

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651232

研究課題名(和文) 微生物の代謝活性と局在性を同時検出するマイクロイメージング技術の開発

研究課題名(英文) The development of micro-imaging method to realize simultaneous detection of metabolism and localization of microbe

研究代表者

下山 武文(Shimoyama, Takefumi)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10534878

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)：習慣的多量飲酒によって大腸がんが誘発されることがわかっており、その原因としてアセトアルデヒドが少なからず影響を及ぼしていると考えられる。本研究では、腸内細菌が実際にヒト大腸内でアセトアルデヒドを生成しているのか調べ、生成量に依存した識別方法で可視化することを最終目標に掲げた。

はじめに、実際に腸内細菌の作用によって大腸内でAChが生成していることを確認した結果、今まで大腸がんとは一緒に議論されてこなかった特定の属が重要な役割を担っていることが推定できた。次にFISH法によって対象微生物を蛍光染色し、顕微鏡観察した。その結果、対象微生物が腺腫表面に高密度に局在している様子が観察できた。

研究成果の概要(英文)：Habitual high amount of drinking induce cancer of human large intestine. The reason of drinking-related cancer is considered as an effect of acetaldehyde, which is produced by enterobacterium as a metabolite of ethanol. Object of this study is to confirm a production of acetaldehyde by enterobacterium on the surface of mucous membrane of human large intestine, and to visualize a production of acetaldehyde from bacterial cells. First, I confirmed the amount of acetaldehyde production by colon enterobacterium isolated from feces of alcoholics. As a result, specific genus, which were not discussed with colon cancer, were concerned to play an important role in acetaldehyde production. Subsequently, cells of objective genus were visualized by fluorescence in situ hybridization. Localized cells of specific stained microbe were observed on the surface of biopsy.

研究分野：微生物生態学

キーワード：応用微生物 がん アセトアルデヒド 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

食中毒菌のような直接的なヒトへの疾病以外に、ヒト腸内細菌叢は肥満や生活習慣病など、間接的に影響を及ぼすことが示されている。腸内細菌が関与すると考えられる疾病のなかで、本研究はヒト大腸がんに着目し、予研究を行った。大腸がんのリスクを上げる例として、飲酒の量と大腸がんには明確な正の相関が認められており、この大腸がんの発生が顕著に確認できる例がアルコール症患者である。アルコール症患者の大腸における腺腫の生成率やがん発症率は、健常者と比較すると桁違いに高いことが知られている。水上らは、アルコール症患者の大腸腺腫発見率は54%、アルコール症患者の大腸がん発症率は5.9%であると報告している(水上ら, 消化器科, 48, 599, 2009)。これらの数値は、わが国の国民の大腸腺腫発見率や大腸がん発症率(大腸線種 1.41%, 大腸がん 0.18%)と比較すると格段に高く、アルコール症患者が、飲酒習慣による大腸がん罹患リスク増大の原因を探る研究対象として重要であることを示している。アルコール症患者でポリープと大腸がんが高い割合で発症する原因として、飲酒による腸内のアセトアルデヒド濃度上昇が原因であると予想されてきた。そこで、我々はアルコール症患者を対象に以下の予備実験を行った。

1. アルコール症患者の大腸内は本当にアセトアルデヒド濃度が高いのか調査

2. 10人のアルコール症患者の糞便から合計1000株を超える微生物株を分離

この予備実験において、アルコール症患者の糞便を用いた腸内アセトアルデヒド濃度測定の結果、アルコール症患者の腸内アセトアルデヒド濃度は健常者に比べてむしろ大幅に低いという、予想とは全く逆の事実が確認された。この結果は今までの予想を覆す驚くべき事実である。このことからアルコール症患者の大腸がん発症は飲酒による腸内アルデヒド濃度上昇が原因ではなく、腸内における微生物のアセトアルデヒドの生成・蓄積が大腸発がんの原因であることを疑った。事実、分離されたいくつかの腸内細菌についてはアセトアルデヒド生成能があることが確認された。しかしながら、アルコール症患者の大腸内の微生物フローラを健常者のそれと比較した例はなく、腺腫やがん組織に局所的に存在する腸内細菌のアセトアルデヒド産生能と発がんリスクとの関係を論じた研究は全くない。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は飲酒と腸内細菌の代謝への影響のまだ解明されていない基礎的研究を完成し、大腸発がん発症のメカニズムの解明と

予防技術開発の応用に展開するための基盤となる研究を行う。具体的に本研究では、実際に腸内細菌がヒト腸内環境においてアルコールからアセトアルデヒドを生成しているのか確認し、さらにはその生成量を可視可することを旨とする。

3. 研究の方法

アルコール症患者と健常者の腸内環境の差を明確にするために腸内フローラの解析を行い、また主要な微生物の分離を試みてアセトアルデヒド生成能を調査する。さらにアルコール症患者から提供されたポリープの表面に付着する微生物の検出とアセトアルデヒド生成活性測定を試み、大腸発がんの原因と腸内細菌が生成するアセトアルデヒドの作用の解明を目指す。

(1) アルコール症患者の腸内細菌フローラの調査

はじめにアルコール症患者と健常者の腸内細菌叢の違いを明らかにするために、アルコール症患者の糞便サンプルのアルコールおよびアルデヒド代謝能を調査した後、微生物叢を解析する。アルデヒド代謝に深く関与すると思われる代表的な微生物の存在が確認できた場合には分離を試み、分離株のアルデヒド生産・分解活性の評価を行う。ここまで準備できた際は、アルコール症患者のポリープサンプルの一部分について、微生物の局在性を調査する。具体的には、特定微生物のRNAと結合する蛍光標識DNAプローブを設計し、ポリープサンプル表面の微生物局在性をFISH (Fluorescence in situ hybridization) 法で検出する。このことによって、大腸発がんを誘発する微生物と腸内での局在性が明らかになるものと期待できる。

(2) アルコール症患者の大腸ポリープ表面バイオフィルムの微生物学的分析

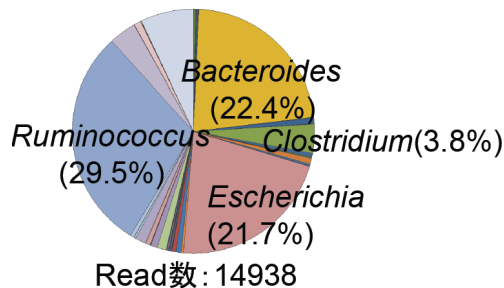
腸内壁表面のバイオフィルムでは、微生物が互いに連携し、環境に適応している可能性がある。ヒト大腸粘膜内は微好気性であり、このような微量の酸素にさらされた環境では、実験室の絶対嫌気培養とは異なる代謝を示すことが十分考えられる。この特殊環境における微生物の挙動を明らかにする

4. 研究成果

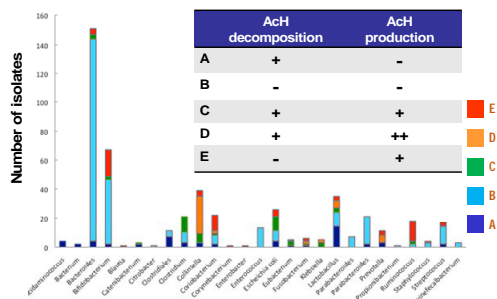
(1) アルコール症患者の腸内細菌フローラの調査

過剰のアルコール摂取による腸内細菌叢の変化を調べるために、アルコール症患者の糞便と健常者の糞便から微生物のDNAを抽出し、次世代シーケンス解析によって菌叢を比較した。これによって患者に特異的に多く検出される微生物群があることがわかった。具体的には *Ruminococcus* 属や *Prevotella* 属など、今までヒトのアルコールの代謝とは関連

づけて考えてこられなかった微生物群がアルコール代謝，つまりは発がんの原因物質として考えられるアセトアルデヒドの生産に大きく関与していることが示唆された．実際にこれらの微生物がアセトアルデヒド生産に関与しているか確認するため，糞便から分離した微生物株に対してアセトアルデヒド生産能を調査した．その結果，ヒト大腸内の環境である好気性の条件下で，嫌気性条件下よりも高いアセトアルデヒド生産能を示す株が複数見つかった．以上の結果，ヒト大腸内では特定の微生物がエタノールと微量の酸素の存在下で高濃度のアセトアルデヒドを生産し，ヒトに悪影響を及ぼしている構図が考えられる．



図．大腸腺腫に付着する微生物の割合



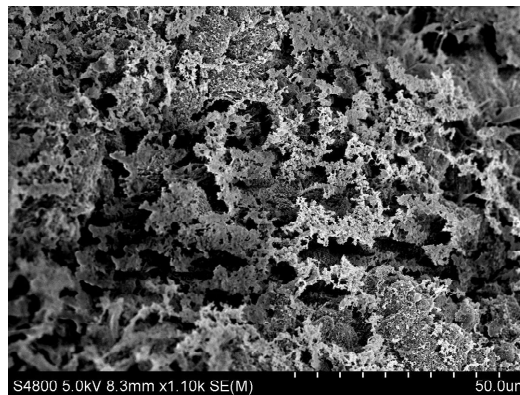
図．分離した微生物株数とアセトアルデヒド生成・分解能で判断した色分け

(2) アルコール症患者の大腸ポリープ表面バイオフィルムの微生物学的分析
前項の調査で得られたアセトアルデヒド高生産菌が実際にヒトポリープ上に存在するのかを調査した．ヒト大腸粘膜上には糞便に起因する腸内細菌が多数存在することが予想される．これらの腸内細菌はおそらく生活リズムや数日以内に食べたものによって菌叢が変動する一過性の微生物であると予想した．つまり微生物のうち，粘膜内に侵入し，かつ強固な接着性を有する，いわゆるバイオ

フィルムを形成する微生物が大腸疾患に大きく関与していると考えられる．そこで観察対象として，アルコール依存症患者の健康診断の結果に大腸腺腫が見つかった患者から共同研究者が治療の一環として腺腫を切除し，組織検査を行った残りの組織を電子顕微鏡観察した．この研究には東北大学と久里浜医療センターで倫理申請を行い，患者の同意のもと，匿名性を保って行った．その結果，未処理の腺腫の観察像では多数の微生物が観察されたが，これは前述の一過性の微生物であると考えた．これらの微生物を取り除くため，付着している微生物をリン酸生理食塩水で洗浄，さらに界面活性剤で洗浄したのちに観察した結果，腺腫表面に強固に接着するバイオフィルム形成微生物を観察することができた．

次に微生物の局在性を調査するため，FISH法 (fluorescence in situ hybridization) によって，特定の微生物に結合する蛍光色素を用いた．今回は Ruminococcus 属細菌に特異的に結合する DNA を設計し，これを蛍光色素で標識したプローブを用い，ポリープと反応させた．これによって Ruminococcus 属細菌が蛍光色に光り，蛍光顕微鏡で観察される．この結果，ポリープ表面には局所的にこの微生物が高濃度に存在する領域が観察された．前項の結果と合わせて考えると，アルコールを摂取することでアセトアルデヒドを高生産する微生物がポリープ上に高濃度に局在することが確認できた．

大腸腺腫表面で観察された Ruminococcus 属や Bacteroides 属細菌は健常者でも普遍的に検出される微生物である．しかしこれらの微生物が大腸表面に高密度に局在している点や，これらの微生物がアルコールから大量のアセトアルデヒドを生成する事実を合わせて，次の大腸がん発症メカニズムを考えた．それは，日常的に大量にアルコールを摂取する腸内環境では，これらの微生物がいわゆる悪玉菌として振る舞い，DNA の変異，さらに



図．大腸腺腫表面に微生物が付着している様子の電子顕微鏡イメージ

は発がんを誘発するというモデルである。今後はこれらの微生物を特異的に除去する手法や腸内で生成したアセトアルデヒドを除去する手法を開発することで、飲酒に起因した大腸発がんのリスクの軽減化など、新たな挑戦が期待できる。

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)

[論文発表](計 1 件)

(1) 下山武文, 鈴木幸雄, 中山亨「飲酒習慣とともに上部消化管の発がんリスク増大と口腔内アセトアルデヒド除去技術」*ILSI Japan*, 113, 16-23 (2013) (査読なし)(DOI)

[学会発表](計 8 件)

- (1) 下山武文, 桑原明香, 山口晴彦, 大島健志朗, 服部正平, 森田英利, 横山顕, 水上健, 堤絵梨, 諏訪芳秀, 中山亨「アルコール依存症患者の糞便から分離した腸内細菌のアセトアルデヒド代謝」日本農芸化学会 2014 年度大会, 明治大学生田キャンパス(川崎市) 2014 年 3 月 30 日
- (2) 中山亨, 桑原明香, 齊藤祐太, 下山武文, 須田互, 大島健志朗, 服部正平, 森田英利, 横山顕, 水上健, 堤絵梨, 諏訪芳秀「アルコール依存症患者の糞便中のアセトアルデヒド代謝と網羅的な腸内細菌叢解析」日本農芸化学会 2014 年度大会, 明治大学生田キャンパス(川崎市) 2014 年 3 月 30 日
- (3) 鶴谷篤生, 菅将吾, 齊藤祐太, 坪嵩久, 天間菜月, 稲井真, 高橋征司, 下山武文, 横山顕, 水上健, 中山亨「アセトアルデヒド蓄積微生物によるバイオフィルム形成と酸化ストレス応答」日本農芸化学会 2014 年度大会, 明治大学生田キャンパス(川崎市) 2014 年 3 月 30 日
- (4) 下山武文「習慣的多量飲酒を原因とする上部消化管がんリスクの増大と微生物酵素を用いた発がん予防技術」天然物ケミカルバイオロジーシンポジウム, 東北大学工学部(仙台市) 2014 年 3 月 3 日
- (5) 坪嵩久, 下山武文, 山口晴彦, 細矢美穂, 中山亨「*Gluconobacter kondonii* が生産する酵素を用いたヒト口腔内アセトアルデヒド除去技術」日本微生物生態学会 2013 年度大会, 鹿児島大学(鹿児島市) 2013 年 11 月 23 日
- (6) 鶴谷篤生, 下山武文, 桑原明香, 齊藤祐太, 菅将吾, 横山顕, 水上健, 中山亨「習慣的多量飲酒が及ぼす腸内微生物のアルコール代謝への影響」日本微生物生態学会 2013 年度大会, 鹿児島大学(鹿児島市) 2013 年 11 月 23 日
- (7) 長瀬昭広, 櫻井明徳, 細矢美穂, 下山武

文, 中山亨「*Lactobacillus* 属を用いた飲酒後の口腔内アセトアルデヒド除去技術の開発」日本農芸化学会 2013 年度大会, 東北大学(仙台市) 2013 年 3 月 26 日

- (8) 山口晴彦, 下山武文, 細矢美穂, 高橋征司, 堤絵梨, 鈴木幸雄, 諏訪芳秀, 中山亨「*Gluconobacter* 属を用いた飲酒後の口腔内アセトアルデヒド除去技術の開発」日本生物工学会 2012 年度大会, 神戸国際会議場(神戸市) 2012 年 10 月 24 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下山 武文(SHIMOYAMA, TAKEFUMI)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 10534878