

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07709

研究課題名(和文) 硫酸化ムチン付着性乳酸菌による腸内細菌叢改善と慢性炎症抑制効果

研究課題名(英文) Studies on prevention of obesity-induced low-grade inflammation through improving the profile of gut microbiota by potential probiotic which binds to sulfated sugar chains

研究代表者

向井 孝夫 (Mukai, Takao)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：20229917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌叢の構成変化と腸管バリア機能の低下に関連性があることは徐々に明らかにされつつあるが、その詳細は明らかにされていない。本研究では、食餌誘導性肥満マウスにおいて、腸管ムチンに見出される硫酸化糖鎖に結合性を示すプロバイオティクス候補株が腸内細菌叢の構成を改善することで腸管透過性の亢進を抑制することを強く示唆した。また、高脂肪食によって増加する胆汁酸の一種であるコール酸の腸内細菌による代謝産物がバリア機能低下の一つの因子となっているという新しいメカニズムを提示することができた。

研究成果の概要(英文)：Intestinal epithelial barrier dysfunction and increased permeability is supposed to cause microbial or microbial components translocation which may induce low-grade inflammation in various diseases. It has also been suggested that high-fat diet-induced obesity causes gut dysbiosis that drives inflammation in various diseases. Moreover, the relation of gut dysbiosis to intestinal barrier dysfunction has gradually been clarified, but mechanisms are unknown.

This study strongly suggested that potential probiotic which binds to sulfated sugar chains found in gut mucin prevents intestinal epithelial barrier dysfunction through improving the profile of gut microbiota in high-fat diet-induced obesity model mouse. Furthermore, we suggest a novel mechanism for barrier dysfunction on a high-fat diet involving the effect of metabolites of cholic acid which is one of bile acids by gut microbiota.

研究分野：農学

キーワード：乳酸菌 腸内細菌 肥満 腸管バリア機能 ムチン プロバイオティクス

## 1. 研究開始当初の背景

人や動物の腸内には 500 種類、100 兆個を超える多種多様な細菌（バクテリア）が棲息していると考えられており、一定のバランスが保たれた生態系が作り上げられ、いわゆる腸内細菌叢を形成している。腸内細菌叢の解析技術がこの数年で劇的に発展し、細菌叢の全体像が明らかにされつつある。その結果、腸内細菌叢を構成している菌叢の変化、換言すれば正常な腸内細菌叢の破たんが、種々の疾病の原因になっていることが示唆されつつある。

本研究では肥満と腸内細菌の関係について取り上げるが、最近、正常な腸内細菌叢の破たんが肥満の要因となることが報告され注目されている。すなわち、一部の腸内細菌がエネルギー調節や栄養摂取のエネルギー恒常性維持に寄与しており、Firmicutes 門に対する Bacteroidetes 門に属する細菌種の比率が低下すると肥満が誘導されることが報告されている (Turnbaugh et al. 2009)。また、「肥満型」の腸内細菌叢の中では、炎症や DNA 損傷作用が示されている硫化水素を産生する細菌種が特異的に増加する (Shen et al. 2013)。

一方で、肥満になると腸管粘膜バリア機能が低下し、腸内細菌由来グラム陰性菌の細胞壁リポ多糖 (LPS) が、低濃度のレベルで血中へ持続的に移行することが示唆されている (Hawkesworth et al. 2013)。LPS は炎症誘導物質であり、LPS の腸管外への漏出、それに続く血中への持続的な移行は、特定の器官での慢性的な炎症反応を引き起こすことが強く推察される。たとえば、内臓脂肪組織において炎症反応が持続すると、インスリン抵抗性の亢進に伴う糖尿病や動脈硬化のリスクが高まることが示唆されている。また、LPS により誘導された炎症性サイトカインが視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質軸を刺激することで、ストレス性疾患を増悪することが示唆されている (John et al. 2012)。すなわち、正常な腸内細菌叢が破たんし肥満が誘導されると、粘膜バリア機能が低下し、全身的な慢性炎症が亢進され、結果として動脈硬化やがんなど生活習慣病やストレス性疾患が増悪することが強く推察される。

ところで、研究代表者は本申請以前まで、乳酸菌の腸内定着機構を検討する過程で、ある種の乳酸菌の中には糖鎖結合タンパク質であるレクチンを産生し、腸上皮細胞を特異的に認識する菌株が存在することを世界で初めて明らかにしてきた。その後、ヒトや動物腸内からレクチン産生菌株を幅広く見出してきたが、一連の研究に基づき、腸上皮を覆うムチン糖タンパク質を構成する硫酸化糖鎖に結合性を有する乳酸菌やビフィズス菌が存在すること、およびその結合機構を明らかにした (PLoS ONE、2013、Biosci.Biotech.Biochem、2014)。硫酸化ムチンは腸上皮ムチンの主要糖鎖であること

が示されていることから、硫酸化ムチン結合性を有する乳酸菌は、腸内定着性や腸内細菌叢の安定化に大きく寄与できる可能性がよく推察された。

## 2. 研究の目的

本研究では、腸内細菌叢の恒常性を維持することが、肥満や生活習慣病やそれらが引き金となる慢性炎症や老化の予防に繋がるであろうとの仮説を立て、申請者がすでに見出してきた硫酸化ムチン結合性ビフィズス菌を活用して腸内細菌叢の恒常性を維持することで、慢性炎症に起因する疾病を予防できるものと考え立案した。

具体的には、高脂肪食給餌マウスにおける硫酸化ムチン結合性ビフィズス菌や乳酸菌投与による腸内細菌叢に及ぼす影響と内臓脂肪蓄積抑制効果、腸管バリア機能低下抑制効果、それに伴う炎症抑制効果などを評価することを第一の目的とした。

次いで、高脂肪食摂取時の腸管バリア機能低下のメカニズムを明らかにするため、高脂肪摂取により腸管で増加することが示唆されている胆汁酸の主成分であるコール酸 (CA) に注目し、CA 添加食の給餌が腸管透過性を亢進させるものと推察した。そこで CA 給餌が腸管バリア機能 (腸管透過性)、腸内細菌叢、炎症惹起に及ぼす影響を評価することとした。

## 3. 研究の方法

(1) 標準食、高脂肪食および硫酸化ムチン結合性乳酸菌 (ビフィズス菌を含む) を添加した高脂肪食を 16 週齢まで給餌することで食餌性肥満マウスに対する乳酸菌の影響を評価する。評価項目として、肥満研究に関わる一般的な項目に加え、炎症にかかわるサイトカイン関連遺伝子の発現量を測定する。腸管バリア機能は、腸管透過性にかかわるタイトジャンクション関連タンパク遺伝子および投与した蛍光標識デキストランの血中への移行量あるいは血中 LPS 濃度を測定することで評価する。病態の増悪に関与すると推察される腸内細菌叢は次世代シーケンサーを用いて解析する。

(2) 腸管透過性亢進モデルマウスを作製するため、標準食 1 kg にコール酸 0.5g を添加して調製したコール酸添加食を 4 週間投与した。

また、腸内細菌叢が腸管透過性に寄与しているか否かを明らかにするため、抗生物質の投与を行うとともに、次世代シーケンサーにより腸内細菌叢を明らかにすることとした。

## 4. 研究成果

(1) Cani らの方法 (Diabetes、2007) に従い食餌性肥満モデルマウスを作製し、ビフィズス菌や乳酸菌の腸管バリア機能改善効果や内臓脂肪蓄積に伴う脂肪組織の炎症に及ぼす影響を精密に評価することとした。供

試菌株として、腸粘膜を覆うムチンに対して付着性を有することが明らかにされてきた硫酸化ムチン付着性 *Bifidobacterium bifidum* BB 株 (ビフィズス菌) および *Lactobacillus* IWF 株 (乳酸菌) を用いた。

C57BL/6J マウスを標準食(ST 区)、標準食+BB 株投与(STB 区)、高脂肪食(HF 区)及び高脂肪食+BB 投与(HFB 区)の4群に分け、12週間の飼料給餌を行った。その結果、HF 区と比較して HFB 区は体重増加及び内臓脂肪蓄積の抑制傾向が観察された。また HF 区と比較して HFB 区では摂取エネルギー量の減少傾向が認められた。血漿成分に関しては HF 区で総コレステロールの有意な上昇が観察されたが、BB 株投与による改善は認められなかった。一方、レプチン、インスリン濃度は HF 区で有意に増加し、BB 株投与により有意に改善された。

腸内菌叢解析を行った結果、高脂肪食給餌により腸内菌叢の構成は大きく変化し、BB 株投与により変化が一部抑制されることが観察された。特に、リアルタイム PCR およびシーケンス解析の結果から、HF 区では *Enterobacteriaceae* の増加が観察され、HFB 区で増加は抑制された。また、リアルタイム PCR の結果 HF 区では *Lactobacillus* の有意な減少が観察され、HFB 区で減少の抑制傾向が認められた。さらに次世代シーケンス解析の結果、HF 区では高脂肪食給餌下で腸管バリアへの影響が示唆されている *Oscillibacter* や *Desulfovibrio* などの増加が観察され、HFB 区での抑制傾向が認められた。

次に、結腸における腸管バリア関連遺伝子の mRNA 発現量を比較した結果、HF 区と比べて HFB 区で *Muc3* の有意な増加が観察された。しかし、脂肪組織における *TLR4*、*TNF- $\alpha$* 、*IL-6* の mRNA 発現量に有意差は認められなかった。しかし、HF 区で *C/EBP- $\beta$*  発現量の有意な減少が観察され、HFB 区で減少抑制傾向が認められた。

次いで、同様に IWF 株の投与実験を行った。その結果、IWF 株投与で有意な体重増加の抑制は見られない。IWF 株投与により内臓脂肪の蓄積抑制と脂肪細胞の肥大化の抑制傾向が認められた。IWF 株を投与することで内臓脂肪における炎症性サイトカイン *TNF- $\alpha$*  の有意な抑制およびマクロファージのケモカインの一つである *MCP-1* の抑制傾向が認められた。IWF の投与により、血漿中 LPS の増加の抑制傾向が示された。高脂肪給餌マウスを用いて腸内細菌叢の網羅的解析を行った結果、IWF 投与により腸管バリア機能改善への関与が示唆されている腸内細菌が増加した。

以上から、BB 株および IWF 株投与による腸管透過性亢進の抑制効果が示唆されたため、コール酸 (CA) 給餌による腸管透過性亢進モデルマウスを作製することとした。

供試動物は 6 週齢の C57BL/6J マウスを用い、標準食+水道水区(N 区)、標準食+抗生物

質水区(N/AB 区)、CA 添加食+水道水区(CA 区)、CA 添加食+抗生物質水区(CA/AB 区)に分け 4 週間飼育し、腸管透過性試験は 0 および 3 週目に行った。実験期間中、N/AB 区の増体量は他の試験区より有意に抑制された。また、内臓脂肪蓄積量は抗生物質非投与区対して、抗生物質投与区で有意に抑制された。16S rRNA 遺伝子の定量により糞便中の総菌数を測定したところ、抗生物質の投与により糞便中の菌数は約 100 分の 1 に減少した。腸管透過性に関しては N 区と比較して CA 区での有意な亢進および CA/AB 区で有意な亢進抑制が示されたことから、CA による腸管透過性亢進には腸内細菌が影響していることが強く示唆された。

次いで、8 種類の腸管バリア関連因子の遺伝子発現量を測定したところ、N 区と CA 区に大きな違いは見られなかった。また、大腸、小腸、肝臓、脾臓、腎臓および腸間膜脂肪において炎症関連遺伝子の発現量を測定した結果、大腸において抗生物質投与により *TNF- $\alpha$*  が有意に減少し、肝臓、腎臓において CA 添加食給餌により *TNF- $\alpha$*  が増加した。さらに、次世代シーケンスによる腸内細菌叢の解析の結果、CA 添加食給餌によって *Akkermansia*、*Lactobacillus* および *Alistipes* などの減少と *Oscillibacter*、*Rosebria*、*Blantia*、*Lachnospiraceae* NK4A136 group および *Lachnospiraceae* UCG-008 などの増加が認められた。

以上から、腸管透過性や大腸における炎症の亢進には、CA 添加食給餌により変化した腸内細菌叢を構成している一部の菌種が関与しているという新しいメカニズムを提起することができた。また、CA 増加の一因である高脂肪食摂取によっても腸内細菌叢の構成変化によって腸管バリア機能が低下し、腸管に炎症を惹起する可能性が推測された。

一方、BB 株および IWF 株投与により CA 給餌が起因する腸管透過性亢進の抑制傾向がみられた。これらのことから、BB 株および IWF 株は高脂肪食給餌による肥満を抑制できなかったが、腸管透過性亢進を抑制することで脂肪組織の炎症抑制効果を有する可能性が示唆された。

## 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 15 件)

西山啓太, 向井孝夫. ビフィズス菌と宿主腸粘膜との相互作用に関わる因子. 日本乳酸菌学会誌, 29(1), 13-18(2018). 査読あり.

Nishiyama K, Yamamoto Y, Sugiyama M, Takaki T, Urashima T, Fukiya S, Yokota A, Okada N, Mukai T, *Bifidobacterium bifidum* extracellular sialidase enhances adhesion to the mucosal surface and supports

carbohydrate assimilation. *mBio*, 8(5), e00928-17 (2017). 査読あり . doi: 10.1128/mBio.00928-17

Nishiyama K, Kagamitani T, Yamamoto Y, Okada N, Mukai T. The elongation factor Tu from *Lactobacillus reuteri* inhibits the adhesion of *Helicobacter pylori* to porcine gastric mucin. *Milk Science*, 66,1,17-26 (2017). 査読あり . doi: https://doi.org/10.11465/milk.66.17

Aryantini NP, Kondoh D, Nishiyama, K, Yamamoto Y, Mukai T, Sujaya IN, Urashima T, Fukuda K, Anchorless cell surface proteins function as laminin-binding adhesins in *Lactobacillus rhamnosus* FSMM22. *FEMS Microbiol. Lett.*, 364(6). 査読あり . doi: 10.1093/femsle/fnx056. (2017)

Nishiyama K, Sugiyama M, Mukai T. Adhesion properties of lactic acid bacteria on intestinal mucin. *Microorganisms*, 4/ 3, 34 (2016). 査読あり . doi: 10.3390/microorganisms4030034

Masumoto S, Terao A, Yamamoto Y, Mukai T, Miura T, Shoji T. Non-absorbable apple procyanidins prevent obesity associated with gut microbial and metabolomic changes. *Scientific Reports* 6, 31208 (2016) . 査読あり . doi: 10.1038/srep31208

向井孝夫, 西山啓太. プロバイオティクスにおける最近の研究動向 ~ 乳酸菌やビフィズス菌との相互作用 ~ . *乳業技術* . 65, 23-40 (2016) . 査読あり .

西山啓太, 向井孝夫. 乳酸菌の腸粘膜への定着機構 . *化学と生物* , 54 , 7 , 471-477 (2016) . 査読あり .

Nishiyama K, Ueno S, Sugiyama M, Yamamoto Y, Mukai T. *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaC pilin subunit binds to the carbohydrate moieties of intestinal glycoconjugates. *Anim. Sci J.* 87 , 6 , 809-815, (2016) . 査読あり . doi: 10.1111/asj.12491

西山啓太, 向井孝夫. 乳酸菌によるカンピロバクターの感染予防とその作用機序解明に向けた研究 . *畜産技術* , 730, 2-6 (2016) . 査読あり .

Suzuki K, Nishiyama K, Miyajima H, Osawa R., Yamamoto Y, Mukai T. Adhesion properties of a putative polymorphic fimbrial subunit protein from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. *Biosci, Microbiota Food Health*, 35,19-27(2016) . 査読あり . doi: 10.12938/bmfh.2015-015

西山啓太, 向井孝夫. プロバイオティクスによる病原細菌の感染予防 . *ミルクサイエンス*, 64, 3, 245-253 (2016) . 査読あり .

Nishiyama K, Nakazato A, Ueno S, Seto Y, Kakuda T, Takai S, Yamamoto Y, Mukai T. Cell surface-associated aggregation-promoting factor from *Lactobacillus gasseri*

SBT2055 facilitates host colonization and competitive exclusion of *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.*, 98,712-726 (2015) . 査読あり . doi: 10.1111/mmi.13153.

Nishiyama K, Nakamata K, Ueno S, Terao A, Aryantini NP, Sujaya IN, Fukuda K, Urashima T, Yamamoto Y, Mukai T. Adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* mucus-binding factor to mucin and extracellular matrix proteins. *Biosci Biotechnol Biochem.*,78,271-279(2015) . doi: 10.1080/09168451.2014.972325 査読あり .

Matsui H, Takahashi T, Øverby A, Murayama S. Y, Yoshida H, Yamamoto Y, Nishiyama K, Seto Y, Takahashi T, Mukai T, Nakamura M. Mouse models for assessing the protective efficacy of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 against *Helicobacter suis* infection associated with the development of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Helicobacter*, 20, 291-298(2015) . 査読あり . doi: 10.1111/hel.12203

〔学会発表〕(計6件)

小田沙也加, 山本裕司, 向井孝夫 *Bifidobacterium breve* におけるスルファターゼ様遺伝子の探索及び機能解析, 日本畜産学会第 124 回大会 2018 年 3 月 28 日, 東京

西山啓太, 菅原宏祐, 小田巻俊孝, 福田真嗣, 高木孝士, 山本裕司, 向井孝夫, 清水(肖)金忠, 岡田信彦, 大澤 朗 . *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* が有する Fim 線毛の腸管定着における役割とポリマー化に関わるモチーフの探索 . 日本乳酸菌学会 2017 年度大会 2017 年 7 月 10 日, 宗像市

井上千佳, 本村祐樹, 山本裕司, 向井孝夫. 高脂肪給餌マウスにおけるビフィズス菌および乳酸菌の腸管バリア機能改善効果の評価 . 日本乳酸菌学会 2016 年度大会 2016 年 7 月 9 日, 東京

鏡谷竹生, 西山啓太, 鈴木謙太, 鈴木徹, 大澤朗, 山本裕司, 向井孝夫 . ヒト便由来 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* の FimA 線毛の多型がムチンへの付着性に及ぼす影響 . 日本乳酸菌学会 2016 年度大会 2016 年 7 月 9 日, 東京

上野慎太郎, 西山啓太, 仲又幸一, I. Nengah Sujaya, 福田健二, 浦島匡, 山本裕司, 向井孝夫 . *Lactobacillus rhamnosus* における mucus-binding factor と Spa 線毛の粘膜付着性の評価 . 日本乳酸菌学会 2015 年度大会 2015 年 7 月 11 日, 東京

西山啓太, 篠原有香, 浦島匡, 吹谷智, 横田篤, 山本裕司, 向井孝夫 . ビフィズ

ス菌におけるシアリダーゼのムチン付着因子としての新たな役割. 日本乳酸菌学会 2015 年度大会 2015 年 7 月 11 日, 東京

〔図書〕(計 1 件)

戸羽隆宏, 向井孝夫, 山本裕司 (分担). 乳酸菌およびビフィズス菌の構造と菌体成分 ヨーグルトの辞典, 齋藤忠夫・伊藤裕之・岩附慧二・吉岡俊満 編. 朝倉書店 東京. 2016. P 202-212

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向井 孝夫 (Takao Mukai)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号: 20229917