嫌気性菌が増大することを報告し、加えてア症患者糞便は AcH 産生能が低下することを見出した。腸内細菌叢構造維持は、腸管免疫、大腸がん発症に深く関与することが分かっている。以上より、習慣的多量飲酒による大腸発がん罹患リスク増大が、これまで信じられてきた仮説と異なり、酸化ストレス(ROS)と炎症を介した偏性嫌気性菌減少による腸内細菌叢異常が寄与している可能性を検証する必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、エタノール(EtOH)慢性投与条件下における腸内細菌叢異常を誘導する詳細機序を、マウス動物実験により検証することを目的とする。研究分担者の報告に基づき、EtOH 慢性投与により大腸内 ROS 誘導が示唆されたことから、マウス腸内細菌叢の構造変化、炎症反応、それに伴う ROS 発生機序に注目し調査を行う。併せて、EtOH 誘導による ROS 産生の新規機序としてアルコール由来終末糖化産物（AGEs）増加との関連性について検証を行う。

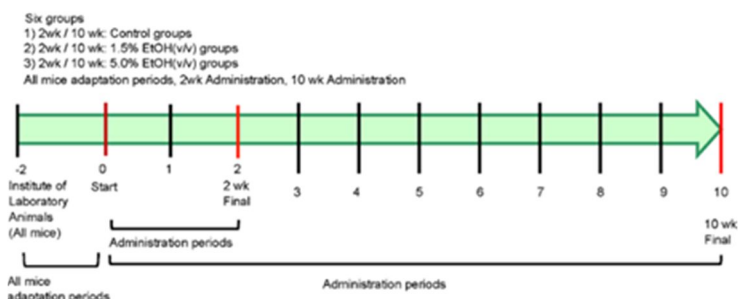
3. 研究の方法

(1) 動物実験手法

すべての動物実験は、神戸学院大学 動物実験 倫理委員会によって承認された(承認番号 A17-54)。日本学術会議による動物実験ガイドラインを遵守し、本研究で使用されたすべての動物は、痛みおよび苦痛を最小限に抑えるための手法を用いた。C57BL/6Ncr 雄マウス（6 週齢）を入手し、すべてのマウスは、ケージごと 1 匹ずつ、神戸学院大学動物実験施設 SPF レベル動物飼育室にて、飼育条件[23~24℃、12 時間の明暗サイクル(点灯：午前 8 時-午後 8 時)]にて飼育した。動物実験施設は、年 2 回、細菌、ウイルス、寄生虫を対象とした微生物検査を実施し、期間中すべて陰性結果である。実験期間は、食餌と水は自由摂取とし、飼育室入室開始および介入期間を通して、AIN93 (M) を食餌飼料として用いた。

(2) 研究デザイン

8 週齢マウスは 3 群（8 匹/群）ヘランダムに割当て、各群は下記条件より毎日経口投与した。1.0 mL 蒸留水、1.0 mL 1.5%EtOH (v/v)、1.0 mL 5.0%EtOH (v/v)。介入期間中、統一した EtOH 継続摂取を実施するため、シリコンゲージを用い、8 週齢マウスに対し、1 日 1 回経口投与を行った。評価に用いるサンプルについては、10 週齢または 18 週齢期より回収を行った



(図1)

図1 研究デザイン

上記施設 SPF レベル実験室にて経口投与を行った。5.0%EtOH 群 10 週介入マウスのうち 1 匹は、重度消耗が観察されたため、人道的エンドポイントより、研究より除外した。介入期間に達した動物は、麻酔気化器を使用し、推奨ガイドラインに従ってイソフルランによる吸入麻酔下にて以下のサンプルを採取した（血液、肝臓、盲腸、および結腸）。これらは、組織学的、生化学的、蛋白質発現および遺伝子発現解析のために使用した。

(3) 生化学検査

10 IU/mL ヘパリンナトリウム処理血液は、遠心分離より血漿を得た。血漿アラニンアミノトランスフェラーゼおよびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性、ならびに血漿トリアシルグリセロール (TG) 濃度を測定した。肝組織にホモジナイザー用い、組織中脂質抽出キットを用い、肝組織中の TG 濃度、ならびに蛋白定量試薬を用い、蛋白質濃度を測定した。

(4) 組織学検査

肝臓、結腸組織サンプルを標本化し、HE 染色、オイルレッド染色（肝臓）、トルイジンブルー染色（結腸）を行い、顕微鏡にて観察を行った。併せて、免疫組織化学染色を用い（ムチン 2、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG)、AGE 特異受容体 (RAGE)、4-ヒドロキシノネナール (4-HNE)）、標本を顕微鏡によって観察評価を行った。

(5) ELISA

組織中の蛋白質をホモジナイザー、蛋白質抽出試薬を用い、回収した。DNA も同様にホモジナイザー、DNA 抽出試薬を用い、回収した。回収した 8-OHdG、4-HNE、AGEs、および RAGE レベルは、市販 ELISA キットを用い、それぞれ定量した。

(6) qRT-PCR

組織中の全 RNA をホモジナイザー、RNA 抽出試薬を用い、回収した。cDNA 合成キットを使用した後、qRT-PCR より、TNF- α 、IL-6、IL-17A、MCP-1、および β -アクチン mRNA 発現レベルの定量評価を行った。

(7) マウス糞便 16SrRNA 遺伝子解析

介入 5 週目に回収したマウス糞便は、細菌ゲノム DNA 分析用専用試薬にて処理し、分析まで -80 °C にて保管した。糞便中遺伝子は、16SrRNA アンプリコン配列解析、アクセッション番号 DRA010530 で DDBJ に寄託され、菌叢構造における門と属の分類評価に適用された。

4 . 研究成果

(1) 体重と肝臓機能評価

8 週齢のマウスを、コントロール群、1.5%、5.0%EtOH 群に分類し、10 週間継続して毎日経口投与を行った。介入期間中、初期体重と最終体重、および体重変化において、3 群間に有意な差は無かった（図 2）。

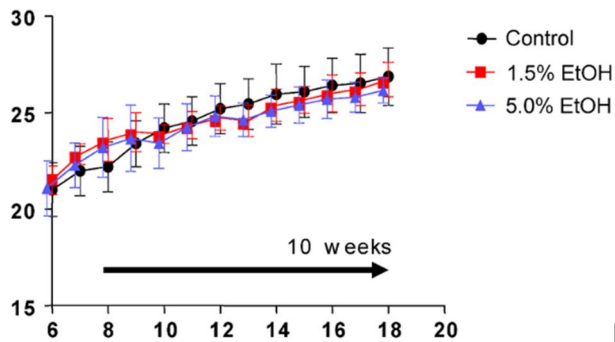


図2. 体重変化の経過

血液生化学検査ならびに、肝組織中 TG 濃度、肝組織標本の観察結果より、マウス EtOH 投与による、アルコール性肝炎、脂肪肝誘導が、濃度と介入期間依存性に進行したことを確認した。

(2) 結腸組織傷害評価

特殊染色、免疫染色による結腸への組織学評価より、投与 EtOH 濃度と介入期間依存性に、結腸粘膜層、粘液分泌、上皮傷害を伴う組織変化が共に観察された。

(3) 結腸組織の酸化ストレス評価

投与 2 週目から、両 EtOH 群がコントロール群と比、8-OHdG レベルの有意増加を認めた。しかし、10 週目では、5.0%群は 1.5%群より低値を示した。また、4-HNE レベルは、EtOH 濃度および介入期間依存性の増加が示された。

(4) 結腸組織のサイトカインとケモカイン mRNA 発現レベル評価

マウス結腸組織における炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6、および IL-17A) およびケモカイン MCP-1 mRNA レベルを、qRT-PCR を用い、3 群間にて比較評価を行った。介入 2 週目の TNF- α 、IL-6、IL-17A、および MCP-1 mRNA 発現レベルは、EtOH 濃度依存性に高値を示した。1.5%EtOH では、IL-17A を除く項目の発現レベルが介入 2 週目と比べ 10 週目で増加し、5.0%EtOH では、2 週目と比べ 10 週目で全ての項目の発現レベルは減少した。

(5) AGEs と RAGE 発現レベル評価

結腸組織 AGEs および RAGE レベルは、両 EtOH 群の継続投与より増加を示した。2 週後では、5.0%EtOH 群の AGEs 発現レベルは、コントロール、1.5%EtOH 群に比べ有意増加を認めた。しかし、5.0%EtOH 群の、10 週後 AGEs レベルは、投与 2 週後に比べ、その値は低値を示した。一方、1.5%EtOH 群では、投与期間依存性に上昇する傾向が観察された。RAGE レベルは、AGEs と同様の結果が得られた

(6) マウス糞便腸内細菌叢の評価

次に、3 群間における介入 5 週目の糞便腸内細菌叢について、門レベルにて評価を行った。コントロール群に共通する門は、相対量の多い順に、*Firmicutes*、*Bacteroidetes*、および *Deferribacteres* 門であり、これは、1.5%EtOH および 5.0%EtOH 群でも同様の結果が確認できた。コントロール群に比べ、*Firmicutes* 門は、1.5%EtOH 群で有意減少を、*Deferribacteres* 門は、両群共に有意減少が観察された。一方、*Proteobacteria* 門の相対量は、コントロール群に比

べ、両群で有意増加が観察された。

以上より、本研究結果の要約ならびに、そこから得られた仮説を図3に示す。

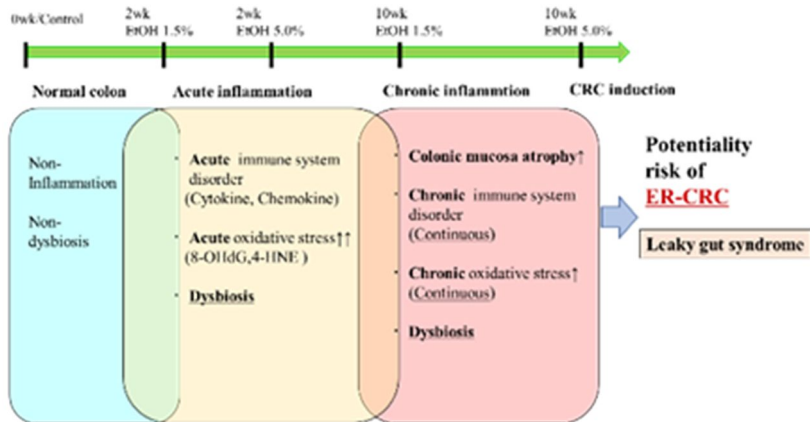


図3 本研究結果の要約

マウスへの EtOH 慢性経口投与は、結腸組織の病変を認めた。これは、ROS レベル増加誘導、炎症関連マーカーレベル増加と一致するものであった。マウス糞便中の腸内細菌叢構造は、ヒト炎症性腸疾患で観察される変化と類似した、異常な菌叢構造の変化をもたらし、これは慢性的なエタノール摂取により、結腸環境での酸化ストレス増加が大腸がんの誘導要因とする、我々の仮説を裏付ける結果が示唆された。加えて、慢性エタノール投与により、結腸組織への AGEs、RAGE レベル上昇を誘導する結果を示すことができた。RAGE を介すシグナル経路は、慢性大腸炎および癌発症との関連性が報告されている。したがって、酸化ストレス、及び RAGE、を介した慢性炎症経路は、エタノール誘発慢性腸炎と、大腸がん発症の病因に寄与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hideo Ohira, Atsuki Tsuruya, Daiki Oikawa, Wao Nakagawa, Rie Mamoto, Masahira Hattori, Toshiyuki Waki, Seiji Takahashi, Yoshio Fujioka, Toru Nakayama	4. 巻 16(2):e0246580
2. 論文標題 Alteration of oxidative-stress and related marker levels in mouse colonic tissues and fecal microbiota structures with chronic ethanol administration: Implications for the pathogenesis of ethanol-related colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One .	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0246580.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hideo Ohira, Toru Nakayama, Wao Nakagawa, Rie Mamoto, Yoshio Fujioka
2. 発表標題 Alteration of oxidative-stress and related marker levels in mouse colonic tissues and fecal microbiota structure with chronic ethanol administration
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Atherosclerosis :ISA 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大平英夫、中山亨、筒井輪央、眞本利絵、藤岡由夫
2. 発表標題 長期エタノール投与マウスの結腸組織への酸化ストレス誘導の影響について
3. 学会等名 第41回日本臨床栄養学会総会・第40回日本臨床栄養協会総会 第17回大連合大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 葉石かおり、浅部伸一；第3章担当：がんのリスクは酒でどれくらい上がるか	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日経BP	5. 総ページ数 296, p122-141(担当)
3. 書名 名医が教える飲酒の科学 一生健康で飲むための必修講義	

〔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
研究 分担 者	中山 亨 (Nakayama Toru) (80268523)	東北大学・工学研究科・教授 (11301)	

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
---------	---------