

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14682

研究課題名(和文) 大腸内の菌叢構造への習慣的多量飲酒の影響解明と飲酒関連大腸発がんモデルの提案

研究課題名(英文) Ecophysiological consequences of chronic ethanol consumption on human gut microbiota: implications for the pathogenesis of ethanol-related colorectal cancer

研究代表者

中山 亨 (Nakayama, Toru)

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：80268523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：習慣的多量飲酒による大腸発がんのリスク増大への腸内細菌やアセトアルデヒド(AA)代謝の関わりについて手がかりを得るため、アルコール依存症患者(ア症患者)と非患者の糞便の菌叢構造を比較した。また糞便分離微生物のエタノール代謝能を好氣的条件下で評価した。菌叢構造の個体間多様性はア症患者群で有意に増大しており、当初の予想に反して、患者の糞便中のAA濃度は非患者の同濃度よりも有意に低く、またエタノールからのAAの生成速度も、ア症患者の糞便の方が有意に小さいことがわかった。以上の結果から、習慣的多量飲酒により惹起される大腸内酸化ストレスが、アルコール関連大腸発がんのリスク因子となるモデルを提案した。

研究成果の概要(英文)：To find roles of gut microbes and their acetaldehyde metabolism in the pathogenesis of ethanol-related colorectal cancer, the gut microbiota structures of non-alcoholics and alcoholics were analyzed and compared. The gut microbiotas of alcoholics were diminished in dominant obligate anaerobes and enriched in Streptococcus and other minor species. This alteration might be exacerbated by habitual smoking. These observations could at least partly be explained by the susceptibility of obligate anaerobes to reactive oxygen species, which are increased by chronic exposure of the gut mucosa to ethanol. The acetaldehyde productivity from ethanol was much lower in the faeces of alcoholic patients than in faeces of non-alcoholic subjects. Based on these results, a model has been proposed, in which oxidative stress induced upon chronic ethanol consumption serves as an important risk factor in the pathogenesis of ethanol-related colorectal cancer.

研究分野：生化学

キーワード：acetaldehyde alcoholism gut microbiota intestinal bacteria

1. 研究開始当初の背景

飲酒後、摂取したエタノールは主として小腸で吸収され、血液中に現れる。エタノールは体内の臓器や組織に速やかに拡散し、各臓器や組織におけるエタノール濃度は血中濃度にほぼ等しい(ほろ酔い～酩酊状態における血中のアルコール濃度は 20-30 mM)。こうしたことから、アルコール使用障害患者(ア症患者)の大腸内環境は、長期間にわたり慢性的に「アルコール漬け」の状態にあると考えられる。しかしながらアルコールの慢性投与によって大腸内の菌叢構造がどのように変化するかについて、知見はない。一方、疫学研究により、習慣的飲酒量と大腸がん発症に明確な正の相関があることが示されている。ア症患者の大腸がん発症頻度が非患者の約 60 倍も高いという事実から、ア症患者は飲酒習慣による大腸がん発症の極端なハイリスクグループと考えられ、飲酒習慣による大腸がん発症の格好の研究材料であるといえる。アルコールそのものには発がん性はないとされているが、その酸化的異化によって生成するアセトアルデヒド(AcH)は、WHO(世界保健機関)の IARC(国際がん研究機関)によって 2010 年に Group 1 の発がん物質(ヒトに対して確実に発がん性がある)に認定されている。飲酒習慣による大腸がん発症のリスク因子として、エタノールから腸内細菌の作用によって生成する AcH の関与が強く示唆されている。しかしながら AcH の大腸内蓄積に関して、多種多様な腸内細菌のなかのどの微生物種が悪玉微生物(= AcH 高蓄積微生物)として重要であるかについての知見はなく、腸内微生物による AcH 生成・蓄積の具体的な機序も不明のままである。

2. 研究の目的

長期にわたる習慣的な多量飲酒により大腸がんの罹患リスクが増大する。ア症患者はその極端な症例群であり、同群の大腸がん罹患リスクは健常者の数十倍にも達する。微生物のエタノール代謝で生成するアセトアルデヒドは多量飲酒による大腸発がんの有力なリスク因子である。本研究では、(1)ア症患者と健常者の糞便の菌叢構造を比較することにより、エタノールの慢性投与の大腸内菌叢構造への影響を明らかにし、(2)習慣的多量飲酒による大腸がん罹患リスク増大の原因を腸内細菌のアセトアルデヒド代謝との関連で説明する新しいモデルを提出し、その実験根拠を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

ア症患者糞便から 700 株以上の微生物を分離し、16S rRNA 配列に基づき分類学的位置づけを行うとともに、AcH 生成能や AcH 分解能を網羅的に評価した。その結果、高い AcH 生成能をもつ微生物株(PAA)および PAA を高頻度を含む細菌種を属レベルで同定した。一方、ア症患者と健常者の糞便について

16S rRNA アンプリコン解析を行った。ア症患者の糞便は久里浜医療センターにより提供された。被験者数については、ア症患者、健常者それぞれ 20 名程度とした。454 GS system 等の次世代シーケンサーを用いて 16SrRNA (V1-V2 超可変領域)アンプリコン解析を実施した。得られた配列データの quality check からデータベースサーチまでの手法は既報の方法に則って行い、これらの解析によって得られた結果を主成分分析等によって分析し、得られた菌叢解析結果とこれらの背景因子(習慣的飲酒量等)との相関をクラスターもしくは非クラスター解析により調査した。また、ア症患者と健常者の糞便について、AcH やエタノールの含量、エタノールからの acH の生成速度や AcH 分解速度を比較した。

一方、見だしたいいくつかの PAA は、酸化的条件下でのみエタノールを酸化して AcH を生成することがわかった。そこでこれらの PAA のアルコールおよび AcH 代謝関連酵素遺伝子の転写解析を実施した。好氣的条件下で嫌気性微生物が酸化ストレスに適應する代謝応答の一環として、アセトアルデヒドを生成するという仮説を立て、これを検証した。

4. 研究成果

(1) 高い AcH 生成能をもつ微生物株および PAA を高頻度を含む属(GHPA)の同定

ヒト腸内における主なエタノール代謝微生物、すなわち AcH 蓄積微生物を同定するためにア症患者から単離した腸内細菌の網羅的な AcH 代謝能調査を行った。ア症患者は長期にわたる習慣的飲酒を行っており、その腺腫発見率は健常者の 10 倍近い。そのため、習慣的飲酒に伴う大腸発がんの原因と腸内細菌の関係を調査するうえで適した研究対象であると考えられる。ア症患者の腸内より 500 株以上を単離し、その AcH 蓄積能を評価した結果、AcH を高濃度に蓄積する株(PAA)を同定した。また PAA が特定の属に頻出することを明らかにし、それらの属を GHPA と定義した。GHPA はすべて偏性嫌気性微生物であった。また PAA の AcH 蓄積能は好気環境で大幅に増加することがわかった。実際の大腸内では糞便や腸管内中心部が偏性嫌気性であるのに対して、粘膜近傍は微好気性である。このことは、生育部位により腸内細菌の代謝能が異なる可能性を示唆しており、糞便中での AcH 蓄積能が小さい微生物でも粘膜近傍では局所的に AcH を生産しうる可能性が考えられた。

(2) 健常者とア症患者の糞便菌叢比較

菌叢の operational taxonomic unit (OTU) 数は環境中の種の多様性(α -diversity)を示し、特殊環境下では減少する傾向にあるとされる。平均 OTU 数はア症患者と健常者の間で有意差はなかったが、ア症患者の被験者間の OTU 数のばらつきは健常者よりも大きかった。UniFrac 解析により菌叢構造の個体間多様性(β -diversity)を比較したところ、ア症

患者と健常者ではその菌叢傾向が明確に異なり、ア症患者の糞便の菌叢は個体間差が大きいことがわかった。健常者と比較してア症患者において存在比が有意に変化している微生物を属レベルで検索したところ、*Bacteroides*, *Eubacterium*, *Anaerostipes* といった主要な偏性嫌気性菌が減少し、*Streptococcus*, *Coprobacillus* が増加していることがわかった。GHPA 群も、ア症患者において減少していた。

(3) 背景因子と腸内細菌叢との関係

菌叢構造の階層的クラスター解析を行ったところ、今回調査した被験者集団の中では、性別、年齢、ADH1B および ALDH2 の遺伝子多型、エンテロタイプは、菌叢構造に直接的な影響を与えないことが示唆された。一方、同じ解析によって喫煙習慣が飲酒習慣とともに菌叢構造に影響を与える可能性が示唆された。飲酒習慣はそれ単独で菌叢構造にある一定の傾向をもたらすことが示唆された。また喫煙習慣はそれ単独では被験者の菌叢構造に大きな影響を与えないが、それが飲酒習慣と合わさると相乗的に菌叢構造を多様化させることが示唆された。年齢や性別などの要素よりもア症による腸内細菌叢への影響が大きいことがわかり、さらに飲酒と喫煙の相乗効果によって腸内細菌叢が大きく変化する可能性が示唆された。飲酒習慣者の腸内細菌叢では *Bifidobacterium* が有意に減少していた。また飲酒と喫煙習慣両方を行っているヒトでは *Bacteroides* や *Ruminococcus*, *Eubacterium* の減少と *Streptococcus* の増加が確認された。興味深いことに、減少していた属はすべて偏性嫌気性菌であった。飲酒は腸粘膜に活性酸素種を蓄積させ、喫煙も人体に活性酸素種を発生させることが分かっている。このことから、飲酒習慣および飲酒と喫煙習慣の相乗は腸内細菌に酸化ストレスを与えており、結果偏性嫌気性菌が減少することで dysbiosis となり大腸発がんを惹起するプロセスが示唆された。

(4) 糞便サンプルを用いた AcH 蓄積能評価

ア症患者の糞便の AcH 蓄積能は健常者のものよりも低かった。糞便中の AcH 濃度もア症患者は健常者のものよりも小さかった。GHPA (すべて偏性嫌気性菌) の総数がア症患者で有意に減少していた事実によって合理的に説明することができた。

(5) 微生物のアルコールおよび AcH 代謝関連酵素遺伝子の転写解析

上述のように、飲酒習慣によって *Bifidobacterium* が減少していることが示された。*Bifidobacterium* の減少の理由が酸化ストレスであるとすれば、それに伴う菌自体の代謝変動も予想される。そこでア症患者腸内から単離した *Bifidobacterium* についてその有機酸生産や AcH 蓄積能を指標とした酸化ストレス応答を調査した。その結果、2 mM の過酸化水素によって有機酸生産能の停止と AcH 蓄積能の活性化が確認された。この

時の細胞内代謝経路の変動を調査した結果、アセチル CoA を中心としたヘテロ乳酸発酵経路の遺伝子発現量が顕著に増加していた。この現象は、*Bifidobacterium longum* の別の株においても確認された。これらの結果は、飲酒による *Bifidobacterium* への影響を考えた場合に酸化ストレスが大きな寄与を示すことを示唆している。しかしながら、実際に飲酒によって腸内細菌叢に酸化ストレスが加わるかどうかは明確な証拠が存在しない。飲酒関連疾患の原因を明らかにするためには、今回の結果に加えて飲酒による腸内細菌に対する酸化ストレスを実証することが必要である。

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3件)

1. Hideki Okata, Waku Hatta, Katsunori Iijima, Kiyotaka Asanuma, Atsuki Tsuruya, Naoki Asano, Tomoyuki Koike, Shin Hamada, Toru Nakayama, Atsushi Masamune, Tooru Shimosegawa: Detection of acetaldehyde in the esophageal tissue among healthy male subjects after ethanol drinking and subsequent L-cysteine intake. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* (2018) 244: 317-325.
2. Atsuki Tsuruya, Akika Kuwahara, Yuta Saito, Haruhiko Yamaguchi, Natsuki Tenma, Makoto Inai, Seiji Takahashi, Eri Tsutsumi, Yoshihide Suwa, Yukari Totsuka, Wataru Suda, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Takeshi Mizukami, Akira Yokoyama, Takefumi Shimoyama, and Toru Nakayama: Major anaerobic bacteria responsible for the production of carcinogenic acetaldehyde from ethanol in the colon and rectum. *Alcohol and Alcoholism* (2016) 51: 395-401 doi:10.1093/alcalc/agv135.
3. Atsuki Tsuruya, Akika Kuwahara, Yuta Saito, Haruhiko Yamaguchi, Natsuki Tenma, Makoto Inai, Seiji Takahashi, Eri Tsutsumi, Yoshihide Suwa, Yukari Totsuka, Wataru Suda, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Takeshi Mizukami, Akira Yokoyama, Takefumi Shimoyama, and Toru Nakayama: Ecophysiological consequences of alcoholism on human gut microbiota: implications for ethanol-related pathogenesis of colon cancer. *Scientific Reports* (2016) 27923 doi:10.1038/srep27923.

[学会発表](計3件)

1. 中山 亨「ヒト消化管常在微生物のエタノール代謝と発がん」第 89 回日本生化学会

大会 in 仙台（招待講演）2016 年 9 月 27 日 東北大学（宮城県・仙台市）

2. 中山 亨 「アルコール依存症患者の大腸内菌叢構造の再解析」第 444 回ビタミン B 研究協議会 2016 年 6 月 16 日 富山国際会議場（富山県・富山市）
3. 中山 亨 「習慣的多量飲酒と大腸発がんリスク：微生物アルコール代謝から眺めたヒトと腸内細菌の相互作用」日本農芸化学会 2016 年度大会 大会シンポジウム「微生物メタボリズム研究の最前線」(3SY09)(招待講演) 2016 年 3 月 29 日 札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

〔図書〕(計 2 件)

1. 鶴谷 篤生, 中山 亨 「メタゲノム解析実験プロトコール」229 (58-61) 2016 年 羊土社
2. 中山 亨, 鶴谷 篤生 「ヒトマイクロバリオーム研究最前線 常在菌の解析技術から生態、医療分野、食品への応用研究まで」第 3 編 第 2 章 第 2 節 472 ページ(209-217) 2016 年 エヌ・ティー・エス

〔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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 亨 (Nakayama, Toru)
東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：80268523

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし