

平成30年6月7日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01717

研究課題名(和文) 腸内細菌叢プロファイル変化に対応した食物由来成分による心血管内皮傷害予防法の開発

研究課題名(英文) Interaction between gut microbiota and food-derived compounds for prevention and control of cardiovascular endothelial dysfunction

研究代表者

馬渡 一諭 (MAWATARI, Kazuaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・講師

研究者番号：40352372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：心血管機能の恒常性維持には血管内皮細胞が重要な役割を果たしている。本研究では動脈硬化初期病変モデルの腸内細菌叢の変化を観察すること、さらに、血管内皮傷害を予防する食物由来成分の検索し、それらの腸内細菌叢の変化による影響を評価することを目的とした。C57BL/6マウスに高脂肪食を投与すると、血管内膜の肥厚と内皮依存性弛緩が減弱していた。また、高脂肪食投与群ではBacteroidetesには差がなかったが、Firmicutesが有意に高かった。本研究では数種の食物由来ポリフェノールが血管内皮に作用し、血管内皮傷害予防を示唆する結果が得られたが、腸内細菌叢の変化による影響を評価できなかった。

研究成果の概要(英文)：Vascular endothelial cells have important roles in homeostasis of cardiovascular system. Aims of this study were to observe gut microbiota in early-stage atherosclerosis animal model, to search food-derived compounds those induce endothelium-dependent vasodilation, and to investigate effects of these compounds on gut microbiota. Intima-thickened aorta and decrease of endothelium-dependent vasodilation were observed in high fat diet (HFD)-fed C57BL/6 mice. By phylum-specific quantitative polymerase chain reaction (qPCR) for monitoring gut microbiota, HFD-fed mice had higher Firmicutes bacteria than normal diet-fed mice, but did not change Bacteroidetes bacteria. And we found that some food-derived polyphenols had activity of endothelium-dependent vasodilation, but couldn't check any effect of those on gut microbiota.

研究分野：栄養学

キーワード：腸内マイクロバイオーーム 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

世界に類をみないスピードで高齢化する我が国では動脈硬化性疾患（心筋梗塞などの虚血性心疾患と脳梗塞・脳出血などの脳血管障害）による死亡が悪性新生物と並んで大きな位置を占め（総死因の約 30%）、ますますその頻度の増加が予想される（平成 25 年国民動態統計より）。また、動脈硬化性疾患の高リスク者（メタボリックシンドローム該当者・予備軍や糖尿病合併症患者など）数は改善していないことは大きな課題である（健康日本 21 最終評価より）。今後、有効な予防と治療対策の確立は喫緊の課題である。人々の QOL（生活の質）や健康寿命の維持・増進するためには、健常者および動脈硬化発症のリスク者に対する一次予防（発症予防及び発症リスクの低減）が重要な対応策となる。血管機能の恒常性維持には血管内皮細胞が重要な役割を果たしている。アテローム性（粥状）動脈硬化の初期病変はこの血管内皮細胞の傷害や機能破綻が主な要因となる。そこで本研究では安全かつ安心である食物または食物由来の成分による血管内皮細胞を標的とした予防法に着目した。近年、動脈硬化のリスク因子である慢性代謝性疾患（耐糖能異常や内臓脂肪型肥満など）の患者では、腸内細菌叢プロファイルが変化していることが報告された（Venessa K. *et al*, *Science* 2014）。また、高脂肪食（特に動物性脂肪）の過剰摂取も腸管細菌叢プロファイルへ変化させる要因である（David LA. *et al*, *Nature* 2014）ことも示唆されている。そこで、栄養学的介入による血管内皮傷害予防や動脈硬化性疾患の予防をより向上させるには、対象者（高リスク者や疾患モデルなど）における腸内細菌叢プロファイル変化への対応が重要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 食餌誘導性の動脈硬化初期病変モデル動物の作成し、腸内細菌叢の変化を評価すること、(2) 血管内皮に作用し血管内皮傷害を予防する食物由来の候補化合物を検索すること、さらに、(3) これらの食物由来成分が腸内細菌叢の変化による影響を受けるかを評価すること、を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 齧歯類動物モデルへの高脂肪食投与による食餌誘導性の動脈硬化初期病変モデル動物の作成し、腸内細菌叢の変化を観察した。動脈硬化病変の評価は組織染色による形態学的変化の観察とイージーマグナスを用いた機能的変化（内皮依存的弛緩反応）で評価した。腸内細菌叢の変化は菌種（門）特異的な定量的 Polymerase chain reaction (qPCR) と変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (Denaturing

gradient gel electrophoresis, DGGE) 法により細菌叢の変動を評価した。

(2) 血管内皮に作用し、弛緩反応を誘発する、または、内皮の肥厚を予防する食物由来成分を検索した。主にイージーマグナスを用いた内皮依存的弛緩反応で評価を行った。

(3) (2) で検索した化合物の腸内細菌叢による影響を評価した。血中における化合物の検出を液体クロマトグラフィー (LC: Liquid Chromatography) - 飛行時間型質量分析装置 (TOFMS: Time of Flight Mass Spectrometry) で測定した。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食投与による食餌誘導性の動脈硬化初期病変モデルの作成を行った。高脂肪食を齧歯類動物モデルに投与し、血管内皮の機能や形態学的変化を観察した。イージーマグナスを用いて血管内皮機能を評価すると、有意に内皮依存性弛緩反応が減弱していた。また、血管病理切片を作成しヘマトキシレン・エオシン (HE) 染色を行うと、血管内膜の肥厚がみられた (図 1)。次に高脂肪食投与を行った C57/BL6 マウスの糞便中の DNA を精製し、特異的オリゴ DNA プライマーを用いた定量的 PCR により *Firmicutes* 門と *Bacteroidetes* 門の細菌数を評価した。通常食投与群と比較すると高脂肪食投与群では *Bacteroidetes* 門には差がなかったが、*Firmicutes* 門細菌が有意に高かった。高脂肪食投与による動脈硬化初期病変モデル動物は腸内細菌叢が変化していることが分かった。さらに、高脂肪食投与と同様の細菌叢の変化は人工甘味料の 1 つである Xylitol や低用量の抗生物質投与でもみられることがわかった。

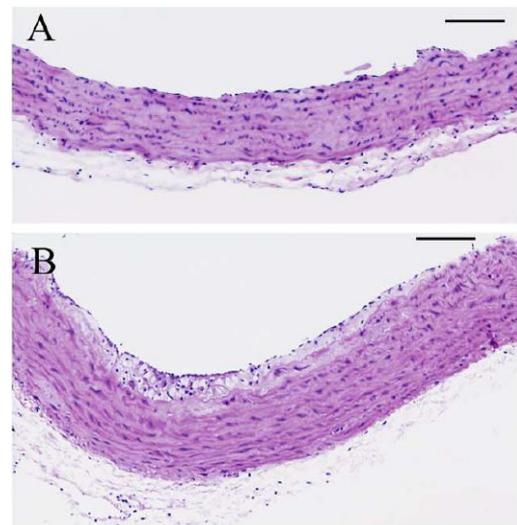


図 1 大動脈の組織病変 (A: 通常食群, B: 高脂肪食群)

表 1 高脂肪食投与による組織重量及び血中脂質の変化 (CD: 通常食、HFD: 高脂肪食)

	Diet	
	CD (n = 5)	HFD (n = 5)
Final body weight, g	33.4 ± 0.3	38.5 ± 1.3
Visceral fat, g/kg body weight	15.2 ± 1.2	43.9 ± 4.5
Cecum weight, g/kg body weight	17.7 ± 0.9	8.9 ± 0.8
Hepatic parameters		
Liver, g/kg body weight	48.6 ± 0.7	43.5 ± 3.8
Total cholesterol, mmol/liver	7.5 ± 0.8	21.3 ± 2.8
Triglycerides, mmol/liver	8.8 ± 0.8	56.0 ± 12.3
Plasma parameters		
Total cholesterol, mmol/L	2.0 ± 0.1	3.6 ± 0.7
Triglycerides, mmol/L	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1

(2) 血管内皮に作用し弛緩反応を誘発する食物由来成分を検索した。活性がみられた食物由来成分の1つはタマネギ等に多く含まれるポリフェノール、ケルセチン (Quercetin) であった (図2)。また、徳島県産柑橘類由来のポリフェノールも候補としてあがった。

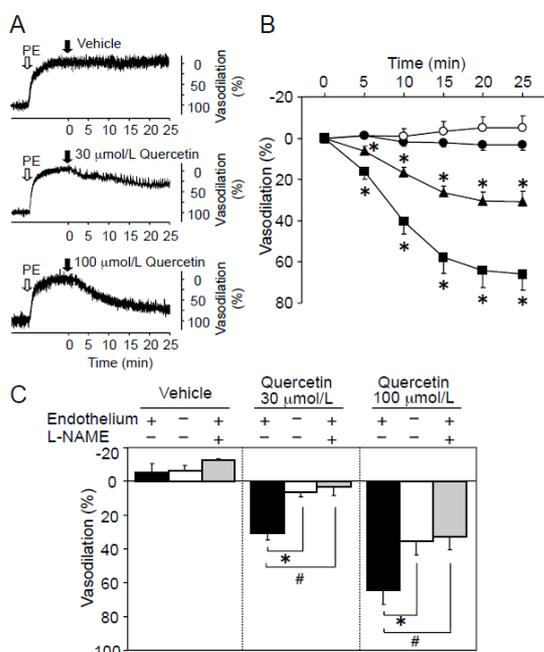


図2 イージーマグナスを用いた Quercetin による血管弛緩反応の評価。(○)Vehicle, (●) 10 μM, (▲) 30 μM, (■) 100 μM。

(3) (2) で検索した化合物の腸内細菌叢による影響を評価した。血中における化合物の検出を液体クロマトグラフィー (LC: Liquid Chromatography) - 飛行時間型質量分析装置 (TOFMS: Time of Flight Mass Spectrometry) で測定した。徳島県産柑橘類由来のポリフェノール (精製物) を経口投与すると、精密質量 360.85 m/z の化合物が検出された (図3)。同様に他の食物由来成分の検出できたが、平成 29 年度内には腸内細菌叢の変化がこれらの化合物の代謝にどのような影響を与えるかは評価できなかった。

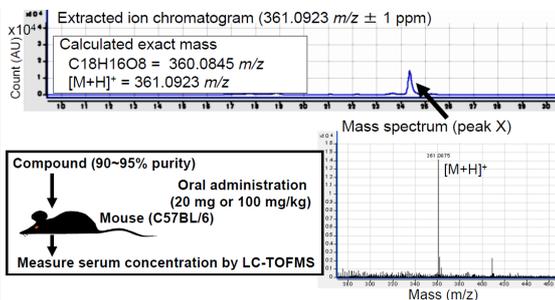


図3 LC-TOFMS による血中内食物由来成分の検出。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Ayumi Yoshimoto, Takashi Uebanso, Mutsumi Nakahashi, Takaaki Shimohata, Kazuaki Mawatari, Akira Takahashi : Effect of prenatal administration of low dose antibiotics on gut microbiota and body fat composition of newborn mice., Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 査読有, Vol.62, No.2, 155-160, 2018, DOI: 10.3164/jcbrn.17-53.

Takashi Uebanso, Saki Kano, Ayumi Yoshimoto, Chisato Naito, Takaaki Shimohata, Kazuaki Mawatari, Akira Takahashi : Effects of Consuming Xylitol on Gut Microbiota and Lipid Metabolism in Mice., Nutrients, 査読有, Vol.9, No.7, 2017, DOI: 10.3390/nu9070756.

Takashi Uebanso, Ai Ohnishi, Reiko Kitayama, Ayumi Yoshimoto, Mutsumi Nakahashi, Takaaki Shimohata, Kazuaki Mawatari, Akira Takahashi : Effects of Low-Dose Non-Caloric Sweetener Consumption on Gut Microbiota in Mice., Nutrients, 査読有, Vol.9, No.6, 2017, DOI: 10.3390/nu9060560.

[学会発表](計 4 件)

上番増 喬, 大西 愛, 北山 礼子, 吉本 亜由美, 中橋 睦美, 下畑 隆明, 馬渡 一隼, 高橋 章 : 許容上限量の甘味料の摂取が腸内細菌叢と宿主へ及ぼす影響の解析, 日本栄養食糧学会 (沖縄県), 2017 年 5 月。

吉本 亜由美, 上番増 喬, 中橋 睦美, 下畑 隆明, 馬渡 一隼, 高橋 章 : Effect of low dose antibiotics administration during prenatal period on newborns postnatal health, 第 89 回日本細菌学会総会 (大阪府), 2016 年 3 月。

Takashi Uebansou, Ai Ohnishi, **Takaaki Shimohata**, Mutsumi Nakahashi, **Kazuaki Mawatari**, Akira Takahashi : Acceptable daily intake levels of sucralose consumption reduces fecal *Clostridium* cluster 4 in mouse, 12th Asian Congress of Nutrition (神奈川県), 2015年5月.

Ayumi Yoshimoto, Takashi Uebansou, **Kazuaki Mawatari**, Mutsumi Nakahashi, **Takaaki Shimohata**, Akira Takahashi : Low dose antibiotics treatment in the prenatal period affect newborns health in later life, 12th Asian Congress of Nutrition (神奈川県), 2015年5月.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/yobokankyoeiyo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬渡 一諭 (MAWATARI, Kazuaki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師
研究者番号：40352372

(2) 研究分担者

下畑 隆明 (SHIMOHATA, Takaaki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：90609687

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし