

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15422

研究課題名(和文)腸内細菌叢代謝産物から腸管幹細胞増殖刺激因子同定を目指す探索研究

研究課題名(英文) Screening for gut microbiota-derived metabolites that stimulate intestinal stem cells

研究代表者

藤城 光弘 (Fujishiro, Mitsuhiro)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70396745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：Wntシグナルを制御するR-spondin-LGR4/5/6-ZNRF3/RNF43系に対するアッセイ系を用いて腸管幹細胞刺激因子を健常者腸内細菌叢由来代謝産物より探索する。出発試料である健常者由来大腸内視鏡排液の収集準備をすすめると同時に、本学所有の低分子化合物ライブラリーを探索し、R-spondin作用増強化合物を2つ同定した。これは本アッセイ系が探索研究に耐えうる優れた系であることを実証する。また他施設との共同研究において、常在性腸内細菌叢由来のメタボライトを54種類同定した。今後は内視鏡排液より抽出された低分子画分のみならずこれらメタボライトの生理活性の検定を継続する。

研究成果の概要(英文)：This study is being conducted to identify gut microbiota-derived metabolites that stimulate intestinal stem cells. Utilizing a novel assay system targeting R-spondin-LGR4/5/6-ZNRF3/RNF43 axis, we first screened a small-molecule compound library and identified 2 unique compounds that enhance R-spondin activities. This proof-of-concept experiment suggests that this newly established assay is well suited for biochemical purification of bioactive metabolites from crude microbiota-derived extracts. We also conducted comprehensive metabolomic analysis and identified 54 metabolites from fecal extracts of germ-free mice that had received fecal microbiota transplantation (FMT). The biological activities of these metabolites are currently being examined.

研究分野：消化器内科学、消化器内視鏡学

キーワード：Wntシグナル 腸管幹細胞 常在性腸内細菌叢 生理活性代謝産物

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管内には 1000 種類以上の多種多様な細菌が棲息し、複雑な微生物生態系を形成している。近年の研究により、腸内細菌は宿主の生理機能に極めて大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。例えば、無菌マウスは通常の腸内細菌叢を持つマウスに比べて肥満に対する抵抗性があり、肥満マウスの腸内細菌叢を正常マウスに移植すると体脂肪の蓄積が亢進することが知られている。また慢性炎症は大腸癌発生に関わる危険因子の一つであると考えられているが、その作用機序として慢性炎症による腸内細菌叢の変化が重要であると最近報告された。

これらの研究結果は、Fecal microbiota transplantation (FMT: 腸内細菌叢移植) などの方法による腸内細菌叢の制御が、様々な疾患の治療・予防につながる可能性を示唆しており、実際に海外では Clostridium difficile による再発性の偽膜性腸炎に対して FMT が施行され、81% の患者で改善が認められたという驚くべき報告がなされた。しかしながら、この治療の基盤となる分子メカニズムに関しては未だに不明な点が多い。

2. 研究の目的

健常者の腸内細菌叢移植が、炎症性腸疾患や Clostridium difficile による再発性偽膜性腸炎に著効したという報告に基づき、申請者らは“健常者腸内細菌叢が産生する代謝産物中に、腸管上皮にある成体幹細胞の増殖を刺激する生理活性物質が存在する”との作業仮説を立てた。そこで本申請研究では、健常者由来大腸内視鏡排液から抽出した腸内細菌叢由来の代謝産物を、申請者らが新規に樹立したアッセイ系を用いて網羅的かつ系統的にスクリーニングすることで、腸管上皮幹細胞増殖刺激物質の同定を目指す。

3. 研究の方法

LGR4/5/6 と ZNRF3/RNF43 (Wnt 受容体を基質とする細胞膜型 E3 ligase) は細胞膜上で複合体を形成し、その複合体が Wnt シグナル増強作用を有する分泌蛋白質 R-spondin の受容体として機能する。LGR5 が腸管幹細胞マーカーであることから、R-spondin-LGR4/5/6-ZNRF3/RNF43 系は腸管幹細胞において重要な働きをしていると推察される。申請者らは、この R-spondin-LGR4/5/6-ZNRF3/RNF43 系を直接的に制御する物質のスクリーニングを可能にする独自のアッセイ系を樹立した。この新規に樹立した R-spondin-LGR4/5/6-ZNRF3/RNF43 系に対するアッセイを用いて、健常者由来大腸内視鏡排液より抽出した腸内細菌叢代謝産物をスクリーニングする。

R-spondin-LGR4/5/6-ZNRF3/RNF43 系の直接的制御を通じて、腸管幹細胞の Wnt シグナルを増強する生理活性物質の同定

活性物質の薬物動態評価

誘導体合成・活性評価及び構造活性相関解析

in vivo における腸管上皮細胞再生効果の検討

4. 研究成果

スクリーニングの出発試料である健常者由来大腸内視鏡排液の収集準備を適宜すすめると同時に、パイロット実験として本学薬学部創薬機構所有の低分子化合物コアライブラリー(約一万種類の代表的な化合物群よりなる)をスクリーニングしたところ、R-spondin の作用を増強する興味深い化合物を 2 つ同定できた。この結果は、独自に樹立したアッセイ系が生理活性物質探索に耐えうる優れたスクリーニングシステムであることを示唆している。また併行して慶応大学薬学部長谷研究室との共同研究において、無菌マウス、SPF マウス、SPF マウスの糞便を移植された無菌マウス(糞便移植から 3 日後、6 日後、9 日後、16 日後、23 日後にサンプル採取)の盲腸内容物をメタボロミクス解析したところ、常在性腸内細菌叢依存的なメタボライトを 54 種類同定することにも成功した。今後は健常者由来大腸内視鏡排液から抽出した低分子画分のみならずこれら同定されたメタボライトの生理活性も本アッセイ系を用いて検定していく予定である。

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 29 件)

1. Fujishiro M, Iguchi M, Kakushima N, Kato M, Sakata Y, Hoteya S, Kataoka M, Shimaoka S, Yahagi N, Fujimoto K. Guidelines for endoscopic management of non-variceal upper gastrointestinal bleeding. Dig Endosc. 査読有、28、2016、363-378、doi: 10.1111/den.12639.
2. Fujishiro M, Ikeda Y. Re-bleeding After Endoscopic Hemostasis for Peptic Ulcer Bleeding: Is eNough SAID or Are Other Factors Important? Dig Dis Sci. 査読有、61、2016、1424-1425、doi: 10.1007/s10620-016-4098-1.
3. Sakaguchi Y, Tsuji Y, Yamamichi N, Fujishiro M, Koike K. Successful closure of a large perforation during colorectal endoscopic submucosal dissection by application of polyglycolic acid sheets and fibrin glue. Gastrointest Endosc. 査読有、84、2016、374-375、doi: 10.1016/j.gie.2016.03.787.

4. Matsusaka K, Ishikawa S, Nakayama A, Ushiku T, Nishimoto A, Urabe M, Kaneko N, Kunita A, Kaneda A, Aburatani H, Fujishiro M, Seto Y, Fukayama M. Tumor Content Chart-Assisted HER2/CEP17 Digital PCR Analysis of Gastric Cancer Biopsy Specimens. *PLoS One*. 査読有、11,2016,e0154430, doi: 10.1371/journal.pone.0154430.
5. Sakaguchi Y, Tsuji Y, Fujishiro M, Kataoka Y, Takeuchi C, Yakabi S, Saito I, Shichijo S, Minatsuki C, Asada-Hirayama I, Yamaguchi D, Niimi K, Ono S, Kodashima S, Yamamichi N, Koike K. Triamcinolone Injection and Shielding with Polyglycolic Acid Sheets and Fibrin Glue for Postoperative Stricture Prevention after Esophageal Endoscopic Resection: A Pilot Study. *Am J Gastroenterol*. 査読有、111,2016,581-583, doi: 10.1038/ajg.2016.60.
6. Onoyama H, Kamiya M, Kuriki Y, Komatsu T, Abe H, Tsuji Y, Yagi K, Yamagata Y, Aikou S, Nishida M, Mori K, Yamashita H, Fujishiro M, Nomura S, Shimizu N, Fukayama M, Koike K, Urano Y, Seto Y. Rapid and sensitive detection of early esophageal squamous cell carcinoma with fluorescence probe targeting dipeptidylpeptidase IV. *Sci Rep.*, 査読有、6,2016,26399, doi: 10.1038/srep26399.
7. Niimi K, Goto O, Kawakubo K, Nakai Y, Minatsuki C, Asada-Hirayama I, Mochizuki S, Ono S, Kodashima S, Yamamichi N, Isayama H, Fujishiro M, Koike K. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration skill acquisition of gastrointestinal submucosal tumor by trainee endoscopists: A pilot study. *Endosc Ultrasound*. 査読有、5,2016,157-164, doi: 10.4103/2303-9027.183970.
8. Kataoka Y, Tsuji Y, Sakaguchi Y, Minatsuki C, Asada-Hirayama I, Niimi K, Ono S, Kodashima S, Yamamichi N, Fujishiro M, Koike K. Bleeding after endoscopic submucosal dissection: Risk factors and preventive methods. *World J Gastroenterol*. 査読有、6,2016,26399, doi: 10.3748/wjg.v22.i26.5927.
9. Fujishiro M, Yasuda I. Congress report: Exchange of opinions in Tokyo, 2016 between Japan Gastroenterological Endoscopy Society (JGES) and counterparts from abroad. *Dig Endosc*. 査読有、28,2016,642-644, doi: 10.1111/den.12703.
10. Ono S, Saito I, Ikeda Y, Fujishiro M, Komuro I, Koike K. Current Practices in the Management of Antithrombotic Therapy During the Periendoscopic Period for Patients With Cardiovascular Disease. *Int Heart J*. 査読有、57,2016,530-534, doi: 10.1536/ihj.16-057.
11. Fujishiro M, Yoshida S, Matsuda R, Narita A, Yamashita H, Seto Y. Updated evidence on endoscopic resection of early gastric cancer from Japan. *Gastric Cancer*. 査読有、20,2016,39-44, doi: 10.1007/s10120-016-0647-8.
12. Izumi M, Ikeda Y, Yamashita H, Asaoka Y, Fujishiro M, Shin M, Abo Y. Safety and Effectiveness of Endovenous Laser Ablation Combined With Ligation for Severe Saphenous Varicose Veins in Japanese Patients. *Int Heart J*. 査読有、57,2016,87-90, doi: 10.1536/ihj.15-282.
13. Zempo H, Suzuki J, Watanabe R, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M. Cacao polyphenols ameliorate autoimmune myocarditis in mice. *Hypertens Res*. 査読有、39,2016,203-209, doi: 10.1038/hr.2015.136.
14. Shiheido Y, Maejima Y, Suzuki JI, Aoyama N, Kaneko M, Watanabe R, Sakamaki Y, Wakayama K, Ikeda Y, Akazawa H, Ichinose S, Komuro I, Izumi Y, Isobe M. *Porphyromonas gingivalis*, a periodontal pathogen, enhances myocardial vulnerability, thereby promoting post-infarct cardiac rupture. *J Mol Cell Cardiol*. 査読有、99,2016,123-137, doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.03.017.
15. Suzuki J, Imai Y, Aoki M, Fujita D, Takeda N, Aoyama N, Wakayama K, Ikeda Y, Kumagai H, Akazawa H, Izumi Y, Isobe M, Komuro I, Hirata Y. Periodontitis May Deteriorate Sinus of Valsalva Dilatation in Marfan Syndrome Patients. *Int Heart J*. 査読有、57,2016,456-460, doi: 10.1536/ihj.15-395.

16. Suzuki J, Shimamura M, Suda H, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Isobe M, Komuro I, Morishita R. Current therapies and investigational drugs for peripheral arterial disease. *Hypertens Res*. 査読有、40,2016,324-328、doi: 10.1038/hr.2015.134.
17. Ikeda Y, Kumagai H, Motozawa Y, Suzuki J. Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) as a Reliable Biomarker for Cardiovascular Risk Assessment. *Int Heart J*. 査読有、57,2016,1-2、doi: 10.1536/ihj.15-324.
18. Higashizono K, Aikou S, Yagi K, Mori K, Yamashita H, Nomura S, Seto Y. Early endoscopic management for early bowel obstruction after gastrectomy: a case report. *Surg Case Rep*. 査読有、2,2016,35、doi: 10.1186/s40792-016-0164-3.
19. Ichimura T, Abe H, Morikawa T, Yamashita H, Ishikawa S, Ushiku T, Seto Y, Fukayama M. Low density of CD204-positive M2-type tumor-associated macrophages in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: a clinicopathologic study with digital image analysis. *Hum Pathol*. 査読有、56,2016,74-80、doi: 10.1016/j.humpath.2016.06.002.
20. Kitani M, Yamagata Y, Tanabe A, Yagi K, Aikou S, Kiyokawa T, Nishida M, Yamashita H, Mori K, Nomura S, Seto Y. Radical esophagectomy for a 92-year-old woman with granulocyte colony-stimulating factor-producing esophageal squamous cell carcinoma: a case report. *World J Surg Oncol*. 査読有、14,2016,264
21. Kimura K, Morita H, Daimon M, Horio M, Kawata T, Nakao T, Hirokawa M, Kitao R, Watanabe D, Komori T, Nagata T, Takeda S, Komaki H, Segawa K, Nakajima T, Takenaka K, Komuro I. Utility of Cystatin C for Estimating Glomerular Filtration Rate in Patients With Muscular Dystrophy. *Int Heart J*. 査読有、57,2016,386-388、doi: 10.1536/ihj.15-461.
22. Amiya E, Morita H, Hatano M, Nitta D, Hosoya Y, Maki H, Motozawa Y, Sato N, Ishiura H, Numakura S, Shintani Y, Kinugawa K, Takeda N, Shimizu J, Tsuji S, Komuro I. Fukutin gene mutations that cause left ventricular noncompaction. *Int J Cardiol*. 査読有、222,2016,727-729、doi: 10.1016/j.ijcard.2016.08.011.
23. Kido Y, Takahashi M, Fukuma N, Kawata T, Tanaka A, Hayashi A, Shibahara J, Daimon M, Morita H, Akazawa H, Komuro I. Heart Failure Complicated by Alveolar Hemorrhage due to Vascular Collapse and Amyloid Deposits in Wild-Type Transthyretin Amyloidosis. *Cardiology*. 査読有、135,2016,216-220
24. Kimura K, Morita H, Nakamura A, Takenaka K, Daimon M. Therapeutic Strategy for Heart Failure in Becker Muscular Dystrophy. *Int Heart J*. 査読有、57,2016,527-529、doi: 10.1536/ihj.16-311.
25. Morita H, Komuro I. A Strategy for Genomic Research on Common Cardiovascular Diseases Aiming at the Realization of Precision Medicine: Personal Insights and Perspectives. *Circ Res*. 査読有、119,2016,900-903、doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309802.
26. Nakao T, Morita H. Neuromuscular Electrical Stimulation in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Int Heart J*. 査読有、57,2016,659-660,
27. Ueda K, Kasao M, Shimamura M, Haruta H, Nitta S, Kaneko M, Uemura Y, Morita H, Komuro I, Shirai T. Impact of Oral Treatment on Physical Function in Older Patients Hospitalized for Heart Failure: A Randomized Clinical Trial. *PLoS One* 査読有、11,2016、e0167933、doi: 10.1371/journal.pone.0167933.
28. Minami T, Tateishi R, Nakagomi R, Fujiwara N, Sato M, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Shiina S, Koike K. The impact of direct-acting antivirals on early tumor recurrence after radiofrequency ablation in hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 査読有、65,2016,1272-1273、doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.043.
29. Ikenoue T, Terakado Y, Nakagawa H, Hikiba Y, Fujii T, Matsubara D, Noguchi R, Zhu C, Yamamoto K, Kudo Y, Asaoka Y, Yamaguchi K, Ijichi H, Tateishi K, Fukushima N, Maeda S, Koike K, Furukawa Y. A novel mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by liver-specific Kras activation and Pten deletion. *Sci Rep*. 査読有、

6,2016,23899,
10.1038/srep23899.

doi:

〔学会発表〕(計 0件)

〔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〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤城 光弘 (FUJISHIRO, Mitsuhiro)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 70396745

(2)研究分担者

池田 祐一 (IKEDA, Yuichi)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 10744419

熊谷 英敏 (KUMAGAI, Hidetoshi)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 20281008

山下 裕玄 (YAMASHITA, Hiroharu)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 50599397

森田 啓行 (MORITA, Hiroyuki)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 60323573

浅岡 良成 (ASAOKA, Yoshinari)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 90431858