

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23658064  
 研究課題名（和文）革新的な腸管発酵制御法：腸内細菌の嫌気呼吸の促進による発癌性二次胆汁酸生成の抑制  
 研究課題名（英文）Development of an innovative method for reducing colon-cancer-inducing secondary bile acid formation through enhancement of anaerobic respiration of the intestinal bacteria  
 研究代表者  
 横田 篤（YOKOTA ATSUSHI）  
 北海道大学・大学院農学研究院・教授  
 研究者番号：50220554

研究成果の概要（和文）：大腸癌のリスク因子として大腸内に生成される発がん性二次胆汁酸が知られている。本研究では、腸内細菌による胆汁酸の還元的代謝により生成される発がん性二次胆汁酸を低減させる新しい手法として、腸内細菌の嫌気呼吸を促進させ、胆汁酸の酸化代謝を活性化させることを試みた。そこでラットにフマル酸を添加した飼料を摂取させ、盲腸内の嫌気呼吸の誘導を試みたところ、代表的な発がん性二次胆汁酸であるデオキシコール酸の低減可能性は示された。しかし、5～10%と高濃度のフマル酸添加必要であり、この濃度ではラットが下痢を起こすことから、実用的な抑制にはフマル酸のカプセル化等、添加方法の検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：Some secondary bile acids formed in the large intestine are known as a risk factor of colon cancer. In this study a novel method that reduces such secondary bile acids formed by the reductive metabolism of gut microbes were investigated. We tested if the enhancement of oxidative metabolism of the responsible gut microbes by the introduction of anaerobic respiration can reduce the target secondary bile acids. Thus, rats were fed sodium fumarate-supplemented diet to enhance anaerobic respiration of the gut microbes. Although the results suggested a possibility of decreasing relative abundance of deoxycholic acid, a representative colon-cancer-inducing secondary bile acid, the observed effects were not practically applicable, because high dose of fumarate was required (5~10% of the diet), which resulted in the diarrhea in rats experiments. Therefore, improved method of fumarate feeding, e.g. encapsulation, might be necessary to achieve this goal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,770,000	870,000	4,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：二次胆汁酸，デオキシコール酸，リトコール酸，フマル酸，嫌気呼吸，腸内細菌

## 1. 研究開始当初の背景

癌は日本人の死因の第一位を占め、中でも大腸癌の増加は著しい。その原因として食事の西欧化（脂質摂取量の増大）が指摘されている。その詳細な機序は不明であるが、胆汁酸が腸内細菌の代謝を受けて生成する「発癌性二次胆汁酸」の関与が疑われている。胆汁

酸は脂質の消化吸収を補助する消化液の成分である。小腸ではコール酸(CA)あるいはケノデオキシコール酸(CDCA)などの胆汁酸(これらを一次胆汁酸という)が食事に含まれる脂質を乳化し、分解吸収を助けている。これらの一部は大腸に流れ込み、そこで腸内細菌により種々の二次胆汁酸に変換される。この

うち *Clostridium* 属細菌の  $7\alpha$ -脱水酸化反応により生成されるデオキシコール酸(DCA)とリトコール酸(LCA)は、発癌物質そのものであることが確実にされた [Bernstein, *et al. Mutat. Res.* (2005)]. しかも、ヒト大腸内の胆汁酸の60%はDCAとLCAで占められている。しかしながら現在、この発癌性二次胆汁酸の生成反応を抑制する有効な方法は見つかっていない。胆汁酸の分泌量は脂質摂取量に対応して増大するため、食事の西欧化により発癌性二次胆汁酸量も増大し、大腸癌のリスクも連動して増大するのではないかと想定される。

## 2. 研究の目的

そこで本研究の目的を「腸内細菌の嫌気呼吸の促進を基軸とする革新的発癌性二次胆汁酸生成抑制法の開発」とした。以下にその詳細を説明する。

(1) 発癌性二次胆汁酸の生成機構とその抑制方策：これまでの研究から *Clostridium* 属細菌の DCA 生成反応は還元反応であることが示されている [Ridlon *et al. J. Lipid Res.* (2006)]. 腸内環境は嫌氣的であるため (=還元反応が進みやすい)、申請者らはこの反応が進みやすいのは当然と考えた。そうであるならば、逆に腸内環境で酸化反応を進みやすくすれば、これまで起こり難かった一次胆汁酸の酸化的代謝が顕在化し、DCA, LCA の生成が抑制されるのではないかと想定した。

(2) フマル酸呼吸の活性化：腸内環境で酸化反応を進みやすくするためには、腸管内に酸化反応に共役する適当な電子受容体を導入して腸内細菌の嫌気呼吸\*を促進させればよいと考えられる。そこで電子受容体として有機酸の一種フマル酸を用い、腸管内でフマル酸呼吸と呼ばれる腸内細菌の嫌気呼吸を活性化させ、胆汁酸の酸化的代謝を促進させることとした。具体的には実験動物としてラットを用い、フマル酸を添加した飼料を摂取させ、嫌気呼吸の促進による発癌性二次胆汁酸生成抑制の可能性について検証する。[\*酸素以外を電子受容体とする呼吸の総称]

## 3. 研究の方法

本研究では実験動物としてラットを用いた。ラットの盲腸はヒトの大腸に相当する。そこで、次に述べる二通りの方法でフマル酸添加食をラットに摂取させ、フマル酸の摂取が、(1)盲腸内発酵に及ぼす影響、(2)発癌性二次胆汁酸生成に及ぼす影響、(3)盲腸内細菌叢に及ぼす影響、を調べる。これらのデータを統合して「腸内細菌のフマル酸呼吸促進による発癌性二次胆汁酸生成抑制の可能性」を検証する。以下に年度ごとの研究計画を述べる。

(1) フマル酸の直接添加効果の検討 (H23年度)：5週齢のWKAH/Hkm slc雄ラットにデキストリンベースの基本飼料 (AIN-93準拠、デキストリン50%、スクロース10%、カゼイン20%等を含む) を摂取させ、予備飼育後、ラットを群分けし、コントロール群は引き続き同様の基本飼料を、フマル酸群は基本飼料にフマル酸2ナトリウムを1, 5, 10%添加した飼料を摂取させ、14日間の試験飼育を行った。最終日に解剖を行い、盲腸内容物を採取し、胆汁酸生成量、有機酸生成量を測定した。

(2) カプセル化したフマル酸の添加効果の検討 (H24年度)：初年度の結果から、効果を得るためには高濃度のフマル酸を飼料に添加する必要性を認めた。これを改善するためフマル酸を腸溶性カプセルに封じ込め、消化管内での吸収を極力抑えて効果を検討した (フマル酸カプセルは森下仁丹株式会社のご好意により調製していただいた)。しかし、カプセルを用いた場合は技術的な制約からフマル酸濃度をフマル酸2ナトリウムとして最大2%までしか高められないため、この濃度で飼料に添加した。また、このため長期投与の効果を見る必要があると考え、飼育期間を10週間まで延長した。さらに、初年度の実験では盲腸内胆汁酸濃度が低く、フマル酸摂取効果が見にくかったため、胆汁酸循環量を上昇させるために、基本食としてデキストリンベースからスクロースベースの高脂肪食 (デキストリンをスクロース30%+ラード20%に置き換え) に変更して検討を行った。なお、基本食には同量の空カプセルを添加した。分析項目は初年度と同様である。

## 4. 研究成果

(1) フマル酸の直接添加効果 (H23年度)：胆汁酸生成量、有機酸生成量を測定した結果、フマル酸ナトリウム 1%添加区ではコントロール群と有意な変化は認められなかったが、5, 10%添加群では、フマル酸が還元されて生成したと見られるコハク酸生成量が用量依存的に増大した (図1)。また胆汁酸代謝も DCA や LCA といった発癌性二次胆汁酸生成量が有意に減少する結果が得られた (図2)。しかし、フマル酸濃度が 10%の場合、

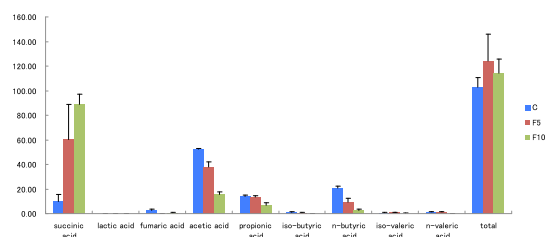


図1. フマル酸添加による糞中有機酸組成の変化. 数値は  $\mu\text{mol/g}$  wet cecal content として表示。

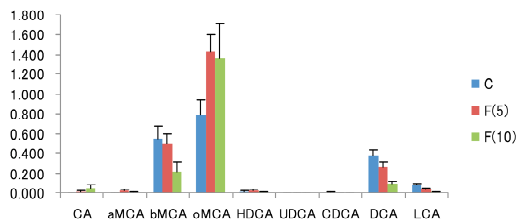


図2. フマル酸添加による糞中胆汁酸組成の変化。数値は $\mu\text{mol/g}$  dry feces として表示。

ラットが下痢を起こし、体重増加が抑制されるなど生育に悪影響が出た。このように、期待した効果が得られるフマル酸添加濃度は5~10%と高く、かなり過剰な条件を必要とすることが分かった。しかし、高濃度とはいえ、5~10%のフマル酸を飼料に添加することで、ある程度想定された盲腸内嫌気呼吸の生起の可能性や、それと相関した二次胆汁酸生成の抑制が検出されたことは、極めて有意な成果であると自己評価している。

(2) カプセル化したフマル酸の添加効果 (H24年度): フマル酸はTCAサイクルの中間体であることから、消化管内での吸収も起こりやすいと想像され、盲腸まで到達して所期の効果を顕すには困難が予想された。そこでカプセル化したフマル酸ナトリウムを飼料中のフマル酸2ナトリウムとして2%となるように添加した。基本食が前年度と異なることもあるが、胆汁酸の循環量の上昇は認められたが、フマル酸添加効果は胆汁酸生成量、有機酸生成量について共に全く見られず、フマル酸添加効果を検証することはできなかった。この理由として、フマル酸濃度が低かったこと、基本食の違いなどが考えられるが、現在段階では不明である。

## 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0件)

[学会発表] (計6件)

① Atsushi Yokota: Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. The 5th Korea-Japan-China International Symposium to promote Industry-Academia-Government Cooperation "Contribution of Lactic acid Bacteria to Preventive and Pre-symptomatic Medicine" (Catholic University of Korea, Seoul, Korea) 2012.12.4.

② 横田 篤: 「胆汁酸と腸内フローラ」 第

21 回腸内フローラシンポジウム 腸内フローラとエコロジー—食事・栄養・環境因子— 平成24年11月2日 於ヤクルトホール (東京)、主催: ヤクルト・バイオサイエンス研究財団

③ Atsushi Yokota: Is bile acid a determinant of the gut microbiota on a high-fat diet?. Symposium on Recent Researches on GUT Microbiota (大同大学, 台北市, Taiwan, R.O.C.) 2012.6.29.

④ 李 慈英, 吹谷 智, 和田 大, 横田 篤. 新規ウルソデオキシコール酸生成腸内細菌 Ruminococcus gnavus N53 由来の  $7\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase の発現と機能解析. 2012年度日本乳酸菌学会泊まり込みセミナー講演要旨集 p8. 2012年5月10日. 於, 別府湾ロイヤルホテル (大分県).

⑤ K.B.M. S. Islam, S. Fukiya, M. Hagio, N. Fujii, S. Ishizuka, T. Ooka, Y. Ogura, T. Hayashi, A. Yokota: Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. The 2nd ENGIHR Workshop (VTT, Helsinki, Finland) 2012.5.2-4.

⑥ 李 慈英, 荒井尚志, 吹谷 智, 和田 大, 横田 篤. 新規ウルソデオキシコール酸生成腸内細菌 Ruminococcus gnavus N53 由来の  $7\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase の発現と機能解析. 2012年度日本農芸化学会大会講演要旨集 3C09a11. 2012年3月24日. 於, 京都女子大学 (京都市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 篤 (YOKOTA ATSUSHI)  
北海道大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：50220554

(2) 研究分担者

石塚 敏 (ISHIZUKA SATOSHI)  
北海道大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：00271627

(3) 連携研究者

なし