

令和元年6月12日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15268

研究課題名(和文) 緑茶による腸内細菌を介した肥満誘導性炎症抑制機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism behind the inhibition of obesity-induced inflammation by green tea mediated through intestinal bacteria

研究代表者

荻田 佑(Ogita, Tasuku)

信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・助教(特定雇用)

研究者番号：50738010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では肥満マウスにおいてFlavonifractor plautii (F. plautii)が脂肪組織炎症の軽減に寄与するメカニズムの解明を目的とした。F. plautiiはCaco2細胞への炎症性サイトカインの処理による腸管バリア機能の低下を抑制する傾向にあった。RAW264.7細胞を用いた抗炎症性評価系で、F. plautiiに抗炎症性があることを示した。OVA感作マウスにF. plautiiを投与すると腸管関連リンパ組織内においてFirmicutes門に属する菌が特異的に増加した。肥満マウスへのF. plautiiの投与により、精巣上体脂肪組織のTNF- $\alpha$ 遺伝子発現が減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、生活習慣病の起因となる、肥満にともなう脂肪組織の炎症が、食品(緑茶)摂取による腸内細菌Flavonifractor plautiiの増加で抑制されることが明らかとなった。食品の摂取による腸内細菌の変化に着目することで、食品による新たな生活習慣病の予防戦略をもたらさうと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we elucidated the mechanism underlying Flavonifractor plautii (F. plautii)-mediated reduction of adipose tissue inflammation in obese mice. F. plautii treatment tended to suppress the decrease in intestinal barrier function in Caco-2 cells mediated by the treatment of inflammatory cytokines. Moreover, F. plautii was shown to have anti-inflammatory properties using RAW264.7 cells. Oral administration of F. plautii increased the phylum Firmicutes in the gut-associated lymphoid tissue of ovalbumin-sensitized mice. It also decreased the gene expression of TNF- $\alpha$  mRNA in the epididymal adipose tissue of obese mice.

研究分野：食品機能学

キーワード：抗炎症効果 肥満モデルマウス Flavonifractor plautii

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

### 1. 研究開始当初の背景

緑茶による健康機能は食経験として古くから知られているが、腸内細菌叢研究を絡めた解析は未だ不明な点が多い。そんな中、高脂肪食が脂肪組織において炎症反応を誘導することに着目し、肥満マウスに緑茶を投与すると優れた抗炎症作用が発揮されることを発見した。さらに、腸内細菌中にカテキンの代謝に関わる *Flavonifractor plautii* (*F. plautii*) が増加することを発見した。本研究では *F. plautii* に着目し、研究に着手した。

### 2. 研究の目的

本研究では肥満マウスへの緑茶投与により腸内で増加する *F. plautii* が脂肪組織炎症の軽減に寄与するメカニズムの解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (3-1) 腸管バリア機能の評価

ヒト腸管上皮株化細胞 (Caco2) を Trans well の管腔側に播種して2週間培養し、腸管上皮様に分化させ、腸管バリア機能評価モデルを構築した。構築したモデルの基底側に腸管バリアの破綻を誘導できる炎症性サイトカイン (TNF-) を添加した後、管腔側に *F. plautii* の基準株 (ATCC29863) の菌体を添加し、48時間培養した。腸管バリアの破綻はミリセル ERS-2 抵抗値測定システムで経上皮電気抵抗を経時的に測定し、バリア機能を数値化した。

#### (3-2) 抗炎症性の評価

マウスマクロファージ由来細胞株 RAW264.7 細胞をリポポリサッカライド (LPS) で刺激するとともに、*F. plautii* を添加して培養した。培養後、TNF- 及び抗炎症性サイトカイン (IL-10) の遺伝子発現を解析した。また、*F. plautii* の RAW264.7 細胞に対する細胞増殖能を MTT アッセイで検討した。さらに、*F. plautii* 添加後の RAW264.7 細胞における DNA の断片化を電気泳動を行い確認した。

#### (3-3) 細菌取り込みに及ぼす影響の評価

*F. plautii* が腸管 M 細胞からの腸内細菌の取り込みを制御することで過剰な免疫応答を抑制しているかどうか、肥満マウスを用いては検証できなかったが、卵白アルブミン (OVA) 感作マウスを用いた試験で腸内細菌の免疫系への影響を示唆する結果を得た。具体的には、OVA と水酸化アルミニウムゲルアジュバントを腹腔内投与することで作出した OVA 感作マウスに *F. plautii* を2週間投与し、免疫応答性の変化をリアルタイム PCR 法、腸管関連リンパ組織内の細菌叢を次世代シーケンサーにより解析した。

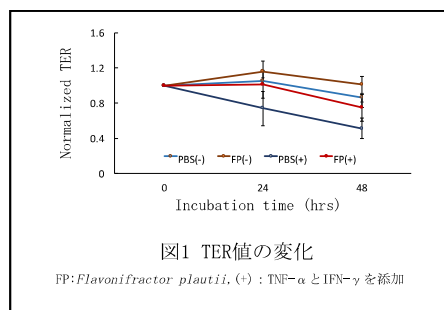
#### (3-4) 肥満マウスを用いた評価

肥満モデルマウスに対して *F. plautii* を経口投与し、強制的に *F. plautii* 占有率を高めた際の肥満誘導性炎症に与える影響について調査を行った。具体的には高脂肪飼料 (60 kcal%) を10週間給餌することで肥満マウスを作出し、10-12週目まで毎日、*F. plautii* を  $1 \times 10^8$  cfu/mouse で経口投与した。続いて、脂肪組織の TNF- 遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により解析すると共に、盲腸内細菌叢の変化を次世代シーケンサーにより解析した。

### 4. 研究成果

#### (4-1) 腸管バリア機能の評価

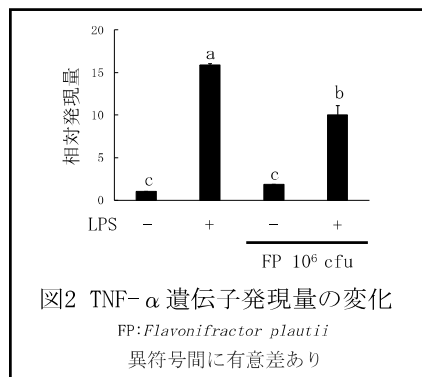
腸管上皮細胞株 Caco2 へのサイトカイン (TNF- と IFN-) の添加で経上皮電気抵抗 (TER) 値の低下が誘導されたが、*F. plautii* の添加により TER 値の低下が抑制される傾向にあった。以上の結果から、*F. plautii* は腸管バリア破綻を抑制することが示唆された (図1)。



#### (4-2) 抗炎症性の評価

TNF- 遺伝子発現は *F. plautii* を  $10^6$  cfu/well 添加した場合、*F. plautii* 無添加の場合と比較して統計学的有意に減少した (図2)。一方、IL-10 遺伝子発現は *F. plautii* 無添加と比較して *F. plautii* を  $10^8$  cfu/well 添加した場合で統計学的有意に増加した。続いて、*F. plautii* の RAW264.7 細胞に対する細胞増殖誘導能を MTT アッセイで検討したところ、*F. plautii* 無添

加の場合と比較して、*F. plautii* を  $10^8$  cfu/well 添加した場合で細胞増殖能が低下していた。さらに、*F. plautii* 添加  $10^8$  cfu/well 添加した場合、DNA の断片化が確認された。以上の結果から、RAW264.7 細胞を用いた炎症抑制能の検討試験において、*F. plautii* を  $10^6$  cfu/well 添加した場合に、細胞増殖能を抑制し、アポトーシスを誘導することなく抗炎症性が発揮させることが明らかとなった。

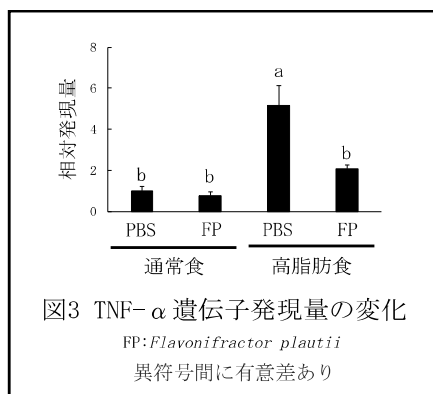


#### (4-3) 細菌取り込みに及ぼす影響の評価

OVA 感作マウスに *F. plautii* を投与すると、*F. plautii* 無投与の場合と比較して、脾細胞における IL-4 遺伝子発現や血中 OVA 特異 IgE 量が抑制された。さらに *F. plautii* の投与により、腸管関連リンパ組織内において Firmicutes 門に属する菌が特異的に増加した。以上の結果から、*F. plautii* の投与により、腸管関連リンパ組織内への細菌の取り込み能が変化することが示唆された。

#### (4-4) 肥満マウスを用いた評価

*F. plautii* ( $1 \times 10^8$  cfu/mouse) の投与により、*F. plautii* 非投与群と比較して精巣上体脂肪組織における TNF-α 遺伝子発現が統計学的有意に減少することを確認した(図3)。一方で、体重や脂肪組織重量の変化は見られなかった。また、盲腸内容物中では *Sphingobium* の占有率が減少する一方、*Lachnospiraceae* の占有率が統計学的有意に増加した。以上の結果から、*F. plautii* の投与が体重や脂肪組織重量には変化を及ぼさず、脂肪組織炎症を抑制することが示唆された。



本研究の結果から、肥満マウスにおける脂肪組織炎症が *F. plautii* の投与により抑制されることを明らかにし、そのメカニズムとして *F. plautii* が免疫細胞に直接的に作用することや *F. plautii* の盲腸内占有率が増加することに伴う盲腸内菌叢の変化が関与することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計7件)

三上 彩音、荻田 佑、深澤 知夏、下里 剛士、*Flavonifractor plautii* の経口投与による肥満脂肪組織における抗炎症作用、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019 年

荻田 佑、山本 祥也、深澤 知夏、三上 彩音、下里 剛士、*Flavonifractor plautii* の経口投与による Th2 免疫応答の抑制効果、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019 年

Fukasawa C., Ogita T., Shimosato T., *Flavonifractor plautii* exerts Th1/Th2 immunomodulatory effects in mouse、2018 Symposium of Korean Society for Lactic Acid Bacteria and Probiotics、2018 年

Mikami A., Ogita T., Shimosato T., *Flavonifractor plautii* inhibits inflammatory responses in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells and alleviates

acute-colitis in mice、2018 Symposium of Korean Society for Lactic Acid Bacteria and Probiotics、2018 年

Ogita T.、Effect of soybean resistant protein on the intestinal microflora and immune system、2018 Symposium of Korean Society for Lactic Acid Bacteria and Probiotics、2018 年

三上彩音、荻田佑、生井楓、下里剛士、*Flavonifractor plautii* によるマウスにおける急性大腸炎の軽減効果、日本食品免疫学会、2018 年

Ogita T.、Namai F.、Mikami A.、Shimosato T.、Immunoregulatory function of *Flavonifractor palutii*、ASIAN AUSTRALASIAN ANIMAL PRODUCTION CONGRESS、2018 年

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。