

令和 元年 6 月 18 日現在

機関番号：16101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0345

研究課題名（和文）腸内細菌叢プロファイル変化に対応した食物由来成分による心血管内皮傷害予防法の開発（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Interaction between gut microbiota and food-derived compounds for prevention and control of cardiovascular endothelial dysfunction(Fostering Joint International Research)

研究代表者

馬渡 一論 (MAWATARI, Kazuaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・講師

研究者番号：40352372

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円

渡航期間： 11ヶ月

研究成果の概要（和文）：心血管機能の恒常性維持には血管内皮細胞が重要な役割を果たしている。本研究では動脈硬化初期病変モデルの腸内細菌叢の変化を観察すること、さらに、血管内皮傷害を予防する食物由来成分の検索し、それらの腸内細菌叢の変化による影響を評価することを目的とした。本研究では数種の食物由来ポリフェノールが血管内皮に作用し、内皮依存的弛緩反応がみられたことから、これらの化合物が血管内皮傷害予防に働く可能性が示唆された。なかでも、柑橘類から分離・同定した化合物の生理活性を共同研究先で評価した。培養細胞及び動物モデルを用いて評価すると、これら化合物が概日リズムを調整することで血管内皮機能の改善に働く可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界に類をみないスピードで高齢化する我が国では動脈硬化性疾患（心筋梗塞をなどの虚血性心疾患と脳梗塞・脳出血などの脳血管障害）による死亡が悪性新生物と並んで大きな位置を占め、ますますその頻度の増加が予想される。本研究では、食物由来の低分子化合物を用いた栄養学的介入による予防法の検討した。これまでに報告のない新たな成分（化合物）が効果的であること示唆されたことから、食を介した安全な予防法の1つとなる可能性が考えられた。また、候補となる化合物のいくつかは、概日リズムを調節することが示唆されたため、食を介した概日リズムの介した概日リズムが新たな動脈硬化性疾患予防のカギとなることが期待された。

研究成果の概要（英文）：Vascular endothelial cells have important roles in homeostasis of cardiovascular system. Aims of this study were to observe gut microbiota in early-stage atherosclerosis animal model, to search food-derived compounds those induce endothelium-dependent-vasodilation, and to investigate effects of these compounds on gut microbiota. Intima-thickened aorta and decrease of endothelium-dependent vasodilation were observed in high fat diet (HFD)-fed C57BL/6 mice. By phylum-specific quantitative polymerase chain reaction (qPCR) for monitoring gut microbiota, HFD-fed mice had higher Firmicutes bacteria than normal diet-fed mice, but did not change Bacteroidetes bacteria. And we found that some food-derived polyphenols had activity of endothelium-dependent vasodilation, but couldn't check any effect of those on gut microbiota until end of this project. We are investigating whether the effects depend on interaction between gut microbiota and food-derived compounds.

研究分野：栄養学

キーワード：腸内微生物細菌叢 低分子化合物

1. 研究開始当初の背景

世界に類をみないスピードで高齢化する我が国では動脈硬化性疾患（心筋梗塞などの虚血性心疾患と脳梗塞・脳出血などの脳血管障害）による死亡が悪性新生物と並んで大きな位置を占め（総死因の約30%）、ますますその頻度の増加が予想される（平成25年国民動態統計より）。また、動脈硬化性疾患の高リスク者（メタボリックシンドローム該当者・予備軍や糖尿病合併症患者など）数は改善していないことは大きな課題である（健康日本21最終評価より）。今後、有効な予防と治療対策の確立は喫緊の課題である。人々のQOL（生活の質）や健康寿命の維持・増進するためには、健常者および動脈硬化発症のリスク者に対する一次予防（発症予防及び発症リスクの低減）が重要な対応策となる。血管機能の恒常性維持には血管内皮細胞が重要な役割を果たしている。アテローム性（粥状）動脈硬化の初期病変はこの血管内皮細胞の傷害や機能破綻が主な要因となる。そこで本研究では安全かつ安心である食物または食物由来の成分による血管内皮細胞を標的とした予防法に着目した。近年、動脈硬化のリスク因子である慢性代謝性疾患（耐糖能異常や内臓脂肪型肥満など）の患者では、腸内細菌叢プロファイルが変化していることが報告された（Venessa K. *et al*, *Science* 2014）。また、高脂肪食（特に動物性脂肪）の過剰摂取も腸管細菌叢プロファイルへ変化させる要因である（David LA. *et al*, *Nature* 2014）ことも示唆されている。そこで、栄養学的介入による血管内皮傷害予防や動脈硬化性疾患の予防をより向上させるには、対象者（高リスク者や疾患モデルなど）における腸内細菌叢プロファイル変化への対応が重要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、（1）食餌誘導性の動脈硬化初期病変モデル動物の作成し、腸内細菌叢の変化を評価すること、（2）血管内皮に作用し血管内皮傷害を予防する食物由来の候補化合物を検索すること、さらに、（3）これらの食物由来成分が腸内細菌叢の変化による影響を受けるかを評価すること、（4）これらの食物由来の低分子化合物の生理活性を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

（1）齧歯類動物モデルへの高脂肪食投与による食餌誘導性の動脈硬化初期病変モデル動物の作成し、腸内細菌叢の変化を観察した。動脈硬化病変の評価は組織染色による形態学的変化の観察とイーザーマグヌスを用いた機能的変化（内皮依存的弛緩反応）で評価した。腸内細菌叢の変化は菌種（門）特異的な定量的 Polymerase chain reaction（qPCR）と変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE）法により細菌叢の変動を評価した。

（2）血管内皮に作用し、弛緩反応を誘発する、または、内皮の肥厚を予防する食物由来成分を検索した。主にイーザーマグヌスを用いた内皮依存的弛緩反応で評価を行った。

（3）（2）で検索した化合物の腸内細菌叢による影響を評価した。血中における化合物の検出を液体クロマトグラフィー（LC: Liquid Chromatography）- 飛行時間型質量分析装置（TOFMS: Time of Flight Mass Spectrometry）で測定した。

（4）これらの低分子化合物の生理活性を培養細胞モデル及び動物モデルを用いて評価した。

4. 研究成果

（1）高脂肪食投与による食餌誘導性の動脈硬化初期病変モデルの作成を行った。高脂肪食を齧歯類動物モデルに投与し、血管内皮の機能や形態学的変化を観察した。イーザーマグヌスを用いて血管内皮機能を評価すると、有意に内皮依存性弛緩反応が減弱していた。また、血管病理切片を作成しヘマトキシレン・エオシン（HE）染色を行うと、血管内膜の肥厚がみられた（図1）。次に高脂肪食投与を行った C57/BL6 マウスの糞便中の DNA を精製し、特異的オリゴ DNA プライマーを用いた定量的 PCR により *Firmicutes* 門と *Bacteroidetes* 門の細菌数を評価した。通常食投与群と比較すると高脂肪食投与群では *Bacteroidetes* 門には差がなかったが、*Firmicutes* 門細菌が有意に高かった。高脂肪食投与による動脈硬化初期病変モデル動物は腸内細菌叢が変化していることが分かった。さらに、高脂肪食投与と同様の細菌叢の変化は人工甘味料の1つである Xylitol や低用量の抗生物質投与でもみられることがわかった。

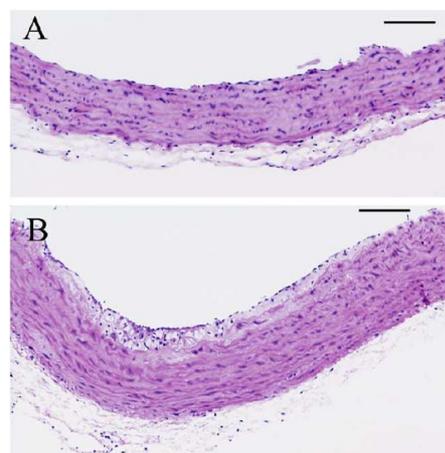


図1：大動脈の組織病変
（A: 通常食群, B: 高脂肪食群）

表 1 : 高脂肪食投与による組織重量及び血中脂質の変化 (CD: 通常食、HFD: 高脂肪食)

	Diet	
	CD (n = 5)	HFD (n = 5)
Final body weight, g	33.4 ± 0.3	38.5 ± 1.3
Visceral fat, g/kg body weight	15.2 ± 1.2	43.9 ± 4.5
Cecum weight, g/kg body weight	17.7 ± 0.9	8.9 ± 0.8
Hepatic parameters		
Liver, g/kg body weight	48.6 ± 0.7	43.5 ± 3.8
Total cholesterol, mmol/liver	7.5 ± 0.8	21.3 ± 2.8
Triglycerides, mmol/liver	8.8 ± 0.8	56.0 ± 12.3
Plasma parameters		
Total cholesterol, mmol/L	2.0 ± 0.1	3.6 ± 0.7
Triglycerides, mmol/L	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1

(2) 血管内皮に作用し弛緩反応を誘発する食物由来成分を検索した。活性がみられた食物由来成分の1つはタマネギ等に多く含まれるポリフェノール、ケルセチン (Quercetin) であった (図2)。また、食物由来の低分子化合物の候補と共同研究先の低分子化合物ライブラリと照合した結果、柑橘類由来フラボノイド中から分離・同定したある特定の低分子化合物なども候補化合物としてあがった。

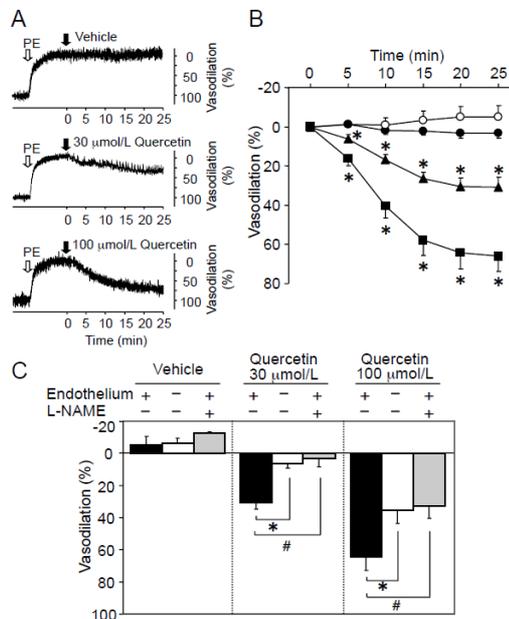


図2: イージーマグナスを用いた Quercetin による血管弛緩反応の評価。(○) Vehicle, (●) 10 μM, (▲) 30 μM, (■) 100 μM

(3) (2) で検索した化合物の腸内細菌叢による影響を評価した。血中における化合物の検出を液体クロマトグラフィー (LC: Liquid Chromatography) - 飛行時間型質量分析装置 (TOFMS: Time of Flight Mass Spectrometry) で測定した。徳島県産柑橘類由来のポリフェノール (精製物) を経口投与すると、精密質量 $m/z = 360.85$ の化合物が検出された (図3)。同様に他の食物由来成分の検出できたが、研究期間内には腸内細菌叢の変化がこれらの化合物の代謝にどのような影響を与えるかは評価できなかった。これらの成分を投与した実験動物の糞便はすでにサンプリング済みであるため、引き続き菌叢解析を進める予定である。

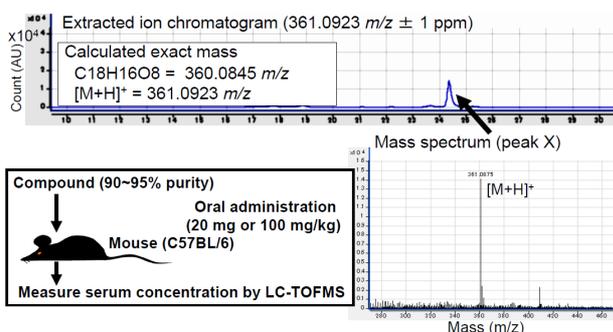


図3: LC-TOFMS による血中内食物由来成分の検出。

(4) (3) で検出された化合物 Compound X (精密質量 $m/z = 360.85$) の生理活性を評価した。共同研究先での先行研究で、構造が類似した化合物が概日リズムの調節する主要な遺伝子発現の変動の振幅を増幅させることを見出していた。そこで、培養細胞モデルを用いて、*Bmal1* の転写調節活性をリアルタイムで評価したところ、顕著に転写活性のリズムの振幅が増大した (図4)。次に、動物モデル (45% 高脂肪食投与マウス) を用いて、この化合物の生理的影響を評価したところ、通常時の血糖、中性脂肪、及び遊離脂肪酸の血中濃度が低下した (図5)。現在、この効果が腸内微生物細菌叢や概日リズムの変動と関連がないか、検討中である。

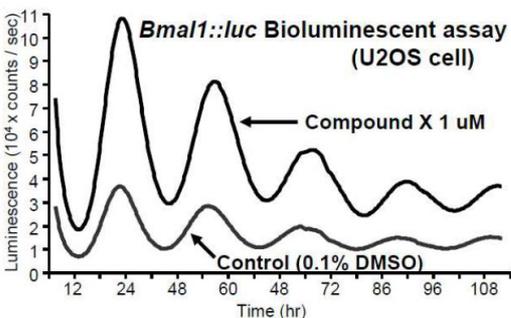


図4: 培養細胞モデル (*Bmal1::luc* U2OS cell) を用いた Compound X の生理活性の評価

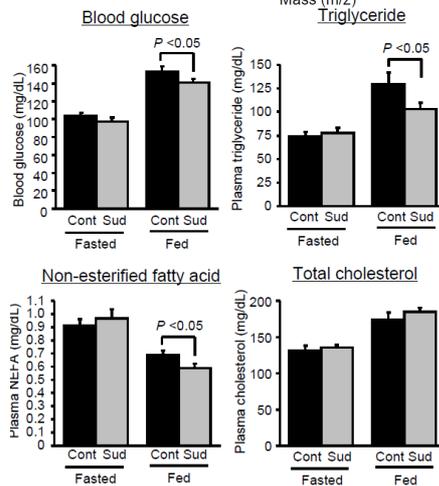


図5: Compound X (Sud) 処置による血糖及び血中脂質の変動

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Ayumi Yoshimoto, Takashi Uebanso, Mutsumi Nakahashi, Takaaki Shimohata, **Kazuaki Mawatari**, Akira Takahashi : Effect of prenatal administration of low dose antibiotics on gut microbiota and body fat composition of newborn mice., Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 査読有, Vol.62, No.2, 155-160, 2018, DOI: 10.3164/jcbn.17-53.

Takashi Uebanso, Saki Kano, Ayumi Yoshimoto, Chisato Naito, Takaaki Shimohata, **Kazuaki Mawatari**, Akira Takahashi : Effects of Consuming Xylitol on Gut Microbiota and Lipid Metabolism in Mice., Nutrients, 査読有, Vol.9, No.7, 2017, DOI: 10.3390/nu9070756.

Takashi Uebanso, Ai Ohnishi, Reiko Kitayama, Ayumi Yoshimoto, Mutsumi Nakahashi, Takaaki Shimohata, **Kazuaki Mawatari**, Akira Takahashi : Effects of Low-Dose Non-Caloric Sweetener Consumption on Gut Microbiota in Mice., Nutrients, 査読有, Vol.9, No.6, 2017, DOI: 10.3390/nu9060560.

〔学会発表〕(計 1 件)

上番増 喬, 大西 愛, 北山 礼子, 吉本 亜由美, 中橋 睦美, 下畑 隆明, **馬渡 一諭**, 高橋 章 : 許容上限量の甘味料の摂取が腸内細菌叢と宿主へ及ぼす影響の解析, 日本栄養食糧学会(沖縄県), 2017年5月.

〔図書〕(計 0 件)

〔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

<http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/yobokankyoeiyo/>

6 . 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名 : Chen Zheng

ローマ字氏名 : Chen Zheng

所属研究機関名 : The University of Texas Health Science Center at Houston

部局名 : Department of Biochemistry and Molecular Biology

職名 : Associate professor

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名 : Seung-Hee Yoo

ローマ字氏名 : Seung-Hee Yoo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。