

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11708

研究課題名（和文）胃癌術後体重減少とマイクロバイオータの役割・プロバイオティクスによる予後改善戦略

研究課題名（英文）New probiotics alter gut microbiota in rat: Aiming to improve gut dysbiosis after gastrectomy for gastric cancer.

研究代表者

高木 泰介 (Takagi, Taisuke)

杏林大学・医学部・医員

研究者番号：60868991

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）：胃切除後障害として頻度の高い体重減少へのプロバイオティクスによる介入を試みた。プロバイオティクスとして、*Leuconostoc mesenteroides* MS061, *Leuconostoc suionicum* MS009の特性評価を行った。MS009は重湯で十分な増殖能を示し、腸管上皮細胞との付着性が良好だった。ラットへの投与実験では、MS009投与により腸内細菌叢の多様性の変化が観察され、さらに盲腸内容物の酪酸とIgA抗体濃度の上昇が認められた。MS009は腸内細菌叢の多様性増加、酪酸・IgA抗体産生増加を通じて、宿主にとって有益な効果を示す可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重湯中で増殖、投与が可能な新規プロバイオティクス細菌の性能評価を行った。

新規プロバイオティクス候補*Leuconostoc suionicum* MS009株は、ラット腸内細菌を変化させ、酪酸産生増加作用、IgA抗体産生増加作用を通じて、宿主に有益な効果をもたらすことが予想された。

MS009株はお粥中で投与可能な全く新しいプロバイオティクスとしてお粥を食す病態にある高齢者や手術後の患者に投与し病状を回復させる可能性が展望された。

研究成果の概要（英文）：Body weight loss after gastrectomy occurs with high frequency. dysbiosis in the gut microbiota has recently been reported as one possible cause. We explore the ability of novel bacteria to prevent weight loss by improving dysbiosis focusing on the rice fermentation bacteria *Leuconostoc* spp., Probiotic candidates, *Leuconostoc suionicum* MS009 and *Leuconostoc mesenteroides* MS061 were compared. MS009 was able to increase in "omoyu" for use as probiotics. The adhesion ability of MS009 to INT-407 cells was higher than that of the other two. In an animal experiment of MS009, the cecal microbiota of rats shows that a higher  $\alpha$ -diversity and changes of  $\beta$ -diversity. Moreover, increasing of IgA antibodies and butyric acid in cecal content was observed in the treatment group. MS009 was shown to alter the composition of the gut microbiota and promote increased butyrate production, and IgA production. Together, these results indicate that this strain is suitable for use as a probiotic.

研究分野：腸内細菌学

キーワード：腸内細菌 胃切除 プロバイオティクス dysbiosis 体重減少 酪酸 IgA メタゲノム解析

## 1. 研究開始当初の背景

胃癌手術後に起こる頻度の高い合併症として体重減少がある。周術期管理の進歩によって体重減少の割合は減少しているが、術後1ヶ月の体重減少は開腹胃全摘術で約10.7%、開腹幽門側胃切除術で約8.8%と報告されている。体重減少は患者のQOLを低下させるだけでなく予後にも関わってくる。術後の病理診断で胃癌の病期がIIもしくはIIIの場合、再発予防のために抗癌剤による術後補助化学療法を行うことが推奨されている。術後補助化学療法には様々な有害事象があり、その発生により化学療法を継続できなくなる症例も多い。その継続性に術後体重の変化が関与すると知られており、術後1ヶ月の時点で15%以上の体重減少もしくは5%以上の除脂肪体重の減少があると有意に化学療法の継続性が低下する。化学療法が中止になることは胃癌再発率を増加させ、さらに予後不良となる。近年の報告から胃癌術後にdysbiosisが生じることが示されており、術後の体重減少や、回復遅延に作用することが示唆され注目を集めている。dysbiosisの予防と、細菌叢の回復促進作用が胃癌術後の予後改善に有用であるかを検証することが重要な課題であると考えた。Dysbiosisの予防として、プロバイオティクスや関連食品(プレバイオティクス)を使った腸内細菌叢に対する作用の研究は、近年最も注目されている研究分野の一つである。しかし、体重変化や除脂肪体重(筋肉量)について十分な検討がなされておらず、世界的にも類似した研究は見られない。本研究は、プロバイオティクス候補細菌として、*Leuconostoc mesenteroides*(*L. mesenteroides*)を選定して本研究を実施する。*L. mesenteroides*はFirmicutes門に属するグラム陽性球菌であり、ぬか漬などの発酵食品の中に存在する細菌で、ヘテロ発酵性を持ち、ショ糖から難消化性多糖類を産生する。耐酸性はなく、通常は生菌として胃を通過することは難しいが、消化管経路の変更により生菌が小腸に到達すると予測されることから、本菌の代謝産物や菌体成分がダイレクトに腸管内で作用することが期待される。本菌の代謝産物である難消化性多糖類は腸内細菌叢の重要な栄養源として利用され、短鎖脂肪酸の産生を亢進し、産生された短鎖脂肪酸は宿主の免疫・代謝系に重要なシグナル分子として働き活性化する。さらに、*L. mesenteroides*は、お粥を発酵することが可能な植物乳酸菌であることから、これまでにヨーグルトなどの乳製品に偏っていたプロバイオティクス食品と異なり、お粥や豆乳といった食材を使った発酵が容易な細菌である。術後食応用の多様性を考え、新規プロバイオティクス候補としてふさわしいと考えた。また、*L. mesenteroides*は抗菌活性をもつバクテリオシンを産生する菌株が報告されており、有害細菌の増殖抑制効果を示す可能性が期待されている。

本研究の目的を達成するためのモデル動物として、肥満症を改善するための肥満手術(Roux-en-Y gastric bypass: RYGB)を使うことを計画した。RYGB群と偽手術群の腸内細菌叢を多様性解析しShannon指数で比較するとRYGB群は有意に細菌叢の多様性が低下していたとの報告がある。また、ラットモデルではRYGB群で-Proteobacteria門の割合は高く、Clostridiumの割合は減少していた。体重減少率は-Proteobacteriaと有意な相関関係が見られた。他の研究では減量手術後のラット糞便を無菌ラットに移植すると体重減少が見られた。これらの報告から体重減少に腸内細菌叢の攪乱や構成が関連していることが考えられる。

## 2. 研究の目的

新規に分離された*L. mesenteroides* 2菌株の細菌学的な特性の評価を行い、その結果から重湯やお粥の形態で投与可能で、かつ、より有用と考える菌株を動物実験に使用する細菌として選定した。選定した*Leuconostoc*属菌は重湯中で培養し、SDラットに投与を行い評価した。また、RYGBモデルラットに*L. mesenteroides*を投与し体重測定と直腸便の採取を行った。その結果から重湯中で増殖させた*Leuconostoc*属菌のプロバイオティクスとしての有用性を検討した。

## 3. 研究の方法

新規プロバイオティクス候補として*Leuconostoc suionicum* MS009株(MS009株)と*Leuconostoc mesenteroides* MS061株(MS061株)の2株を選定し、細菌学的な特性と機能を基準株である*Leuconostoc mesenteroides* JCM6124株をコントロールとして調べた。各種培地内での増殖性の比較、耐酸性、腸管上皮細胞であるINT-407細胞との付着性を比較した。それらの結果から特にプロバイオティクスとして効果が期待されるMS009株をラットへ投与し、糞便のメタゲノム解析・メタボローム解析を行った。さらに、胃切除後の体重減少への効果を検証するために普通食を摂取している胃切除モデルラットへのMS009株投与実験および、高脂肪食を摂取している胃切除モデルラットへのMS061株投与実験を行い、解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 各種培地での*Leuconostoc*属菌の増殖性の比較

MS009株とMS061株は重湯や豆乳中でも増殖可能であり、 $10^7$  cfu/ml以上の菌数になることが分かった(図1、2)。代表的なプロバイオティクス製剤であるピオフェルミン散(ピオフェルミン製薬株式会社, Hyogo, Japan)は3g(1日投与量)中に*Streptococcus faecalis*と*Bacillus*

*subtilis* の生菌を  $9.0 \times 10^6$  から  $3.0 \times 10^9$  個含んでおり、ミヤ BM 錠 (ミヤリサン製薬株式会社, Tokyo, Japan) では 120 mg (1 日量) 中に *Clostridium butyricum* の生菌を約  $1.5 \times 10^8$  個含んでいる。重湯中での MS009 株や豆乳中での MS016 株は  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml 程度の増殖が可能であり、1 日 3 食 100g ずつを摂取したとすると  $3.0 \times 10^{11}$  個の細菌を含んでいる計算となり、ビオフェルミン散やミヤ BM 錠と比較しても同等かそれ以上の生菌数を含むことが分かった。生菌数はプロバイオティクスの性能を左右する重要な要素であり、本研究で用いた *L. suionicum* MS009 株は重湯中で、*L. mesenteroides* MS061 株は豆乳中で十分な増殖性が確認された。また、重湯は胃切除後に術後食として提供される代表的な食形態であり、術後早期から大量に投与できる可能性や、重湯・お粥を食す機会が多い高齢者などに使用できる可能性が展望された。

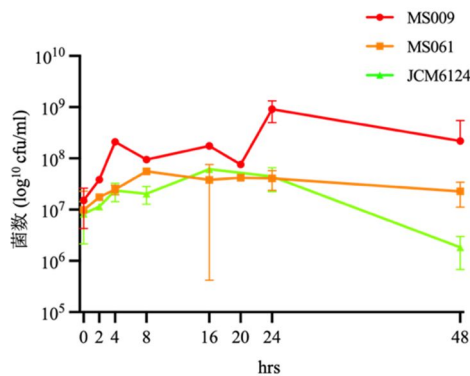


図 1 重湯中での増殖性

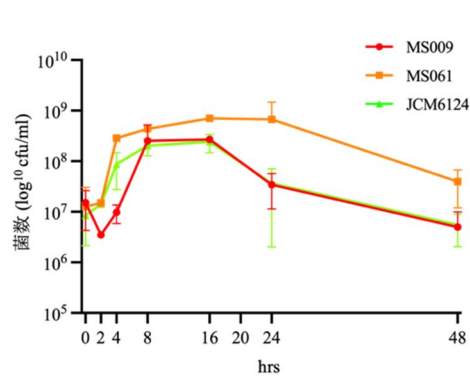


図 2 豆乳中での増殖性

### (2) MRS 培地を調製した人工胃液内での耐酸性試験

有用なプロバイオティクスの要素の一つとして、酸性度の高い胃を通過し生菌のまま小腸に到達することがしばしば挙げられる。耐酸性試験の結果からは MS009 株と MS061 株の人工胃液内での耐酸性は低いと考えられ、pH 3.0 の環境下では 60 分以内に検出限界となり、pH 4.0 の環境下では増殖性が失われた。通常、ヒト胃内の pH は空腹時には 1.4-2.1 であり食事摂取により 4.3-5.4 まで上昇する。空腹時には MS009 株・MS061 株は胃内を生菌のまま通過できない可能性があるが、前述した様に重湯とともに胃内に入る際には生菌のまま通過できる可能性があると考えられた。また、遠位 2/3 胃切除後(幽門側胃切除術)の残胃内は pH が 6 以上となるため、この手術後には生菌として通過する可能性が高いと考えられた。投与実験に使用したラットの胃内は pH が 4 程度であり、生菌のまま通過できていた可能性が高いと考えられた。MS009 株投与実験の盲腸内容物メタゲノム解析では MS009 株投与群のみ *Leuconostoc* 属が盲腸内容物から検出された。メタゲノム解析では細菌の DNA を検出しているため生菌として到達したか判断はできないものの、菌体がラットの胃腸に届いていたことが示された。しかし、投与群の直腸便からは *Leuconostoc* 属は検出されなかったため、ラット直腸に到達したかは不明であった。ヒトへの胃切除後以外の使用方法としては、耐酸性が低いという欠点をドラッグデリバリーシステムで回避可能であると考えられる。

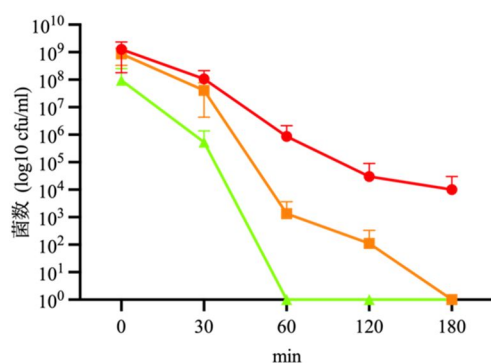


図 3 pH 3.0 での増殖性

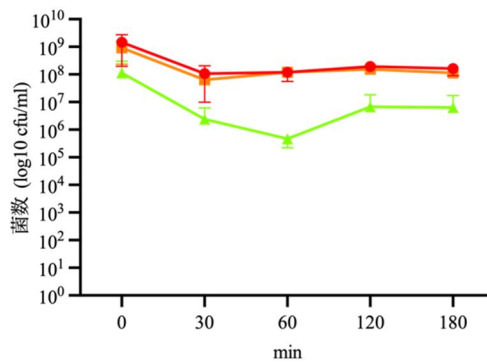


図 4 pH 4.0 での増殖性

### (3) 腸管上皮細胞である INT-407 細胞との付着性

腸管に到達したプロバイオティクスが腸管上皮に付着してコロニーを形成することは、宿主との相互作用を発揮するための重要なプロセスと考えられている。付着性試験の結果、INT-407 細胞に対する付着性は他の候補細菌と比較して MS009 株が特に高い結果となった。腸管上皮細胞への付着性が高いプロバイオティクスは腸管内に長時間滞在する事により宿主との強い相互作用が期待された。

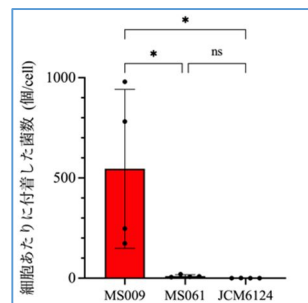


図 5 INT 407 細胞との付着性

(4) *L. suionicum* MS009株投与ラットの腸内細菌叢の変化とその影響

SDラットへの*L. suionicum* MS009株投与実験では、MS009株投与群の盲腸内容物の細菌叢構成が非投与群と比べて異なる集団を形成した(多様性の変化)。多様性の解析では、Shannon、Chao1、Observed OTUs、Faith's PD、Pielous's Evennessの複数の指標で、非投与群と比べてMS009株投与群で有意に高く、菌種構成の複雑さが増していた。この結果は、胃切除後にみられるdysbiosisに対して、本菌の投与が防御的に働く可能性があると考えられた。

短鎖脂肪酸濃度測定ではMS009株投与群の盲腸内容物で酪酸濃度・T-SCFA濃度・ABP-L gapが上昇することが明らかになった。ABP-L gapの低下は食道癌術後の感染性合併症(肺炎、膿胸、縫合不全、創感染)の発生率とも関連する因子であり、短鎖脂肪酸は腸管からの病原菌の移行(Bacterial translocation)を予防すると考えられているため、酪酸濃度・T-SCFA濃度・ABP-L gapの上昇は術後の感染予防に寄与する可能性があると考えられる。MS009株は酪酸濃度・T-SCFA濃度・ABP-L gapの上昇を通じて、腸内環境を良好に変化させる可能性が示唆された。また、酪酸は宿主の腸管免疫系にも作用することが知られており、その作用は多岐にわたる。本実験の結果ではラット盲腸内容物中のIgA抗体濃度が投与群で上昇していた。

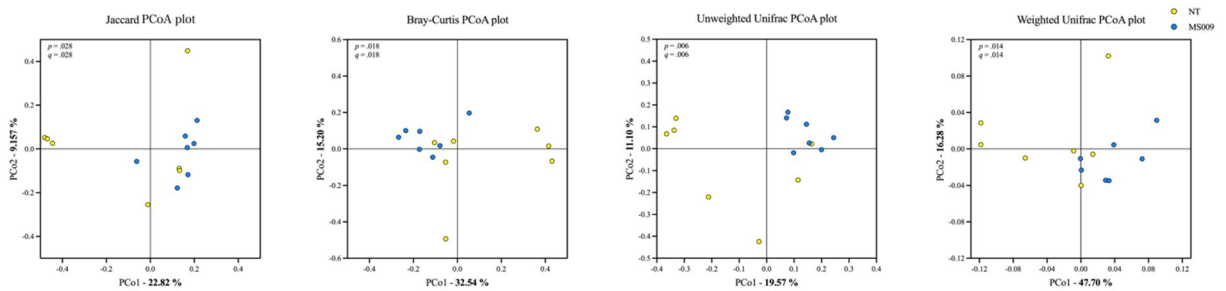


図6 *L. suionicum* MS009株投与ラット、盲腸便 多様性

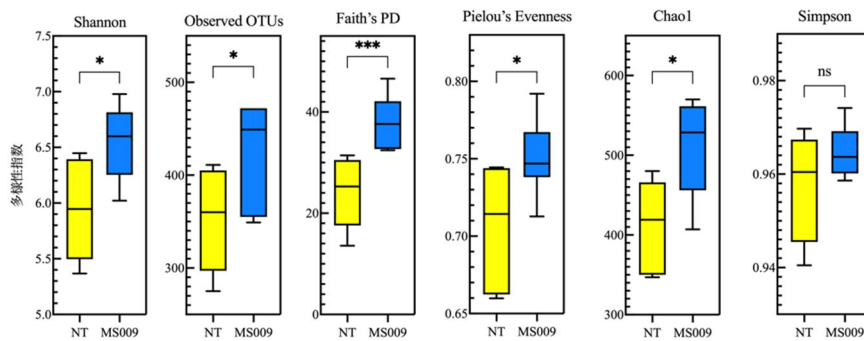


図7 *L. suionicum* MS009株投与ラット、盲腸便 多様性

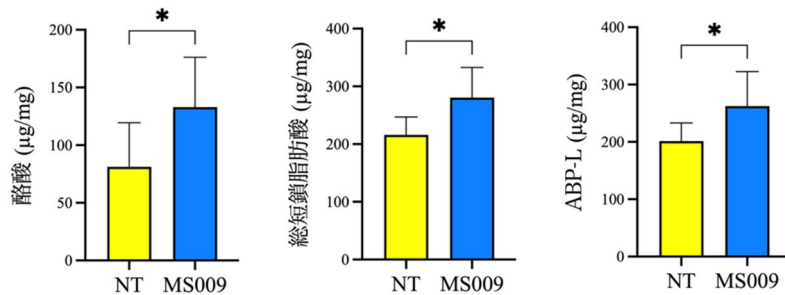


図8 *L. suionicum* MS009株投与ラット、盲腸便の酪酸、総短鎖脂肪酸、ABP-L

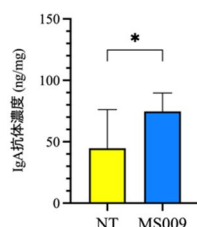


図9 *L. suionicum* MS009株投与ラット、盲腸便のIgA抗体濃度

#### (5) 普通食投与下での RYGB ラットへの *L. suionicum* MS009 株投与実験

MS009 株が胃切除後の体重減少に与える影響を検証するために、普通食投与下で SD ラットに対して Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) 手術を施行し、MS009 株を投与する実験を行った。MS009 株投与は効果を高める目的で手術の 7 日前から MS009 株を投与し手術を施行した。手術の結果、MS009 株投与群とコントロール群ともに 1 例を除いて術後から 3 日目までに死亡した。MS009 株投与群とコントロール群の間においてラットの死亡率には差が無いと考えられ、ラットが死亡した原因は MS009 株の投与の影響ではないと考えられた。食餌を普通食に変更した影響か、手術手技が安定しなかった事が原因と考えられたが、現時点では原因が究明できておらず投与実験の成功に向けて、今後さらなる検討を行いたい。

#### (6) 高脂肪食投与下での RYGB ラットへの *L. mesenteroides* MS061 株投与実験

高脂肪食摂取下での RYGB ラットに対する MS061 株投与実験では、手術による体重減少と腸内細菌叢の変化を確認できた。MS061 株投与群とコントロール群の比較では、コントロール群・MS061 株投与群ともに術後 1 週目で術前と比較して有意な体重の減少を認めた。コントロール群では術後 1 週目に減少した体重は 3 週目に有意な増加を示し、MS061 株投与群では術後 1 週目に減少した体重は 2 週目と 4 週目に有意な増加を認めた。両群ともに 5 週目以降は術後 1 週目と比較して有意な増加が見られなかった。1 週目と比較して 2 週目で体重減少からの回復が見られた MS061 株投与群ではコントロール群と比較して体重減少から回復が早められた可能性があった。MS006 株投与群で術後 4 週目までに増加した体重は MS061 株を終了した 5 週目以降ではコントロール群と同様の結果が見られた。同じ週数での体重を両群間で比較した結果は有意差を認めなかった。

メタゲノム解析の結果からは、コントロール群・MS061 株投与群ともに手術による細菌叢の変化を確認できたが、コントロール群と MS061 株投与群の間では門レベルの細菌叢の有意な変化は確認できなかった。経時的な変化については、コントロール群において術後 8 週目の B/F 比に有意な増加が見られたが、MS061 株投与群では術前と術後で B/F 比に有意な変化がなかった。また、コントロール群で生じた Bacteroidetes 門細菌の有意な増加は MS061 株投与群では確認されなかった。投与により RYGB 手術による腸内細菌叢の変化を抑制できた可能性があった。

高脂肪食摂取下 RYGB ラットの実験結果からは、高脂肪食投与の体重変化や細菌叢に対する効果が極めて大きく、MS061 株投与による効果が表れなかったと考えられた。Leuconostoc 属菌の投与実験は普通食投与下で行うことが望ましいと考えられたが、現状では普通食摂取下での RYGB ラットモデル構築を実現するには至らなかった。

#### (7) *L. suionicum* MS009 株、今後の展望

本研究では胃切除術後の dysbiosis 改善が体重減少を改善するという仮説を実証するには至らなかったが、*L. suionicum* MS009 株は主食(お粥)として使用可能であるという利点を活かして、胃切除後の術後食だけでなくお粥を食すべき病態にある多くの患者への術後食・治療食として使用可能であることが想定された。お粥を摂取する機会の多い入院中・介護施設入所中の高齢者へ長期間の継続的な投与が可能になることによって、高齢者特有のフレイルや便秘を含め排便障害などの問題に対して効率的な栄養介入にもなり得る可能性が展望された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高木泰介
2. 発表標題 胃癌術後dysbiosisの改善を目指した新規プロバイオティクスの検討
3. 学会等名 日本胃癌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高木泰介
2. 発表標題 胃切除モデルラットを使用した胃癌術後の体重減少とマイクロバイオータの検討
3. 学会等名 日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木泰介
2. 発表標題 胃切除後の腸内細菌叢の攪乱、新規プロバイオティクスの検討
3. 学会等名 第38回 日本臨床栄養代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高木泰介
2. 発表標題 胃切除後新規同定乳酸菌投与によるdysbiosis改善効果と体重変化- RYGBラットモデルを用いた検討 -
3. 学会等名 第96回 日本胃癌学会総会
4. 発表年 2024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
研究 分担者	阿部 展次  (Abe Nobutsugu)  (40266747)	杏林大学・医学部・教授   (32610)	
研究 分担者	大崎 敬子  (Osaki Takako)  (90255406)	杏林大学・医学部・教授   (32610)	

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