

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19136

研究課題名（和文）エピゲノム修飾をマーカーとした腸内フローラにおける糖尿病合併症制御因子の探索

研究課題名（英文）Investigation of gut microbiotic and epigenetic factors involved in diabetes complications

研究代表者

中山 二郎（Nakayama, Jiro）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：40217930

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、隠れた臓器とも言われる腸内細菌叢から2型糖尿病の合併症の進行に関わる因子を探索することである。まず、2型糖尿病患者の腎機能正常群と低下群の糞便細菌叢の差を調べ、腎機能正常群にPrevotella属細菌、Veillonellaceae科細菌が多いことを見出した。Veillonella属細菌は亜硝酸を高生産することが知られており、亜硝酸を介して腎機能低下を抑制している可能性がある。また、腸内細菌の主要代謝物である二次胆汁酸のリトコール酸に弱いSIRT1阻害活性とSIRT2亢進活性を見出した。これらのエピジェネティックな活性を通して、2型糖尿病の進行を亢進している可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病として増加の一途をたどる2型糖尿病であるが、その怖さは、自覚症状のないままに血管障害が進行し、神経障害、網膜症、腎症、動脈硬化など患者のQOLを脅かす合併症に進展していくことである。本研究は、食と健康のインターフェースとして、人体に日々大量の代謝物を送り込む腸内細菌叢のエピジェノミックな作用に着目して研究を展開し、腸内細菌叢の主要代謝物であるリトコール酸は弱いながらも生体の代謝恒常性や炎症制御に働くサーチユイン活性に作用することを見出した。また細菌叢の因子として亜硝酸生産菌の関与の可能性も示唆した。さらに研究を進展させる意義ある発見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study aims to find gut microbiotic factor involved in the control of progression of type 2 diabetic (T2D) complications. First, gut microbiota was compared between T2D patient with and without lowered kidney function. As a result, Veillonellaceae and Prevotella were more abundant in the group of T2D patients without lowered kidney function. Veillonella is known to produce nitrite, which protects kidney function. Second, we investigated a series of epigenetic activity of major intestinal bile acids. As a result, a major secondary bile acid, lithocholic acid, shows a weak SIRT1 inhibitory activity and SIRT2 promoting activity, suggesting the possibility that lithocholic acid promotes progression of T2D complications through the epigenetic activity.

研究分野：腸内微生物学

キーワード：腸内細菌叢 エピゲノム サーチユイン リトコール酸 Veillonella 亜硝酸

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病として増加の一途をたどる2型糖尿病であるが、その疾病の怖さは、自覚症状のないままに重篤な合併症が進行することである。特に、長期の血管障害から腎症が憎悪し、最終的には人工透析に至る。現在人工透析導入者の4割以上が糖尿病患者であり、糖尿病腎症は患者のQOLを脅かす合併症である。その他、血管障害により動脈硬化や心臓病、脳卒中のリスクも高まると言われ、糖尿病に起因する血管障害の発症機序とリスクファクターを知ることは喫緊の研究課題である。

2. 研究の目的

2型糖尿病患者の間では、合併症の進行具合に個人差が大きく、合併症発症群と非発症群の間には何らかの違いが存在すると考えられる。また、糖尿病患者においては、高血糖状態となってから症状として見られる合併症が発症するまで10年オーダーでの期間がある。よってここでは、長期的にその効果が蓄積される要因としてのエピゲノム修飾と、食と健康のインターフェースとして、人体に日々大量の代謝物を送り込む腸内細菌叢に注目し、研究を展開することにした。

3. 研究の方法

3.1. 腸内細菌叢要因の探索

東北中央病院における人間ドック受診者から、HbA1c > 6.5%、空腹時血糖値 > 126 mg/dL の38名から、腎機能正常群(eGFR > 60 mL/min/1.73 m², n=29)と腎機能低下群(eGFR < 60 mL/min/1.73 m², n=9)の糞便細菌叢を16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンシングにより決定した。そして得られた各サンプルの菌組成データを用いて、LEfSe (Linear discriminant analysis effect size) 解析を、腎機能正常群と腎機能低下群の2群間で行い、各群で有意に多い菌群を網羅的に抽出した。

3.2. 腸内細菌主要代謝物である胆汁酸のエピゲノム活性の解析

ヒト便中から検出される19種の胆汁酸のサーチユイン(SIRT1, SIRT2, SIRT3)のヒストン脱アセチル化酵素活性に対する阻害あるいは亢進活性を調べた。各胆汁酸は50 µg/mlの濃度で試験した。

さらに、15種の胆汁酸のCaco-2細胞、HeLa細胞、EA/hy926細胞のH3およびH4のヒストン修飾調節活性を試験した。

4. 研究成果

1) 腸内細菌叢要因の探索 (糖尿病罹患腎機能低下群と非低下群の群間比較)

LEfSe解析の結果、腎機能正常群では *Prevotella_9* 属、*Veillonellaceae* 科が有意に多く、腎機能低下群では *Clostridia* 綱が有意に多いことが示された。Wicaksono らは口腔 *Veillonella* 属細菌が亜硝酸塩産生を促進し、自身は亜硝酸塩に対して高耐性を持つことを明らかにしている。また Tsuchiya らは、亜硝酸が腎保護作用を示すことを報告している。一酸化窒素(NO)は血管弛緩因子である他、生体防御機構、活性酸素の除去など様々な生理作用を持つ。また糖尿病腎症では、病気の発症および進行にNO量の低下も報告されている。Tsuchiya らは亜硝酸塩が5'-AMP-activated protein kinase (AMPK)を活性化させ、その結果、内皮NO合成酵素が活性化されNOの生産が高まることを報告している。すなわち、亜硝酸塩が腎保護作用を発揮するという可能性を示唆している。よって、腸管でも *Veillonella* 属細菌を含む *Veillonellaceae* 科が、亜硝酸塩を産生し、腎機能の保護に働いて

いる可能性が考えられる。

2) 胆汁酸のエピジェネティック調節作用

胆汁酸は本来、食餌性の脂質を吸収するために胆嚢から十二指腸に分泌される消化液の成分である。しかし、その量は一日 20 g から 30 g と非常に多く、腸内では腸内細菌による胆汁酸の代謝が盛んに行われている。胆汁酸は、タウリンまたはグリシンが付加された抱合型で胆嚢から分泌されるが、腸内細菌によって脱抱合され、さらに様々な修飾を受け、二次胆汁酸となる。抱合型胆汁酸から二次胆汁酸まで含めて、ヒト腸内に存在する分子種は主なものだけでも 20 種類に及ぶ。本研究ではそのうち 19 種について、まずはエピジェネティック調節作用として最もよく知られるサーチユインの活性調節作用について調べた。その結果、リトコール酸には 50ug/mL の濃度で SIRT1 に対して 60%の 阻害活性を示す一方で、SIRT2 に対しては約 1.7 倍の活性の更新を示した。リトコール酸は、デオキシコール酸と並んで、腸内の二次胆汁酸の主成分であり、疎水性が高く細胞毒性も高い悪玉胆汁酸とされている。。SIRT1 の機能の代表的なものとしては、代謝コントロール、炎症抑制が知られ、またインスリン抵抗性を改善させることも知られている。SIRT2 は糖新生向上に働くことが知られている。よって、SIRT1 の阻害と SIRT2 の活性亢進は、糖尿病の病態悪化に働くと考えられる。このような悪玉胆汁酸が、エピジェネティック調節作用を介して糖尿病の病態悪化に働く可能性が示唆されたことは、腸内細菌叢が作り出す腸内環境とエピゲノム調節を介した代謝性疾患の病態進行の間の相関を示すものとして大変興味深い。

一方、同じく、ヒト腸管胆汁酸について、Caco-2 細胞、HeLa 細胞、EA/hy926 細胞のヒストン修飾調節活性を試験したが、再現性のある顕著な傾向は見られなかった。

< 謝辞 >

サーチユインアッセイにご協力いただきました、理化学研究所環境資源科学研究センター (CSRS)の吉田稔博士、中田明子氏に厚く御礼申し上げます。

< 参考文献 >

Tsuchiya K, Miyamoto L, Yamane M, Kono M, Tomida Y, Ishizawa K, Kihira Y, Ikeda Y, Tamaki T, P27: Significance of AMPK-eNOS pathway in renal protective effects of nitrite, Nitric Oxide, 31, Supplement 1, 2013, S24, doi.org/10.1016/j.niox.2013.02.029.
Wicaksono DP, Washio J, Abiko Y, Domon H, Takahashi N. Nitrite Production from Nitrate and Its Link with Lactate Metabolism in Oral Veillonella spp. Appl Environ Microbiol. 2020; 86(20):e01255-20. doi: 10.1128/AEM.01255-20.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mishima Riko, Tanaka Masaru, Momoda Rie, Sanefuji Masafumi, Morokuma Seiichi, Ogawa Masanobu, Kato Kiyoko, Nakayama Jiro	4. 巻 135
2. 論文標題 Longitudinal gut mycobiota changes in Japanese infants during first three years of life	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 266 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2023.01.007	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 Nagao Jun-ichi, Kishikawa Sari, Tanaka Honami, Toyonaga Kenji, Narita Yuka, Negoro-Yasumatsu Kanae, Tasaki Sonoko, Arita-Morioka Ken-ichi, Nakayama Jiro, Tanaka Yoshihiko	4. 巻 40
2. 論文標題 Pathobiont-responsive Th17 cells in gut-mouth axis provoke inflammatory oral disease and are modulated by intestinal microbiome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111314 ~ 111314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111314	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 THERDTATHA Phatthanaphong, SHINODA Akari, NAKAYAMA Jiro	4. 巻 41
2. 論文標題 Crisis of the Asian gut: associations among diet, microbiota, and metabolic diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 83 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12938/bmfh.2021-085	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 篠田あかり, 中山二郎	4. 巻 2
2. 論文標題 腸内マイクロバイオーームと糞便及び血清メタボロームの変容は慢性腎臓病の重症度と関連する	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiome Science	6. 最初と最後の頁 239-240
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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Jiro Nakayama
2. 発表標題 Interaction of diet and gut microbiome in Asians and its effect on their health
3. 学会等名 22nd International Union of Nutritional Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村史織、篠田あかり、井上貴子、渡辺久剛、田中靖人、中山二郎
2. 発表標題 人間ドック受診者を対象とした腸内細菌叢と代謝疾患との関連性の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺下優理香、中山二郎
2. 発表標題 各種腸内細菌における胆汁酸脱抱合活性の比較解析
3. 学会等名 第60回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shiori Tamura, Akari Shinoda, Takako Inoue, Hisayoshi Watanabe, Yasuhito Tanaka, Jiro Nakayama
2. 発表標題 Analysis of relationship between intestinal microbiota and metabolic diseases in health checkup patients
3. 学会等名 20th Philippine Society for Probiotics and Functional Foods (国際学会)
4. 発表年 2023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	井上 貴子 (Inoue Takako) (00431700)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	
研究 分担者	中尾 洋一 (Nakao Yoichi) (60282696)	早稲田大学・理工学術院・教授 (32689)	

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