

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19721

研究課題名(和文) 習慣的多量飲酒による大腸疾患のリスク増大への腸内細菌の関わり

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

中山 亨(Nakayama, Toru)

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：80268523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000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、結腸組織の酸化ストレスと炎症のレベルを上昇させ、炎症抑制に関わる制御性T細胞のレベルを低下させた。エタノール慢性経口投与にともなう腸内菌叢構造変化を調べたところ、炎症性腸疾患で観察されるのと同様な変化が観察され、これには前述の結腸組織の酸化ストレスの持続的産生が関わることを示唆された。エタノール慢性経口投与はまた、結腸組織の終末糖化産物およびそれらの受容体のレベルの上昇をもたらした。以上のことから、慢性エタノール摂取による大腸への慢性炎症やがん誘導は、結腸組織中の酸化ストレス増加、終末糖化産物受容体を介した炎症機序が関わることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疫学的研究により、習慣的な多量飲酒が大腸がん発症リスクを増大させることが分かっているが、そのメカニズムについては未だ不明な点が多い。本研究の成果から、習慣的多量飲酒が結腸内にて酸化ストレス増加を慢性的に誘導し、腸内細菌叢構造を変化させることが示唆された。また、これらに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。抗酸化作用を有する食品成分を毎日摂取するような食習慣をとることによって、習慣的多量飲酒に起因する慢性大腸炎・がん発症の予防が可能となるかもしれない。

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 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 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：健康科学

キーワード：アルコール 飲酒習慣 酸化ストレス 終末糖化産物

1. 研究開始当初の背景

習慣的多量飲酒は各種の大腸疾患(慢性下痢症, 吸収障害による栄養失調, アルコール関連大腸発がん)の原因となる。こうした疾患の発症や進展に, 腸内細菌叢は重要な役割を果たすことが推定される。例えばアルコール関連大腸発がんとの関連では, 腸内細菌は, そのアルコールの酸化的異化によってアセトアルデヒド (AcH) を生成する。この AcH は WHO の国際がん研究機関によって Group 1 の発がん物質 (ヒトに対して確実に発がん性がある) に認定され, アルコール関連大腸発がんのリスク因子として疑われてきた。具体的には, 「習慣的多量飲酒者では, 糞便の腸内細菌叢のなかでエタノール産生性微生物が長年にわたり集積され, 糞便の AcH 生成能力が高まり, 大腸粘膜が恒常的に高濃度の AcH に曝露されることにより, 大腸発がんのリスクが高まる」という筋書きが信じられてきたが, この筋書きに特段の実験的根拠があるわけではなかった。

一方, 筆者らは最近, 習慣的多量飲酒者 (アルコール依存症患者, ア症患者) の糞便が, 健常者の糞便と異なり AcH 生成能をほとんど示さないことを明らかにした。またア症患者の糞便の菌叢構造を健常者のものと比較したところ, ア症患者では偏性嫌気性菌が減少し通性嫌気性菌が増加していることもわかった。糞便中の AcH 生成微生物のほとんどは偏性嫌気性菌であったことから, 患者の糞便に AcH 生成能がほとんどないことが合理的に説明された。これらの結果から申請者は, 習慣的多量飲酒により腸内細菌叢に酸化ストレスがかかるのではないかと推察し, 大腸発がんをはじめとする習慣的多量飲酒による疾患のリスク増大への腸内細菌の関わりについて, AcH ではなく, 酸化ストレスを重視した以下の作業仮説を着想するに至った: 「習慣的多量飲酒により, ヒト大腸粘膜細胞やその近傍の腸内細菌のエタノール代謝を介して大腸粘膜とその近傍に酸化ストレスが恒常的に生成される。この大腸内酸化ストレスは, アルコール関連大腸発がんのリスク因子となる。酸化ストレスが大腸内の菌叢に負荷されることにより菌叢構造に変化をもたらされ, 善玉偏性嫌気性菌の存在比を減少させるとともに, 腸内細菌の短鎖脂肪酸 (SCFA) の生成能を低下させ, 大腸機能に悪影響を及ぼす。習慣的多量飲酒者では大腸内の主たる AcH 生産者 (偏性嫌気性菌) の存在比が減少するため, 大腸内の AcH の濃度は発がんのリスク因子として作用できるほど高くない」

この作業仮説の中で, 酸化ストレスを発がんのリスク因子とする考えは特段新規なものではない。この作業仮説の新しい点は, 習慣的多量飲酒による大腸疾患のリスク増大への腸内細菌の役割について, 1) 習慣的多量飲酒による腸内細菌群への酸化ストレス負荷との関連で注目している点, 2) これまで信じられてきた AcH 生成を介した役割を重視する考えに一石を投げ, 代わりに酸化ストレス負荷による SCFA 量の変化を重視する点である。

なお, この作業仮説で SCFA を重視する理由は, 筆者が研究開始当初に, 酸化ストレスの付与によって腸内細菌分離株の SCFA 生成能が下がる事例を見いだしていたからである。SCFA は, 腸管バリア機能を高め, 腸内を弱酸性に保つことで二次胆汁酸の生成を抑制して大腸発がんのリスクを下げ, また大腸粘膜細胞上の受容体への結合を介して, 大腸の機能維持や腸管免疫の調節などに寄与することが明らかになっており, 大腸疾患の発症を, 糞便の SCFA 含有量との関連で議論することは重要であると考えた。

2. 研究の目的

そこで本研究は, この作業仮説の妥当性と一般性を検証するために計画された。まず, 習慣的多量飲酒を模した実験動物 (マウス) へのエタノール慢性投与実験を行い, 腸内菌叢構造と腸内菌叢の酸化ストレス遺伝子群の転写レベルの経時的変化を調べる。またマウス大腸組織の酸化ストレスマーカーの変化も調べ, 習慣的多量飲酒により大腸内菌叢に酸化ストレスが負荷されることを異なる角度から立証する。そして慢性的エタノール投与が, 糞便中の SCFA と AcH の含有量にどのような影響を与えるかを調べる。併せて, エタノール誘導による活性酸素種 (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

すべての動物実験は, 研究分担者所属組織の動物実験倫理委員会によって承認され (承認番号 A17-54), 研究分担者によって実施された。これらの実験は, 日本学術会議による動物実験ガイドラインを遵守しており, 動物の痛みおよび苦痛を最小限に抑えるための手法を用いている。動物実験施設の微生物検査結果は, 期間中すべて陰性であった。

C57BL/6Ncr 雄マウス (6週齢) を入手し, ケージごと 1匹ずつ, SPF レベル動物飼育室にて, 23~24°C, 12時間の明暗サイクルにて飼育した。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週齢マウスを3群(8匹/群)へランダムに割当て、各群は下記条件より毎日経口投与した: ①1.0 mL 蒸留水, ②1.0 mL 1.5%エタノール (v/v), ③1.0 mL 5.0%エタノール (v/v). 介入期間中, 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は, 10週齢または18週齢期より回収した. ③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安楽死させ, 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.

(4) 組織学検査

肝臓, 結腸組織サンプルのヘマトキシリン (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, 顕微鏡観察を行った. 免疫組織化学染色 (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)) を行い, 顕微鏡観察により評価した.

(5) ELISA

組織中の蛋白質と DNA を抽出した. 抽出物中の 8-OHdG, 4-HNE, AGEs, および RAGE レベルは, 市販 ELISA キットを用いてそれぞれ定量した.

(6) qRT-PCR

組織中の全 RNA を RNA 抽出試薬を用いて抽出した. cDNA 合成後, 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, 16S rRNA アンプリコン配列解析, アクセション番号 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.

(8) マウス糞便 SCFA 解析

介入5週目に回収したマウス糞便中の SCFA の分析はテクノスルガに委託中である.

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), 1.5%エタノール群 (②), 5.0%エタノール群 (③) 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群間に有意差はなかった. 血アルコール性肝炎と脂肪肝誘導が, エタノール投与濃度と介入期間依存的に進行したことを, 血液生化学検査, 肝組織中 TG 濃度, 肝組織標本の観察結果より確認した.

(2) 結腸組織傷害評価

結腸の組織学評価により, ②群と③群において, 結腸粘膜層, 粘液分泌, 上皮傷害を伴う組織変化が投与エタノール濃度と介入期間依存的に観察された.

(3) 結腸組織の酸化ストレス評価

投与2週目から, ①群と比べて, ②群と③群で 8-OHdG レベルの有意増加を認めた. しかし, 10週目では, ③群は②群より低値を示した(Fig.3), また, 4-HNE レベルは, ②群と③群において, 投与エタノール濃度および介入期間依存的な増加が示された.

(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

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) の mRNA レベルを, qRT-PCR を用い, 3群間にて比較した, 介入2週目の TNF- α , IL-6, IL-17A, および MCP-1 の mRNA 発現レベルは投与 EtOH 濃度依存的に高値を示した, ②群では, 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、③群では、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、③群のAGEs発現レベルは、①群と②群に比べ有意な増加を認めた、しかし、③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、②群では、投与期間依存的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、門レベルで評価した。①群で相対量の多い門は、順に、*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, および *Deferribacteres* 門であり、これは②群と③群でも同様であった。ただし、①群に比べ、②群では *Firmicutes* 門の有意な減少が、②群と③群で *Deferribacteres* 門の有意な減少が観察された。一方、*Proteobacteria* 門の相対量は、①群に比べ、②群と③群で有意な増加が観察された。

(7) マウス糞便 SCFA 解析

マウス糞便 SCFA は、現在、解析中である。

総括：マウスへのエタノール慢性経口投与は、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た。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. 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 e0246580
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0件

〔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
研究分担者	大平 英夫 (Ohira Hideo) (40351762)	神戸学院大学・栄養学部・准教授 (34509)	

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