

令和 2 年 4 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08091

研究課題名(和文) ノトバイオート技術を用いた腸内菌による胆汁酸代謝と宿主病態に及ぼす影響の研究

研究課題名(英文) Bile acid metabolism by intestinal microbiota

研究代表者

成島 聖子 (Narushima, Seiko)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：80578336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：胆汁酸の観点から病態を制御する常在細菌の特定を目的とし、偏性嫌気性菌の培養技術およびノトバイオート技術を駆使し、菌による胆汁酸変換について解析を行った。ヒト便を投与したex-GFマウス腸管より分離した菌の胆汁酸変換能を評価し、胆汁酸の脱抱合、水酸基に対する脱水素反応及び逆反応、脱水素反応、異性体化を示す菌を同定した。異なる胆汁酸変換能を有する菌を投与してノトバイオートマウスを作成し、腸内で目的とする胆汁酸を検出することができた。更に消化管腫瘍モデルマウスを無菌化し、菌の有無によって大腸腫瘍形成に差があることを明らかにし、更に長寿者の便胆汁酸に特徴的な胆汁酸分子種も見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆汁酸は腸内に常在する菌により変換されるが、変換の経路や、変換を担う菌については不明な点が多く、また変換された胆汁酸が宿主の健康や病態に与える影響についての詳細な解析は未だ不十分である。本研究では、偏性嫌気性菌の培養技術と無菌マウスを用いて、菌による胆汁酸変換と宿主へ及ぼす影響について解析を行った。健康なヒトにおいても腸内細菌が異なることで胆汁酸の組成も大きく異なること、特定の胆汁酸の生成には特定の菌が関与していること、更に宿主の免疫系に關与する胆汁酸分子種を生成する菌が明らかになることで、腸内細菌による胆汁酸を介した免疫系の制御が可能となり、臨床の領域への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The development and the function of intestinal cells are affected by the presence of the gut microbiota. Bile acids are synthesized from cholesterol in the liver, conjugated, and secreted into the small intestine where they play an important role in nutrient absorption. Bile acids are also very important regulators of host metabolism by acting as signaling molecules in various organs via specific receptors FXR and TGR5. Total bile acid levels and the relative proportions of primary and secondary bile acids vary significantly among the feces of healthy donors, depending their own microbiota. We have identified bacterial strains capable of converting primary bile acids into particular secondary bile acids from the feces of ex-GF mice associated with human feces of particular bile acid profiles, which provide a substantial impact on the signaling function of the host. The findings would be of potential therapeutic value in controlling host metabolism.

研究分野：腸内細菌学

キーワード：腸内細菌 ノトバイオートマウス 胆汁酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸内には約千種類に及ぶ菌が存在し、宿主の生理機能や恒常性の維持に重要な役割を果たしている。世界的に腸内菌に関する大規模なゲノムプロジェクトが次々と立ち上がり、膨大なデータが蓄積されるに従い、腸炎や癌など様々な病態のみならず糖尿病や肥満などの代謝異常と腸内菌叢の質的・量的減少 (dysbiosis) が深く関与していることが明らかになってきた。臨床の分野では、dysbiosis の改善を目的とした健常人からの便移植 (Fecal Material Transplant: FMT) が試みられ、*Clostridium difficile* による偽膜性腸炎に対する著効性を始め様々な分野での効果が報告されている。しかし便そのものの移植には様々なリスクも伴うため、将来的には選抜された菌の最小組み合わせを dysbiosis の改善に用いることが期待され、そのために個々の菌と同時に菌群としての活性を解明する必要がある。

(2) 肝臓でコレステロールより生成される胆汁酸は脂質やビタミンの吸収に重要な役割を果たし、殆どは小腸下部までに再吸収されて腸肝循環を繰り返すが、一部は大腸へ到達し、腸内細菌による変換を受けて二次胆汁酸になる。ヒトの主な一次胆汁酸であるコール酸 (CA) とケノデオキシコール酸 (CDCA) の 7 位水酸基が菌による脱水酸化反応を受けてそれぞれ生成されるデオキシコール酸 (DCA)、リトコール酸 (LCA) には大腸や肝臓発癌の促進作用が示唆されている。一方で、同じ分子である DCA が、dysbiosis により誘発される *C. difficile* 腸炎に対する感染防御因子であることも報告されている。更に、胆汁酸の各分子種が宿主の核内受容体 Farnesoid X receptor (FXR) や膜受容体 G protein-coupled bile acid receptor (Gpbar1) に対するリガンドとして働くことも明らかとなり、胆汁酸の様々な側面が再認識されている。しかしながら、菌による胆汁酸の変換の詳細、例えば変換に関わる酵素や変換の具体的な経路については未だにほとんど解明されておらず、また生体内で菌が変換能を発揮するためには他の菌との協調関係が必要であるが、そのような菌群の同定には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、偏性嫌気性菌の培養技術とノトバイオームマウスを使用して、生体内における胆汁酸変換に関与する菌(群)を特定し、腸内細菌による胆汁酸代謝を介した宿主の病態に及ぼす影響を解明することを目的として、解析を試みた。具体的には、ヒト腸管由来の菌の分離と *in vitro* における胆汁酸代謝能の検討、無菌マウスに様々なヒト便サンプルを投与し、作出した ex-Germfree (ex-GF) マウスの腸内胆汁酸組成ならびに腸内菌叢の解析、ex-GF マウスからの腸内細菌の分離と *in vitro* における胆汁酸代謝能の検討、更には推定された胆汁酸変換に関わる菌(群)の投与によるノトバイオームマウスの作出を行い、宿主の恒常性の維持に必要な胆汁酸バランスを提供する菌構成を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 健常人の便中胆汁酸組成の解析:

健常人ボランティアより新鮮便を採取し、一部を菌培養のためグリセロール添加 PBS に懸濁、残りを冷凍保存した。便サンプルを凍結乾燥後、胆汁酸を抽出・精製し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) および液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LCMS/MS) にて胆汁酸を解析した。また、便中の細菌 DNA を抽出し、メタ 16SrRNA 解析により便中の菌叢構成を検討した。

(2) 腸内胆汁酸組成の異なる ex-Germfree マウスの作出:

胆汁酸組成の異なる複数のヒト糞便をそれぞれ無菌マウスに投与し、ex-GF マウスを作出した。これらのマウスの腸内胆汁酸組成を解析するとともに、糞便より細菌 DNA を抽出し、メタ 16SrDNA 解析により腸内菌叢の情報を得た。□

(3) ヒト腸管由来の菌の分離と、*in vitro* における胆汁酸代謝能の検討:

ex-GF マウスの中から特徴的な胆汁酸組成を有するマウスを選出し、嫌気チャンバーを用いてこのマウスの糞便から非常に高い嫌気度を要求する Extremely Oxygen Sensitive (EOS) 細菌を含む菌を分離培養した。分離した菌を 16SrRNA 配列により同定すると共に、培地に胆汁酸を基質として添加・培養し、胆汁酸の変換能を薄層クロマトグラフィー (TLC)、GCMS および、LCMS/MS により質的・量的に解析することで、菌の胆汁酸変換能を評価した。

(4) 異なる胆汁酸組成ノトバイオームマウスの作出とマウス病態モデルにおける胆汁酸変換菌の影響の解析:

二次胆汁酸生成能に着目して選出した腸内菌(群)を無菌マウスに投与し、作出したノトバイオームマウスについて、菌(群)の定着を確認するとともに、マウス盲腸内容物、糞便の胆汁酸組成を解析し、投与した菌の *in vitro* での胆汁酸変換能がノトバイオームマウス腸内でも維持されているかどうか検討した。さらに、大腸炎、消化管腫瘍モデルマウスを無菌化することで病態に腸内細菌の関与を確認し、これらマウスに様々な菌の組み合わせを投与してノトバイオームマウスの作出を試みた。

4. 研究成果

(1) 健常ヒト便の胆汁酸組成について解析した結果、菌による変換が見られず一次胆汁酸がほとんどを占める便、二次胆汁酸の中でも 7 位 OH 基の脱水酸化により生成された DCA、LCA の割合が多い便、さらには二次胆汁酸でも 7 位の OH 基の異性化により生成されるウルソコー

ル酸 (UCA) や胆石溶解剤として臨床で使用されているウルデオキシコール酸 (UDCA) のみが検出される便など、様々な特徴を持った便が検出され、腸内細菌によって生成される二次胆汁酸の組成が個人によって大きく異なることが明らかとなった。

(2) 次に特徴的な胆汁組成を示すヒト便サンプルを無菌マウスに投与し、投与された ex-GF マウスの腸内胆汁酸組成ならびに腸内菌叢を解析した。その結果、元のヒト便胆汁酸組成の特徴はある程度投与した ex-GF マウスの腸内容物中胆汁酸組成に反映されていた。ただしこれまでの報告に一致して、マウスにおいては肝臓内で CDCA がマウス特有の胆汁酸であるムリコール酸に変換されるため、CDCA および CDCA からの変換で生成される LCA、UDCA の割合は非常に少なくなった。またヒト便を投与されたマウスの腸内では、ムリコール酸に対する変換作用は見られなかった。

(3) 特徴的な腸内胆汁酸組成を示した ex-GF マウスの盲腸内容物および糞便より、嫌気チャンバーを用いて EOS 細菌を含む菌を分離した。分離された菌株について *in vitro* において抱合型あるいは遊離型の様々な胆汁酸を基質として培地に添加し、嫌気チャンバー内で培養後、培養液中の胆汁酸を解析することで胆汁酸の変換能の評価を行った。その結果、抱合型胆汁酸の脱抱合、一次胆汁酸の水酸基に対する脱水素反応及び逆反応、脱水酸反応を示す菌を分離することができた。また、中間体として 7 位のオキシ胆汁酸を介した 2 種の菌を組み合わせることにより、CDCA から、7 位水酸基のエピマーである UDCA への変換も可能であった。更に、特定の菌は 3 位の水酸基について α 位から β 位への変換も示した。このうち脱水酸反応を示す菌については、これまでに *Clostridium* cluster IV、XI、XIVa に属する菌が報告されているが、*Clostridium* cluster XI に属する菌種と近縁ではあるが異なる可能性が示唆された。

(4) 上記胆汁酸変換菌の様々な組み合わせを抱合型一次胆汁酸のみを有する無菌マウスに投与し、作出したノトバイオマウスのそれぞれの腸内容物から、予想された遊離型一次胆汁酸、DCA、UDCA を検出することができた。また、消化管腫瘍モデルである APCmin マウスを無菌化し、菌の有無によって大腸の腫瘍の数に差があることを明らかにした。更に百歳以上の長寿者の便胆汁酸には特徴的な胆汁酸分子種が極めて多いこともあきらかとなった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Ladinsky MS, Araujo LP, Zhang X, Veltri J, Galan-Diez M, Soualhi S, Lee C, Irie K, Pinker EY, Narushima S, Bandyopadhyay S, Nagayama M, Elhenawy W, Coombes BK, Ferraris RP, Honda K, Iliev ID, Gao N, Bjorkman PJ, Ivanov II. Endocytosis of commensal antigens by intestinal epithelial cells regulates mucosal T cell homeostasis. *Science*. 査読有. 2019 Mar 8;363(6431). pii: eaat4042.

doi: 10.1126/science.aat4042.

Tanoue T, Morita S, Plichta DR, Skelly AN, Suda W, Sugiura Y, Narushima S, Vlamakis H, Motoo I, Sugita K, Shiota A, Takeshita K, Yasuma-Mitobe K, Riethmacher D, Kaisho T, Norman zJM, Mucida D, Suematsu M, Yaguchi T, Bucci V, Inoue T, Kawakami Y, Olle B, Roberts B, Hattori M, Xavier RJ, Atarashi K, Honda K. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature*. 査読有. 2019. 565:600-605.

doi: 10.1038/s41586-019-0878-z. Epub 2019 Jan 23.

Nakamoto N, Sasaki N, Aoki R, Miyamoto K, Suda W, Teratani T, Suzuki T, Koda Y, Chu PS, Taniki N, Yamaguchi A, Kanamori M, Kamada N, Hattori M, Ashida H, Sakamoto M, Atarashi K, Narushima S, Yoshimura A, Honda K, Sato T, Kanai T. Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis. *Nat Microbiol*. 査読有. 2019. 4:492-503.

doi: 10.1038/s41564-018-0333-1. Epub 2019 Jan 14.

Atarashi K, Suda W, Luo C, Kawaguchi T, Motoo I, Narushima S, Kiguchi Y, Yasuma K, Watanabe E, Tanoue T, Thaiss CA, Sato M, Toyooka K, Said HS, Yamagami H, Rice SA, Gevers D, Johnson RC, Segre JA, Chen K, Kolls JK, Elinav E, Morita H, Xavier RJ,

Hattori M, Honda K. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. Science. 査読有. 2017. 358:359-365.

doi: 10.1126/science.aan4526.

Chai JN, Peng Y, Rengarajan S, Solomon BD, Ai TL, Shen Z, Perry JSA, Knoop KA, Tanoue T, Narushima S, Honda K, Elson CO, Newberry RD, Stappenbeck TS, Kau AL, Peterson DA, Fox JG, Hsieh CS. *Helicobacter* species are potent drivers of colonic T cell responses in homeostasis and inflammation. Sci Immunol. 査読有. 2017. 2. pii: eaal5068.

doi: 10.1126/sciimmunol.aal5068

〔学会発表〕(計2件)

第39回日本分子生物学会 2016、腸内細菌を指標とした大腸がんスクリーニング方法の開発：新井友里、吉本真、小西雄介、柿沼秀明、大熊敦史、奥村慎太郎、成島聖子、元岡 祐、按田瑞恵、中村昇太、本田賢也、大谷直子、長山聡、原英二
フォーラム2016、衛生薬学・環境トキシコロジー 2016、口腔内細菌による腸管免疫活性化機構の解明 新幸二、成島聖子、河口貴昭、安間恵子、本田賢也

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：新 幸二

ローマ字氏名：(Atarashi, koji)

研究協力者氏名：小倉 嘉夫

ローマ字氏名：(Ogura, yoshio)

研究協力者氏名：須田 亙

ローマ字氏名：(Suda, wataru)

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。