

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22483

研究課題名（和文）細胞外脂質代謝酵素による腸内細菌叢の制御

研究課題名（英文）Regulation of gut microbiome by extracellular phospholipases

研究代表者

村上 誠（Murakami, Makoto）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・教授

研究者番号：60276607

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞外リン脂質分解酵素sPLA2を基軸に、脂質代謝の視点から腸内細菌叢の新規調節機構を解明することを目的とした。腸管に局限分布するsPLA2-IIA、-Xの各欠損マウスでは腸内細菌叢が変化し、これに伴い血中代謝物や糞便脂質が変化し、皮膚や脂肪組織に癌、アレルギー、肥満等と関連する表現型を発症した。欠損マウスを野生型マウスと同居飼育、またはよりクリーンな環境で飼育すると、両群間の腸内細菌叢に差が見られなくなり、皮膚や脂肪組織の表現型が消失した。このことから、腸管sPLA2は腸内細菌叢の制御を通じて遠隔臓器の病態発症に影響を及ぼすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、腸内細菌叢の組成変化が腸疾患だけでなく遠隔組織の病態にも波及することが注目されている。したがって、腸内細菌叢が宿主に及ぼす影響とそのメカニズムを解明することは、国民のQOL向上を目指す上で学術的にも社会的にも重要である。本研究は細胞外リン脂質代謝酵素sPLA2の動作原理に関する概念を大きく転換させるものであり、脂質や腸内細菌叢の研究領域への学術的貢献度は高い。また社会的には、将来的にsPLA2の機能介入を通じて腸内細菌叢と宿主の相互作用をプレバイオティクスやプロバイオティクスにより人為的に調節できれば、新しい機序に基づく健康食品・医薬品の開発に結びつくことも期待される。

研究成果の概要（英文）：Besides modifying inflammation by mobilizing lipid mediators, secreted phospholipase A2 (sPLA2) prevents bacterial infection by degrading bacterial membranes. In this study, we found that despite the restricted intestinal expression of sPLA2-IIA and -X, their genetic deletions altered the susceptibility to cancer, allergy or obesity in distal skin and adipose tissue. Metagenome, transcriptome and metabolome analyses revealed that the deficiency of these sPLA2s altered the gut microbiota, accompanied by notable changes in various blood metabolites and fecal bacterial lipids. The phenotypes in distal tissues were lost when the knockout mice were co-housed with littermate wild-type mice, or when they were housed in a more stringent pathogen-free facility. Thus, our results highlight a new aspect of the sPLA2 family as a modulator of gut microbiota, perturbation of which affects host responses in distal tissues.

研究分野：生物系薬学

キーワード：脂質 酵素 腸内細菌叢 アレルギー メタボローム

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、リン脂質代謝酵素ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) 分子群の網羅的欠損マウスに脂質メタボローム (リピドミクス) を展開することで、各 PLA₂ により固有に動員される脂質代謝とその病態生理的意義を解明してきた。従来、各 PLA₂ は発現組織において細胞膜リン脂質からアラキドン酸代謝物やリゾリン脂質などの生理活性脂質を動員する役割を担うと考えられてきたが、申請者は最近、分泌性 PLA₂ (sPLA₂) の欠損マウスが呈する予想外の表現型を切り口に、sPLA₂ が腸内細菌叢の調節に関わることを示唆する予備的知見を得た。すなわち、腸管に限局発現している特定の sPLA₂ (IIA, X) の欠損により、本来各酵素が発現していない遠隔組織に表現型が発症することを見出した。近年、腸内細菌叢の組成変化が腸疾患だけでなく遠隔組織の病態にも波及することが注目されている。sPLA₂ 群のプロトタイプである sPLA₂-IIA が試験管内で動物細胞膜よりも細菌膜のリン脂質を分解し易いことは知られていたが、その生理的意義は曖昧であった。申請者は上記予備知見を契機に、腸管 sPLA₂ が腸内細菌叢に直接的または間接的に影響を及ぼし、二次的に遠隔臓器の病態に波及している可能性を想定するに至った。

2. 研究の目的

腸内細菌叢が宿主に及ぼす影響とそのメカニズムを解明することは、国民の QOL の向上を図る上でも重要である。本研究の目的は、申請者が長年研究に取り組んできた sPLA₂ を基軸に、脂質代謝の視点から腸内細菌叢制御に関する新規概念を創成することである。sPLA₂ が微生物叢と宿主の相互作用に及ぼす影響を定量的・定性的な情報として収集・統合し、多角的視点から腸内細菌叢の維持・変容の新規調節因子としての sPLA₂ の位置付けを確立することを目指す。本研究の全体構想を図 1 に示す。

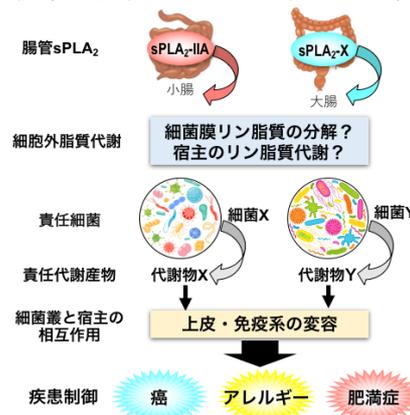


図1 本研究の全体構想

2. 研究の方法

本研究では、腸管限局型 sPLA₂ (IIA, X) の各欠損により発症する腸内細菌叢の変容と、遠隔組織の疾患関連の表現型の関連を解明すべく、以下のストラテジーに沿って解析を進める。

- (1) 各 sPLA₂ の欠損マウスに各種疾患モデルを展開し、表現型を精査する。
 - 1) 高脂肪食負荷肥満モデル: 高脂肪食を負荷し、大腸及び代謝組織の表現型を総合評価する。
 - 2) アレルギーモデル: 抗原曝露による皮膚アレルギーについて、マスト細胞活性化を評価する。
 - 3) 癌モデル: 皮膚癌モデルを施行し、細胞増殖や抗腫瘍免疫の解析を行う。
 - 4) イミキモド誘導乾癬モデルを施行し、皮膚の炎症状態を調べる。
- (2) 腸内細菌叢を人為操作し、各 sPLA₂ 欠損の表現型が腸内細菌叢に依存するかについて検証する。表現型が消失した場合、腸内細菌叢の変容は表現型の一次要因である。一方、表現型が消失しなければ、腸内細菌叢の変容は宿主の変化に基づく二次的要因である。
 - 1) 抗生物質投与: 異なる抗菌スペクトルを持つ抗生物質を用いて腸内細菌叢を改変する。
 - 2) 同居飼育実験: 野生型群と欠損群を同居させることで双方の腸内細菌叢を共有させる。
 - 3) 異施設飼育: クリーン度の異なる別施設で飼育したマウスの表現型を比較する。
- (3) メタゲノム解析: 糞便中の腸内細菌叢の 16s RNA をメタゲノム解析し、sPLA₂ 欠損により変化する細菌属を同定する。
- (4) トランスクリプトーム解析: 腸管のマイクロアレイ、qPCR、フローサイトメトリー (FACS) 等を実施し、sPLA₂ 欠損により発現が変動する宿主分子を同定する。
- (5) メタボローム解析: 糞便や血中のメタボローム解析を実施し、sPLA₂ 欠損により変動する代謝物を同定する。

4. 研究成果

1) sPLA₂-IIA による腸内細菌叢の制御と皮膚疾患の関連
 遺伝子改変で汎用される C57BL/6 や 129 を含む多くのマウス系統は *Pla2g2a* 遺伝子のフレームシフト変異により sPLA₂-IIA を自然欠損しているが、例外的に正常の *Pla2g2a* 遺伝子を持つ BALB/c マウスでは sPLA₂-IIA は腸管 (小腸>大腸) に限局分布している。そこで、sPLA₂-IIA 欠損 BALB/c マウスを導入したところ、本来本酵素が発現していない皮膚において癌やアレルギーが改善し、乾癬が増悪することを見出した。このことから、sPLA₂-IIA が腸内細菌叢に何らかの影響を及ぼしている可能性を検証し、以下の結果を得た (図 2)。①sPLA₂-IIA は腸内細菌依存的に小腸パネート細胞に発現誘導される。②欠損マウスの腸内細菌叢は属レベルのクラスタリング解析で一部に変化が認められる。③野生型と欠損マウスを同居飼育すると双方の表現型に差が見られなくなる。④欠損マウスの小腸では一部の免疫関連分子の発現に変化が認められる、⑤血中の水溶性代謝物のメタボローム解析の結果、欠損マウスでは癌やアレルギーとの関連が

想定される代謝物に変化が見られる。⑥欠損マウスの糞便では、宿主ではなく微生物に由来する特殊脂質に変化が生じている。⑦上記表現型は、欠損マウスをクリーンな飼育環境で飼育すると消失する。⑧以上の結果を総合的に踏まえ、sPLA₂-IIA 欠損マウスの表現型と最も関連性の高い腸内細菌は *Helicobacter* である。

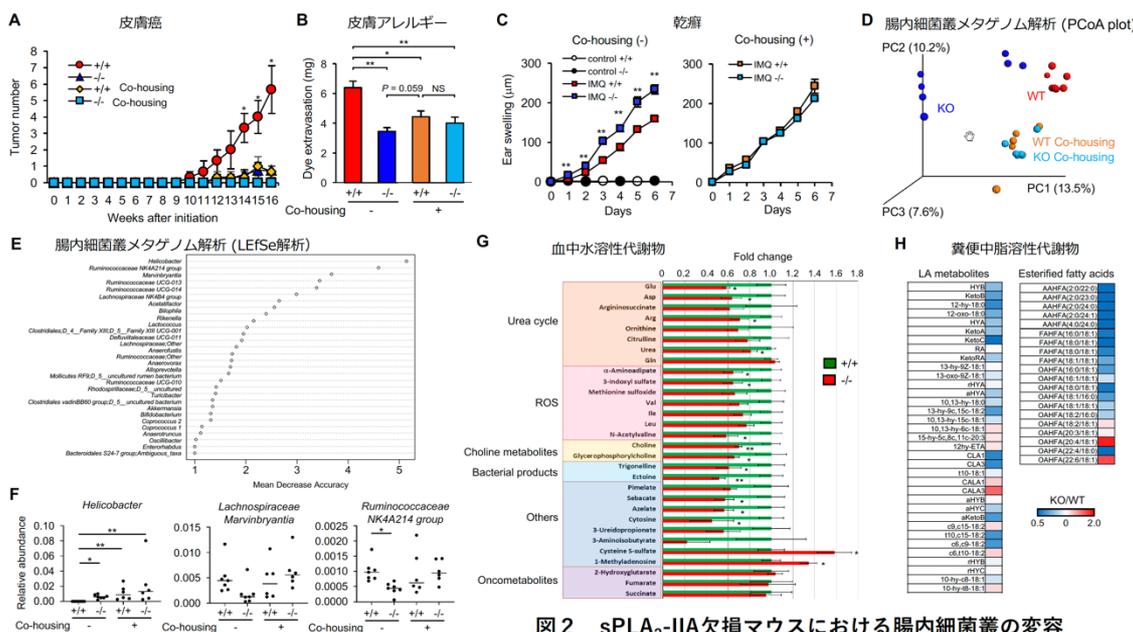


図2 sPLA₂-IIA欠損マウスにおける腸内細菌叢の変容

2) sPLA₂-X による腸内細菌叢の制御と生活習慣病の関連

申請者はこれまでに、大腸上皮に局限発現している sPLA₂-X が抗炎症性の ω3 脂肪酸 (EPA, DHA) を動員して DSS 誘導大腸炎を抑制する作用を持つことを報告しているが (Murase et al, *J Biol Chem* 2016)、一方で本酵素を殆ど発現していない代謝組織にも生活習慣病 (肥満・脂肪肝・インスリン抵抗性) 増悪の表現型を発症することを見出した。この表現型に腸内細菌叢の変容が関わる可能性を想定し、以下の結果を得た (図3)。

- ①高脂肪食負荷した sPLA₂-X 欠損マウスでは大腸の慢性炎症マーカーの発現が増加する。
- ②本欠損マウスの腸内細菌叢は属レベルのクラスタリング解析で一部に変化が認められる。
- ③本欠損マウスでは腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸の血中及び糞便中濃度が減少傾向を示す。
- ④野生型と欠損マウスを同居飼育すると双方の表現型に差が見られなくなる。
- ⑤以上の結果を総合的に踏まえ、sPLA₂-X 欠損マウスの表現型と最も関連性の高い腸内細菌は *Clostridium* である。

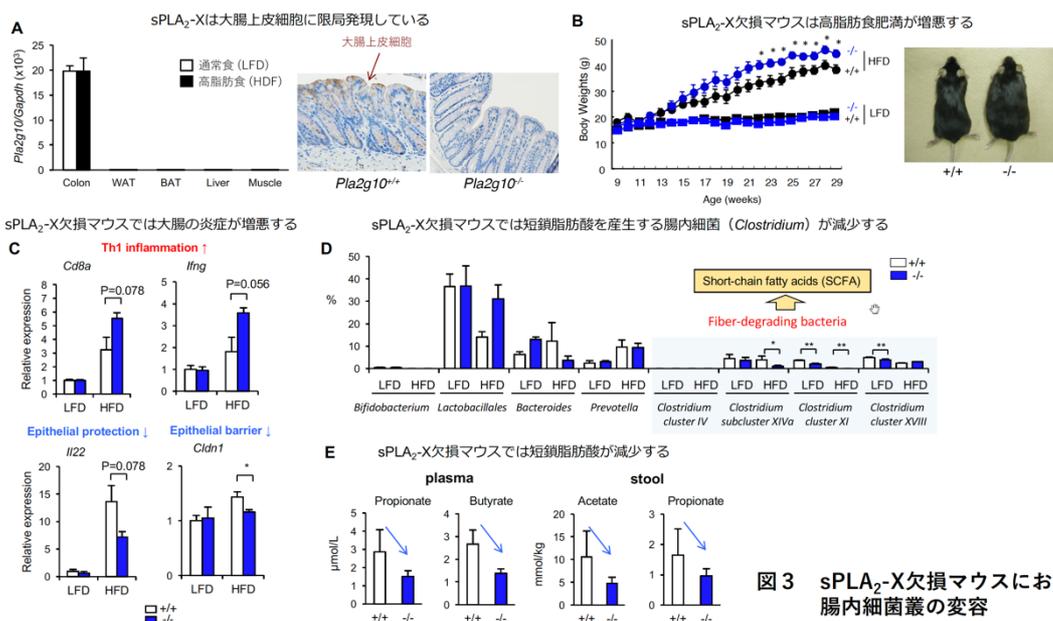


図3 sPLA₂-X欠損マウスにおける腸内細菌叢の変容

以上の結果は、両 sPLA₂ が腸内細菌叢と宿主の相互作用に何らかの形で関与して遠隔組織の疾患プロセスに影響を及ぼすことを強く示唆している。本研究は、細胞外リン脂質代謝酵素 sPLA₂ の動作原理に関する概念を大きく転換させるものであり、将来的に sPLA₂ の機能介入を通じて腸内細菌叢と宿主の相互作用をプレバイオティクスやプロバイオティクスにより人為的に調節できれば、新しい機序に基づく健康食品・医薬品の開発に結びつくことも期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Makoto Murakami	4. 巻 1864
2. 論文標題 Novel functions of Phospholipase A2s: Overview.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids	6. 最初と最後の頁 763-765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2019.02.005	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 Makoto Murakami, Yoshimi Miki, Hiroyasu Sato, Remi Murase, Yoshitaka Taketomi, Kei Yamamoto	4. 巻 1864
2. 論文標題 Group IID, IIE, IIF and III secreted phospholipase A2s.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids	6. 最初と最後の頁 803-818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2018.08.014	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 Tetsuya Hirabayashi, Makoto Murakami, Akio Kihara	4. 巻 1864
2. 論文標題 The role of PNPLA1 in omega-0-acylceramide synthesis and skin barrier function.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids	6. 最初と最後の頁 869-879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2018.09.010	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 村上誠	4. 巻 37
2. 論文標題 脂質メディエーターが繋ぐ臓器連関と動的恒常性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 149-155
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 村上誠	4. 巻 269
2. 論文標題 ホスホリパーゼA2 による代謝と疾患の制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1024-1028
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 Sato H, Taketomi Y, Miki Y, Murase R, Yamamoto K, Murakami M.	4. 巻 31
2. 論文標題 Secreted phospholipase PLA2G2D contributes to metabolic health by mobilizing omega-3 polyunsaturated fatty acids in white adipose tissue.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107579.	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 -

1. 著者名 Watanabe K, Taketomi Y, Miki Y, Kugiyama K, Murakami M.	4. 巻 295
2. 論文標題 Group V secreted phospholipase A2 plays a protective role against aortic dissection.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 10092-10111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013753.	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 Inazumi T, Yamada K, Shirata N, Sato H, Taketomi Y, Morita K, Hohjoh H, Tsuchiya S, Oniki K, Watanabe T, Sasaki Y, Oike Y, Ogata Y, Saruwatari J, Murakami M, Sugimoto Y.	4. 巻 33
2. 論文標題 Prostaglandin E2-EP4 axis promotes lipolysis and fibrosis in adipose tissue leading to ectopic fat deposition and insulin resistance.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108265.	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 -

1. 著者名 Murakami M, Sato H, Taketomi Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Updating phospholipase A2 biology.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 E1457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10101457	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 -

1. 著者名 村上誠	4. 巻 69
2. 論文標題 脂質とアレルギー疾患	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギー	6. 最初と最後の頁 250-255
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 村上誠	4. 巻 41
2. 論文標題 脂質メデイエーターによるマスト細胞とアレルギー炎症の制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 13-16
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12件(うち招待講演 6件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 村上誠
2. 発表標題 脂質とアレルギー疾患
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上誠
2. 発表標題 PLA2と炎症・再生
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Murakami
2. 発表標題 Phospholipid metabolism and lipid mediators in health and diseases
3. 学会等名 Asia Pacific Society for Biology and Medical Sciences (APSBMS) 2019 Annual Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Murakami
2. 発表標題 LipoQuality regulation by the phospholipase A2 family
3. 学会等名 The 2nd International Conference on Lipoquality（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshimi Miki, Yoshitaka Taketomi, Kei Yamamoto, Koji Hosomi, Jun Kunisawa, Siddabasave Gowda B. Gowda, Kazutaka Ikeda, Makoto Arita, Makoto Murakami
2. 発表標題 Group IIA phospholipase A2 regulates gut microbiome
3. 学会等名 The 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL)（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Remi Murase, Yoshitaka Taketomi, Yoshimi Miki, Kei Yamamoto, Makoto Murakami
2. 発表標題 Distinct Roles of phospholipase A2s in colitis and colonic cancer
3. 学会等名 The 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上誠
2. 発表標題 リン脂質代謝による代謝系・循環器系の制御
3. 学会等名 28th Cardiovascular Metabolism Aging Conference (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 望月茅可、武富芳隆、入江敦、村上誠
2. 発表標題 XIIA型分泌性ホスホリパーゼA2はIL-17A関連疾患を増悪する
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本奈央、高宮里奈、梁陸伊韻、三木寿美、村上誠
2. 発表標題 新規細胞質型ホスホリパーゼA2 (cPLA2d) の機能解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野喬、武富芳隆、佐藤弘泰、曾我朋義、徳岡涼美、小田吉哉、相原一、村上誠
2. 発表標題 脂質代謝酵素PNPLA6は網膜および全身代謝の恒常性の維持に關与する
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三木寿美、山本圭、工藤海、幸谷愛、武富芳隆、村上誠
2. 発表標題 分泌性ホスホリパーゼA2はエクソソームのリン脂質を分解する
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Murakami, M
2. 発表標題 cPLA2 or sPLA2? What is the most important phospholipase in lung injury?
3. 学会等名 International Week on Surfactant Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 健康環境医工学部門
https://1mmhs.m.u-tokyo.ac.jp/home_j.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
研究協力者	武富 芳隆 (Taketomi Yoshitaka)		データ解析
研究協力者	三木 寿美 (Miki Yoshimi)		sPLA2-IIA欠損マウスの表現型解析
研究協力者	佐藤 弘泰 (Sato Hiroyasu)		sPLA2-X欠損マウスの表現型解析
研究協力者	曽我 朋義 (Soga Tomoyoshi)		低分子メタボローム解析
研究協力者	有田 誠 (Arita Makoto)		リビドミクス解析
研究協力者	國澤 純 (Kunisawa Jun)		腸内細菌叢メタゲノム解析

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

カナダ	University Laval			
-----	------------------	--	--	--