

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20339

研究課題名(和文) マルチオミクス手法を用いた重症病態における腸内フローラと免疫応答メカニズムの解明

研究課題名(英文) The analysis of the interaction between gut microbiota, metabolite and intestinal immune response with integrative omics approach

研究代表者

池田 光憲 (IKEDA, MITSUNORI)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60548444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：重症病態では腸内フローラの構成が乱れ、腸管局所や全身免疫応答に関連することが知られているが、そのメカニズムは詳細には明らかにされていない。本研究では、マルチオミクス手法を用いた統合的アプローチにより、侵襲時の腸内環境を詳細に解析することを目的とした。研究の結果から、侵襲後には腸内フローラや代謝産物の構成が著しく変化し、特にIgAと特異的に結合するEnterobacteriaceae科の菌が顕著に増加していることが明らかとなった。治療介入として高濃度水素含有水の外的に投与したところ、生存率の改善やEnterobacteriaceae増加の抑制などが見られ、水素による潜在的な効果が見出された。

研究成果の概要(英文)：Microbiota composition is altered in the critical illness, leading to dysregulated intestinal or systemic immune responses. However, the mechanism is not well established. We aimed to analyze the interaction between gut microbiota, metabolite and intestinal immune response with integrative omics approach in a murine model of sepsis. We revealed the rapid and dynamic alterations of gut microbiota, metabolite in murine septic mice. In particular, the dramatic overgrowth of Enterobacteriaceae, which was specifically combined with sIgA, would be a key bacteria for therapeutic strategy. Furthermore, we found the potential effect of hydrogen-rich saline with improving the survival rate and attenuating the overgrowth of Enterobacteriaceae.

研究分野：救急、集中治療

キーワード：腸内フローラ マルチオミクス手法 免疫応答 IgA メタボローム解析 水素 重症病態

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸内には多種多様な腸内細菌が生息しており、腸管免疫系を中心とした複雑な腸内生態系を形成している。この恒常性がひとたび破綻すると、炎症性腸疾患などの腸管関連疾患のみならず、自己免疫疾患やアレルギー性疾患などの全身性疾患につながる事が知られている。外傷や敗血症などの重症病態においても、腸管が標的臓器となって腸管免疫系が破綻し、全身性の炎症を惹起することが指摘されている。最近では、プロバイオティクス療法などの腸管内治療の有効性が示されており、我々のグループもプロバイオティクス治療が敗血症における合併症発生率の低下や予後の改善につながる可能性があることを報告してきた。このプロバイオティクス療法の作用機序は、腸内フローラへの直接的な作用と腸管上皮を介した免疫系への作用が指摘されているが、そのメカニズムは十分には解明されていない。腸内フローラについては、近年シーケンサー技術の発展により詳細なプロファイリングが可能となり、その役割とメカニズムが少しずつ明らかになっている。あるいは、腸内細菌の代謝産物が注目されており、なかでも偏性嫌気性菌が産生する短鎖脂肪酸は腸内環境維持や生体防御に重要な役割を果たしていることが示されている。しかし、これらの多くの研究は特定の菌種や代謝産物をフォーカスしており、未知の部分も多い。また、複雑かつダイナミックに変動する侵襲期の腸内フローラの動態を詳細に解析した研究はほとんどない。

## 2. 研究の目的

本研究では、重症病態における腸内フローラやその代謝産物の動態を網羅的に解析し、同時に腸管免疫応答との関連性について評価することを目的とした。さらに、腸管内にお

いて腸内細菌により産生される水素ガス (H<sub>2</sub>)に着目し、外的な水素投与による治療効果と腸内フローラ動態の変化についても検討した。

## 3. 研究の方法

研究は、以下の4つの手順に従って行った。  
(1) 侵襲時の腸内フローラ動態の解析  
侵襲動物モデルの作成および糞便採取  
C57BL/6J マウス (6週齢、雄) を用いて盲腸結紮穿孔 (Cecal ligation and puncture: CLP) による敗血症誘発モデルを作成した。具体的には、三種混合麻酔薬による全身麻酔下に腹部正中切開にて開腹し、盲腸盲端より1cmの部位で結紮穿孔させ、閉腹した。糞便はCLP侵襲の直前、および侵襲後1,3,7日目に採取した。

次世代シーケンサーを用いた解析  
上記で得られた糞便試料について、16S rRNAシーケンサーを用いて網羅的な解析を行った。測定は既存のIon PGM (Life Technologies) を使用し、QIIMEパイプラインにて解析した。また、糞便試料の総菌数について、DAPI染色を加えた後に顕微鏡下に菌数を測定した。

定量的PCRによる解析  
侵襲時の腸内細菌の変動を評価するために、*Enterobacteriaceae*科の菌種について定量系を構築した。384穴プレートに1ウェルあたりGoTaq® qPCR Master Mix 5.0 ml, 100 mMプライマー (ForwardおよびReverse) 0.1 ml および鋳型DNA 5.0 ml を分注し、ABI PRISM7900HT (Applied Biosystems) を用いて定量的PCRを行った。PCR条件は、95℃, 20秒、55℃, 20秒、72℃, 50秒を1サイクルとして40サイクル繰り返し、標準DNAとして1ウェルあたり、10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> コピーの標準プラスミドDNAをそれぞれ供試した。標準DNAには独立に調製した3系列のプラスミドDNAを用い、得られたC<sub>T</sub>値をもとに検量線

を作成した。

### (2) 腸管上皮を介した免疫応答の評価

侵襲時における腸管粘膜の免疫応答を評価する目的で、糞便中 IgA の測定を行った。糞便試料を遠心分離して IgA を抽出し、ELISA 法 (BETHYL 社) にて測定した。次に、*Eschericia.coli* (*Enterobacteriaceae*)、*Bifidobacterium longum* および *Lactobacillus.johnsoni* の 3 菌種について IgA との結合率を評価した。具体的には、*E.coli*、*Bifidobacterium longum*、*Lactobacillus.johnsoni* をそれぞれ LB 培地、GAM 培地で培養して OD600=1.0 の CFU 値を決定し、ELISA 法で吸光度を測定して評価を行った。

### (3) 糞便の代謝産物 (メタボローム) 解析

侵襲時のマウス糞便の代謝産物の変動を捉えるために、網羅的なメタボローム解析を行った。CE-TOFMS (キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計、Human metabolome technologies: HMT 社) 法を用い、アミノ酸、有機酸、核酸、糖リン酸を含む 110 物質について解析を行った。主成分分析及びクラスタリング解析、ヒートマップは HMT 社開発の統計解析ソフトにより表記した。

### (4) 外的な水素投与による治療効果と腸内フローラ動態の変化についての検討

CLP 群に水素溶存水を投与し、生存率及び腸内環境の変化について検討した。約 7ppm の高濃度水素溶存水 (Miz 社) を作成し、経胃ゾンデを用いて侵襲後より連日、1 回あたり 300  $\mu$ l を投与した。Control 群として、同量の生理食塩水を同様のタイミングで投与した。さらに、腸内フローラの変動について上記の 1) と同様に次世代シーケンサーを用いて解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 次世代シーケンサー法による解析

CLP 侵襲時におけるマウス糞便中の腸内細菌叢の割合の変化について、腸内細菌叢を構成する代表的な 4 門の経日的変化と科レベルでの変化を図 1、2 に示す。侵襲前 (健康状態) には *Bacteroidetes*、*Firmicutes* が大部分を構成していた細菌叢は、侵襲後 day1 にはそれらが減少し、*Proteobacteria* が著増して半数以上を占めていた。科レベルでは、*Enterobacteriaceae* が day1 に著増して約半数の割合を占めていた。

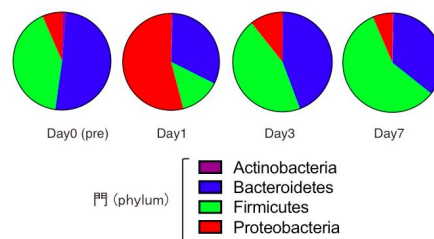


図 1. 腸内細菌叢の動態変化 (Phylum level)

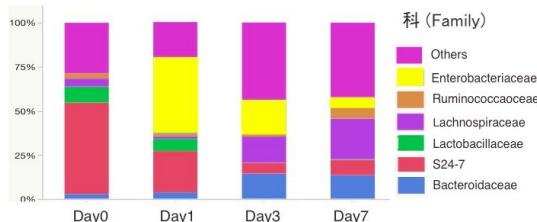


図 2. 腸内細菌叢の動態変化 (Family level)

### (2) 定量的 PCR による解析

CLP 群と sham 群の変動を図 3 に示す。*Enterobacteriaceae* は CLP 群で有意に増加を認め、day1 では day0 の約  $10^4 \sim 10^5$  倍に増加していた。

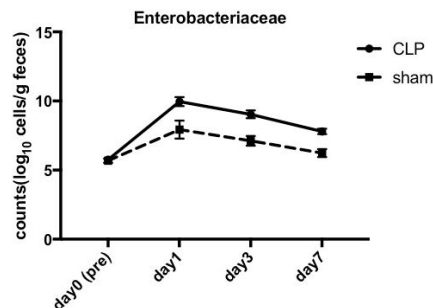


図 3. Enterobacteriaceae の変動

(3) 腸管上皮を介した免疫応答の評価

糞便中の IgA 動態の変化を図 4 に示す。IgA は day1 において有意に増加し、day7 は再び減少傾向であった。また、健常時 (Day0) においても少なからず IgA が産生されていることが確認された。

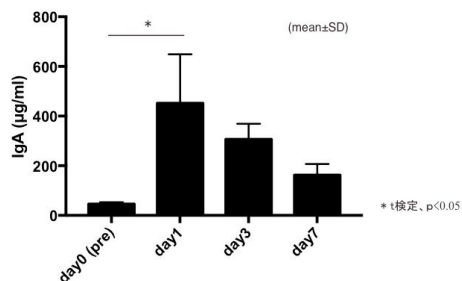


図 4. 糞便中の分泌型 IgA の変動

次に、IgA と以下の 3 菌株との結合性を図 5 に示す。IgA は、E.coli と高い結合性を持つ一方で、L.johnsoni や B.longum には結合性がほとんど認められなかった。

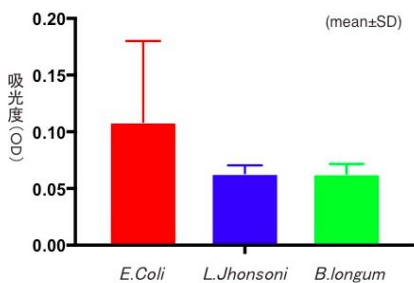


図 5. 菌株の相違による IgA 結合性の比較

(4) 糞便の代謝産物 (メタボローム) 解析

糞便試料のメタボローム解析による主成分分析を図 6 に示す。これらの結果より、経日的なメタボロームに明らかな差があることが示された。

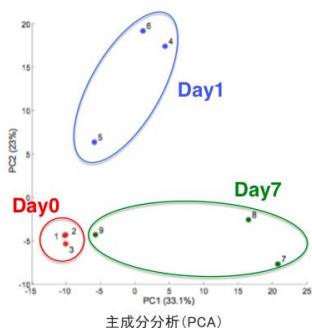


図 6. 糞便代謝産物の経日的変動

(5) 外的な水素投与による治療効果と腸内フローラ動態の変化についての検討

水素投与群と control 群における生存曲線を図 6 に示す。水素投与群では、control 群と比較して 1 週間生存率に有意な改善効果を確認した。また、水素投与群では day1 における Enterobacteriaceae の増加が control 群と比較して抑制されていた (図 7)。

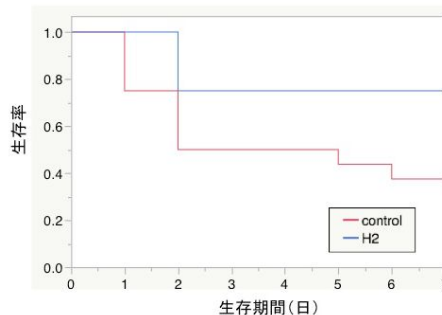


図 6. 水素投与群および control 群における 1 週間生存率

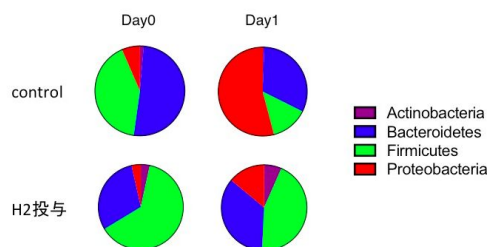


図 7. 水素投与群および control 群における腸内細菌叢の変化

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)

[学会発表](計 2 件)

Mitsunori Ikeda, Kentaro Shimizu, Hiroshi Ogura, Takeshi Shimazu, Takashi Kurakawa, Eiji Umemoto, Daisuke Motooka, Shota Nakamura: Dynamic alterations of gut-microbiota, metabolites and IgA secretion in a murine model of sepsis. Society of Critical Care Medicine's 46<sup>th</sup> Critical Care Congress, Honolulu, Hawaii, January, 2017

池田光憲、清水健太郎、倉川尚、梅本英司、元岡大祐、中村昇太、小倉裕司、嶋津岳士：侵襲病態における腸内フローラに関する研

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 光憲 (MITSUNORI IKEDA)  
大阪大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：60548444

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )

研究者番号：