

令和元年5月16日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19673

研究課題名（和文）常在性腸内細菌叢由来生理活性代謝産物の探索

研究課題名（英文）exploratory research of gut microbiota-derived metabolites

研究代表者

藤城 光弘（Fujishiro, Mitsuhiro）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70396745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：消化管内には100兆個もの莫大な数の細菌が常時存在し、多彩な代謝産物を産生することから“腸内細菌叢から産生される代謝産物が宿主に発現するGタンパク質共役型受容体（GPCR）群のリガンドとして機能し、宿主生理機能に影響を及ぼす”との作業仮説のもと、糞便および内視鏡検査排液等の低分子代謝産物画分から新規低分子GPCRリガンドの同定を試みた。結果として、 β -arrestinアッセイ系より優れた新規GPCRアッセイ系の開発を行うことができ、新規アッセイ系をリガンド既知のヒトGPCRの全て（約200種類）のおよそ95%の受容体において良好なりガンド活性の検出が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

β -arrestinアッセイ系より優れた新規GPCRアッセイ系の開発は、リガンド既知のヒトGPCRの全て（約200種類）のおよそ95%の受容体において良好なりガンド活性の検出を可能とし、この新規GPCRアッセイ系を用いれば、リガンド既知のヒトGPCRの全てを単一アッセイフォーマットによりスクリーニングすることが可能となり、新規低分子GPCRリガンドの同定できる可能性が高まった。

研究成果の概要（英文）：In the gastrointestinal tract, there are 100 trillion bacteria, which produce variety of metabolites. We hypothesized that the metabolites would act as the ligands of GPCRs and influence on the physiological functions of the human host and tried to elucidate the novel GPCR ligands from the section of low molecular weight metabolites in the fecus and endoscopy-derived extracts. According to the research, we innovated better novel GPCR assay system than β -arrestin assay, which could detect about 95% of ligand activity in almost all known human GPCRs (about 200).

研究分野：消化器内科学、下部消化管

キーワード：常在性腸内細菌叢 新規生理活性代謝産物 Gタンパク質共役型受容体 腸管イントラネット

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

1. 研究開始当初の背景

消化管は免疫系、神経系、内分泌系と密接に連携して腸管イントラネットを構築することにより、外界とのインターフェイスとして宿主の恒常性維持に重要な役割を果たしている。消化管内には乳酸菌やビフィズス菌などのプロバイオティクス(善玉腸内細菌)を含む100兆個もの莫大な数の細菌が常時存在し(常在性腸内細菌叢)、これらが腸管イントラネットを介して宿主の生理機能に影響を及ぼす。そこで近年、常在性腸内細菌叢の制御を通じて各種疾患を予防しようとする試みに注目が集まっている。実際に、乳酸菌やビフィズス菌などのプロバイオティクスに関連した健康食品市場は現時点において既に約5500億円規模に達し、今後さらに増大する傾向にある。しかし、腸内細菌叢が腸管イントラネットにどのようなメカニズムで影響を及ぼしているかについては理解が進んでいない。

2. 研究の目的

ヒト腸管内には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。それら腸内細菌がコードする遺伝子の合計はヒトゲノムにある遺伝子数の100倍以上と推定される。近年の研究により、腸内細菌叢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ている。腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸が宿主に発現しているGPCRを活性化するという最近の興味深い報告は、腸内細菌由来代謝産物が外来性ホルモン(シグナル伝達物質)として作用することで宿主生理機能を制御する可能性を示唆する。そこで我々は各種GPCRをプローブとして利用することで、宿主において外来性シグナル伝達物質として作用する腸内細菌由来低分子代謝産物を網羅的に探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種疾患モデルマウスの糞便、健常者内視鏡検査排液等から抽出した低分子化学物質画分のライブラリー化

腸管内で産生される代謝産物は、腸内細菌叢の生態や構成に影響を与える種々の条件(加齢、食餌、疾病など)に伴い変化する。そこでそれらの条件の異なる健常者から広く糞便、内視鏡検査排液等を採用する。採取した試料は、随時アルコールあるいはアセトンなどの共溶媒で抽出し保存する。各抽出液の不溶性画分を遠心分離により除去後、低分子化学物質を含む上清を回収して混合する。回収した抽出液を蒸発乾固して低分子化学物質画分とする。

(2) ライブラリー化した低分子化学物質画分をGPCRライブラリー上でスクリーニング

低分子化学物質画分をより再現性良く効果的にスクリーニングするためには、細かく分画した低分子化学物質画分ライブラリーを作製する必要がある。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、逆相クロマトグラフィー(20画分)及びイオン交換クロマトグラフィー(20画分)により二次元に展開した合計400画分を調製し、各画分をGPCRライブラリー上でスクリーニングする。

4. 研究成果

当初スクリーニングに供する予定であった-arrestinアッセイ系を既知低分子リガンドを認識するヒトGPCR(約100種類)に対して運用し評価した。しかし、約半数の受容体においてリガンド刺激によって検出されるべき活性が予想外に低いことが判明した。そこで、感度、汎用性の点において-arrestinアッセイ系より優れた新規GPCRアッセイ系の開発に着手し、平成29年度内にこの新規アッセイ系の開発をほぼ完了することができた。平成30年度は、この新規アッセイ系をリガンド既知のヒトGPCRの全て(約200種類)に対して運用し評価した。その結果、およそ95%の受容体において良好なリガンド活性の検出が可能であった。リガンド活性の検出が困難であった残りの約5%の受容体において活性測定を可能にすべくアッセイ系を改良している。新規GPCRアッセイ系を用いれば、リガンド既知のヒトGPCRの全てを単一アッセイフォーマットによりスクリーニングすることが可能となる。今後はこのアッセイ系を用いて、上記の低分子代謝産物画分を網羅的かつ系統的にスクリーニングしていく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

Sakaguchi Y, Yamamichi N, Tomida S, Takeuchi C, Kageyama-Yahara N, Takahashi Y, Shiogama K, Inada KI, Ichinose M, Fujishiro M, Koike K. Identification of marker genes and pathways specific to precancerous duodenal adenomas and early stage adenocarcinomas. *J Gastroenterol*. 査読有、2019;54:131-140.
doi: 10.1007/s00535-018-1489-4.

Akimoto S, Suzuki JI, Aoyama N, Ikeuchi R, Watanabe H, Tsujimoto H, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I. A Novel Bioabsorbable Sheet That Delivers NF- κ B Decoy Oligonucleotide Restrains Abdominal Aortic Aneurysm Development in Rats. *Int Heart J*. 査読有、2018;59:1134-1141.
doi: 10.1536/ihj.17-632.

Fujiwara T, Takeda N, Hara H, Morita H, Kishihara J, Inuzuka R, Yagi H, Maemura S, Toko H, Harada M, Ikeda Y, Kumagai H, Nomura S, Takimoto E, Akazawa H, Ako J, Komuro

I. Distinct variants affecting differential splicing of TGFBR1 exon 5 cause either Loeys-Dietz syndrome or multiple self-healing squamous epithelioma. *Eur J Hum Genet*. 査読有、2018;26:1151-1158.

doi: 10.1038/s41431-018-0127-1.

Hara H, Takeda N, Kondo M, Kubota M, Saito T, Maruyama J, Fujiwara T, Maemura S, Ito M, Naito AT, Harada M, Toko H, Nomura S, Kumagai H, Ikeda Y, Ueno H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Aburatani H, Hata Y, Uchiyama M, Komuro I. Discovery of a Small Molecule to Increase Cardiomyocytes and Protect the Heart After Ischemic Injury. *JACC Basic Transl Sci*. 査読有、2018;3:639-653.

doi: 10.1016/j.jacbts.2018.07.005.

Mizutani H, Ono S, Ushiku T, Kudo Y, Ikemura M, Kageyama N, Yamamichi N, Fujishiro M, Someya T, Fukayama M, Koike K, Onodera H. Transparency-enhancing technology allows three-dimensional assessment of gastrointestinal mucosa: A porcine model. *Pathol Int*. 査読有、2018;68:102-108.

doi: 10.1111/pin.12627.

Abe H, Saito R, Ichimura T, Iwasaki A, Yamazawa S, Shinozaki-Ushiku A, Morikawa T, Ushiku T, Yamashita H, Seto Y, Fukayama M. CD47 expression in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: coexistence with tumor immunity lowering the ratio of CD8+/Foxp3+ T cells. *Virchows Arch*. 査読有、2018;472:643-651.

doi: 10.1007/s00428-018-2332-2.

Nakayama C, Yamamichi N, Tomida S, Takahashi Y, Kageyama-Yahara N, Sakurai K, Takeuchi C, Inada KI, Shiogama K, Nagae G, Ono S, Tsuji Y, Niimi K, Fujishiro M, Aburatani H, Tsutsumi Y, Koike K. Transduced caudal-type homeobox (CDX) 2/CDX1 can induce growth inhibition on CDX-deficient gastric cancer by rapid intestinal differentiation. *Cancer Sci*. 査読有、2018;109:3853-3864.

doi: 10.1111/cas.13821.

Minatsuki C, Yamamichi N, Inada KI, Takahashi Y, Sakurai K, Shimamoto T, Tsuji Y, Shiogama K, Kodashima S, Sakaguchi Y, Niimi K, Ono S, Niwa T, Ohata K, Matsushashi N, Ichinose M, Fujishiro M, Tsutsumi Y, Koike K. Expression of Gastric Markers Is Associated with Malignant Potential of Nonampullary Duodenal Adenocarcinoma. *Dig Dis Sci*. 査読有、2018;63:2617-2625.

doi: 10.1007/s10620-018-5179-0.

Toyoshima O, Tanikawa C, Yamamoto R, Watanabe H, Yamashita H, Sakitani K, Yoshida S, Kubo M, Matsuo K, Ito H, Koike K, Seto Y, Matsuda K. Decrease in PSCA expression caused by *Helicobacter pylori* infection may promote progression to severe gastritis. *Oncotarget*. 査読有、2017;9:3936-3945.

doi: 10.18632/oncotarget.23278.

Nagata N, Iwanari H, Kumagai H, Kusano-Arai O, Ikeda Y, Aritake K, Hamakubo T, Urade Y. Generation and characterization of an antagonistic monoclonal antibody against an extracellular domain of mouse DP2 (CRTH2/GPR44) receptors for prostaglandin D2. *PLoS One*. 査読有、2017;12:e0175452.

doi: 10.1371/journal.pone.0175452.

Kamo T, Akazawa H, Suda W, Saga-Kamo A, Shimizu Y, Yagi H, Liu Q, Nomura S, Naito AT, Takeda N, Harada M, Toko H, Kumagai H, Ikeda Y, Takimoto E, Suzuki JI, Honda K, Morita H, Hattori M, Komuro I. Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure. *PLoS One*. 査読有、2017;12:e0174099.

doi: 10.1371/journal.pone.0174099.

Takanashi M, Taira Y, Okazaki S, Takase S, Kimura T, Li CC, Xu PF, Noda A, Sakata I, Kumagai H, Ikeda Y, Iizuka Y, Yahagi N, Shimano H, Osuga JI, Ishibashi S, Kadowaki T, Okazaki H. Role of Hormone-sensitive Lipase in Leptin-Promoted Fat Loss and Glucose Lowering. *J Atheroscler Thromb*. 査読有、2017;24:1105-1116.

doi: 10.5551/jat.39552.

〔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) 研究分担者

研究分担者氏名：池田 祐一

ローマ字氏名：(IKEDA, Yuichi)

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：特任准教授

研究者番号 (8 桁): 1 0 7 4 4 4 1 9

研究分担者氏名：熊谷 英敏

ローマ字氏名：(KUMAGAI, Hidetoshi)

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：特任助教

研究者番号 (8 桁): 2 0 2 8 1 0 0 8

研究分担者氏名：山下 裕玄

ローマ字氏名：(YAMASHITA, Hiroharu)

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 5 0 5 9 9 3 9 7

研究分担者氏名：浅岡 良成

ローマ字氏名：(ASAOKA, Yoshinari)

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号 (8 桁): 9 0 4 3 1 8 5 8

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。