

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19445

研究課題名（和文）ディスバイオーシスによる炎症病態形成機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of Inflammatory disorder induced by intestinal dysbiosis

研究代表者

長谷 耕二（Hase, Koji）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・教授

研究者番号：20359714

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）：主要な炎症性腸疾患（IBD）であるクローン病と潰瘍性大腸炎は、原因不明の希少難治性疾患である。IBD患者では腸内細菌の異常が顕著である。そのためディスバイオーシスが疾患の増悪因子と見なされてきたが、その病態メカニズムは長年に亘り未解決である。申請者は、異なる飼育場から出荷された同一系統のマウスが、異なる大腸炎感受性を示すことを見出している。そこで本研究では成育環境による腸内細菌の違いに着目して、ディスバイオーシスが腸炎感受性に与える影響を検証した。その結果、腸炎感受性の高い飼育場由来のマウスはバリア機能を低下させる細菌種が存在する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

IBDとディスバイオーシスの相関については数多くの研究が存在するが、その多くは現象論に留まっており、その因果関係や病態メカニズムの解明には至っていない。本研究では、疾患関連菌として未知のバリア分解菌に着目し、その絞り込みに成功しており、ディスバイオーシスによる腸炎悪化のメカニズムの解明に繋がることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory bowel diseases (IBD), including Crohn's disease and ulcerative colitis, are rare and intractable diseases of unknown cause. IBD patients show abnormalities in the intestinal microbiota, termed dysbiosis. Therefore, dysbiosis has been considered a factor that exacerbates the disease, but its pathological mechanism has remained unresolved for many years. The applicant has found that mice of the same strain shipped from different breeding facilities show different susceptibilities to colitis. In this study, we focused on differences in the intestinal microbiota due to the growth environment and examined the impact of dysbiosis on colitis susceptibility. As a result, it was found that mice from breeding facilities with high susceptibility to colitis had bacterial species that impair barrier function.

研究分野：免疫学

キーワード：腸内細菌 粘膜バリア

1. 研究開始当初の背景

主要な炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) であるクローン病と潰瘍性大腸炎は、原因不明の希少難治性疾患である。根治のための内科的療法は存在せず、投薬は主に寛解維持や症状の改善を目的として実施される。IBD 患者では腸内細菌の異常 (ディスバイオーシス) が顕著であり、疾患の増悪因子と見なされてきたが、何故、ディスバイオーシスによって IBD が悪化するのかという根本的な課題は長年に亘り未解決である。IBD 患者におけるディスバイオーシスの特徴として、菌叢の多様性の減少、偏性嫌気性菌の減少と微好気性細菌の増加などが知られている。結果的に、短鎖脂肪酸産生経路が阻害され、酪酸産生の低下が観察される。短鎖脂肪酸 (特に酪酸) は結腸上皮細胞の主要なエネルギー源である他、腸管組織に取り込まれて制御性 T 細胞の分化を誘導する。加えて、複数のメカニズムで粘膜面のバリア能を高める役割を果たしている。

2. 研究の目的

腸管粘膜バリア機能の低下は、大腸炎の増悪につながると推定される。そこで、本研究では実験的大腸炎モデルの増悪因子として粘膜バリア機能に影響を与える菌の探索を試みた。

3. 研究の方法

異なる飼育場から得たマウスにドデシル硫酸ナトリウム (DSS) を1週間経口投与して大腸炎を誘導した。経時的に体重変化と糞便スコアを観察し、大腸炎病態を評価した。異なる飼育場から得たマウスを共飼育した後、同様に DSS を投与して大腸炎の発症度合いを評価した (図 1)。便中の粘膜バリア因子 (mucosal defense factor: MDF) 量は ELISA により測定した。結腸組織より細胞を取得し、フローサイトメトリー解析を実施した。便試料からビーズ破砕法にて DNA を抽出後、16S rRNA 遺伝子ライブラリーを作製し、シークエンサーで読み取ることで、菌叢解析を実施した。

さらに、マウスから得られた新鮮便を7種類の異なる培地条件で培養し、異なる細菌ライブラリーとしてストックを作製した。MDF 分解活性を評価するために、各細菌ライブラリーと MDF を嫌気チャンバー内で一定時間培養した後、ウェスタンブロット法にて分解度合いを観察した。



- DSS大腸炎に対する感受性の評価
- 腸内細菌叢の解析

図1. 異なる飼育場のマウスを単独飼育または共飼育した後、大腸炎感受性などを調べた

4. 研究成果

(1) 飼育場の異なるマウスは大腸炎感受性が異なる

異なる飼育場由来のマウスの大腸炎感受性を調べるために、それぞれのマウスを別ケージで飼育し、DSSを投与して大腸炎を誘導した。その結果、F飼育場由来のC57BL/6Jマウスは、G飼育場のマウスと比べて実験的大腸炎に抵抗性を示した。これが腸内細菌の違いによるものかを調べるために、2つの飼育場由来のマウスを予め共飼育した後、同様に大腸炎を誘導した。その結果、両者とも同じ程度に大腸炎を発症した。

(2) 飼育場の異なるマウスの腸内細菌叢および便中IgA量の比較

続いて、16S rRNA 遺伝子シーケンシングにより、F飼育場およびG飼育場由来マウスの腸内細菌叢の比較を行った。その結果、両者の菌叢構成は大きく異なることが判明した。一方で、事前に共飼育を行うと、F飼育場型の菌叢はG飼育場型に近づくことが判明した。本結果より、G飼育場由来のマウスの腸内には大腸炎を増悪させる菌種が含まれることが示唆された。

さらに、腸管粘膜において種々のバリア因子を測定したところ、大腸炎感受性の高いG飼育場由来マウスではF飼育場由来マウスと比較して、MDF量が顕著に減少していることが明らかとなった。F飼育場由来マウスの便中MDF量は高値を示すが、G飼育場由来マウスとの共飼育によってMDF量は低下した。またF飼育場由来マウスとG飼育場由来マウスの結腸組織においてMDF産生量を比較したところ、有意な差は観察されなかった。以上の結果より、G飼育場由来のマウスの腸内には、MDFを分解することで粘膜バリアを低下させて、大腸炎を増悪させる菌種が含まれることが示唆された。

(3) 粘膜バリアを低下させる細菌種の絞り込み

大腸炎感受性のG飼育場マウスの新鮮便を取得し、7種類の異なる選択培地を用いて培養を行い、菌叢ライブラリーを作成した。続いて、MDF分解活性を評価するためのスクリーニング系を構築した。本スクリーニング系を用いて、各菌叢ライブラリーのMDF分解活性を調べた結果、ライブラリーによって分解活性が大きく異なることが判明した。そこで、最も高い分解活性を有する菌叢ライブラリーは1000倍希釈して、より細分化したフラクションを作成し、同様のスクリーニングを実施した。さらに活性の高いフラクションについては寒天培地に播種し、コロニーを単離して分解活性を調べた。本実験により、MDF分解菌の絞り込みを行うことに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Barutta F, Hase K, Gruden G et al.	4. 巻 19
2. 論文標題 Protective effect of the tunneling nanotube-TNFAIP2/M-sec system on podocyte autophagy in diabetic nephropathy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2022.2080382	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 該当する
1. 著者名 Ohue-Kitano R, Hase K, Kimura I et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 Medium-chain fatty acids suppress lipotoxicity-induced hepatic fibrosis via the immunomodulating receptor GPR84.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e165469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.165469	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 Ishihara N, Hase K et al.	4. 巻 3
2. 論文標題 Spi-B alleviates food allergy by securing mucosal barrier and immune tolerance in the intestine.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Allergy	6. 最初と最後の頁 996657
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/falgy.2022.996657	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 Yakabe K, Hase K, Y-G Kim et al.	4. 巻 40
2. 論文標題 Dietary-protein sources modulate host susceptibility to Clostridioides difficile infection through the gut microbiota.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 111332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.111332	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 Zhe W, Hase K, Takahashi D et al.	4. 巻 45
2. 論文標題 A novel HDAC1-selective inhibitor attenuates autoimmune arthritis by inhibiting inflammatory cytokine production	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 1364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00321	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 Seki N, Hase K, Y-G Kim et al.	4. 巻 25
2. 論文標題 D-Tryptophan suppresses enteric pathogen and pathobionts and prevents colitis by modulating microbial tryptophan metabolism.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104838	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 Michelson DA, Hase K, Mathis D et al.	4. 巻 185
2. 論文標題 Thymic epithelial cells co-opt lineage-defining transcription factors to eliminate autoreactive T cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 2542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2022.05.018	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 該当する

1. 著者名 Tomioka S, Hase K, Y-G Kim et al.	4. 巻 40
2. 論文標題 Cooperative action of gut-microbiota-accessible carbohydrates improves host metabolic function.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 111087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111087	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 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 長谷耕二
2. 発表標題 腸内細菌とM細胞によるIgA応答の制御
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長谷耕二, 内山純, 秋山雅博, 大橋若奈, 金倫基
2. 発表標題 腸内細菌による含硫化合物の産生: 宿主機能調節における潜在的な役割.
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koji Hase
2. 発表標題 Raison d'etre of gut microbiome: immune regulation & Beyond
3. 学会等名 IMMUNO ONCOLOGY RESEARCH WORKSHOP（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koji Hase
2. 発表標題 Maternal gut microbiota in pregnancy influences susceptibility to metabolic syndrome in offspring
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koji Hase
2. 発表標題 Raison d'etre of gut microbiome: immune regulation & Beyond.
3. 学会等名 The First International School on Advanced Immunology 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷耕二
2. 発表標題 免疫・代謝性疾患に及ぼす腸内代謝物の影響.
3. 学会等名 第24回 日本神経消化器病学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷耕二
2. 発表標題 母体腸内細菌は胎児の発達と疾患感受性に影響を与える.
3. 学会等名 第58回日本周産期・新生児医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koji Hase
2. 発表標題 Maternal Gut Microbiota Regulates Offspring Metabolic Phenotype.
3. 学会等名 Canadian National Perinatal Research Meeting (CNPRM) Virtual 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷耕二
2. 発表標題 腸内細菌による世代を超えた病態制御.
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷耕二
2. 発表標題 腸内代謝物による免疫・バリア修飾.
3. 学会等名 第108回 日本消化器病学会（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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