

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（特設分野研究）

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0055

研究課題名（和文）多変量解析による慢性炎症スパイラル形成機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of pathogenic mechanism of chronic inflammation

研究代表者

長谷 耕二（Hase, Koji）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・教授

研究者番号：20359714

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,300,000円

研究成果の概要（和文）：腸内細菌は難消化性多糖類の発酵代謝により短鎖脂肪酸を産生する。短鎖脂肪酸は多様な生理活性を有し、特に酪酸は腸管免疫恒常性維持における鍵因子とみなされている。本研究では我が国で年々増加している潰瘍性大腸炎（UC）およびクローン病（CD）患者における酪酸低下の原因を解析した。CD患者では主要な酪酸産生菌の顕著な減少がクローン病における酪酸産生低下の原因と考えられた。一方で、UC患者では腸内細菌によるムチン糖鎖利用の低下が酪酸産生低下の原因と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌のバランス失調はディバイオーシスと呼ばれる。近年確立された分子生物学的手法を用いた腸内細菌叢の解析によって、各種疾患におけるディバイオーシスの特徴が報告されている。興味深いことに、炎症性腸疾患、関節リウマチ、肝硬変、メタボリックシンドロームなど何らかの炎症反応を伴う疾患で共通して見られる異常の一つは、酪酸産生に関わる菌種の減少である。本研究において、潰瘍性大腸炎に特有な酪酸産生低下の原因が明らかとなったことから、今後は本疾患の病態メカニズムの理解が進むと期待される。

研究成果の概要（英文）：The dysbiosis of gut microbiota has been implicated in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases; however, the underlying mechanisms have not yet been elucidated. Levels of n-butyrate were significantly lower in stools of both CD and UC patients than in stools of healthy subjects. The major n-butyrate producer was particularly underrepresented in CD patients, but not in UC patients. The decrease in butyrate production in UC patients was attributed to abnormal mucin utilisation that is one of the pathways for n-butyrate production.

研究分野：免疫学

キーワード：炎症性腸疾患 ディバイオーシス 酪酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢のバランスに異常をきたすと、炎症性腸疾患や大腸癌などの消化器疾患に加えて、アレルギーや自己免疫性疾患、さらには精神性疾患や生活習慣病といった全身性の疾患が誘導されることが示唆されている。このような腸内細菌のバランス失調は『ディバイオーシス (dysbiosis)』と呼ばれる。ディバイオーシスは各種疾患の発症に関わる鍵因子であると想定されているが、その病態メカニズムには不明な点が多い。近年確立された 16S rRNA 解析手法によって、各種疾患におけるディバイオーシスの特徴が判明している。

様々な遺伝的要因によりバリアの低下や軽度な炎症が起こることでディバイオーシスが誘導され、その結果リーキーガットが誘導され、炎症スパイラルが加速すると考えられる。しかしながら、実際にどのような腸内環境の変化を経て、このスパイラルが形成されていくのかについてはほとんど情報が無い。

2. 研究の目的

興味深いことに、炎症性腸疾患、関節リウマチ、肝硬変、メタボリックシンドロームなど炎症反応を伴う疾患で共通して見られる異常の一つは、酪酸産生に関わる菌種の減少である。酪酸は短鎖脂肪酸の一つでありマウスとヒトの腸内で共通して産生される抗炎症性代謝物である。本グループでは、健常人と炎症性腸疾患患者の糞便中において酪酸産生の低下を見出しており、酪酸の低下が病態の増悪に関わっている可能性が示唆された。そこで本研究では腸内環境を構成する細菌組成、ムチン、代謝物の包括的解析を通じて、炎症性腸疾患における酪酸低下のメカニズムを解析した。

さらに、リーキーガットモデルマウスを用いて、リーキーガット症状を呈する遺伝子組み換えマウスを用いて、腸内細菌叢、腸内代謝物、免疫細胞の動態を経時的に観察した。

3. 研究の方法

PCR によって検体由来 DNA の 16S rRNA 遺伝子可変領域 3 および 4 を増幅、そしてアダプター配列およびインデックス配列を付加した。作成したライブラリを MiSeq 600 cycles v3 システムにより解析した。ヒトまたはラット由来検体中有機酸は HPLC により、マウス由来検体中の有機酸は GC-MS により、内部標準法にて解析した。糞便中ムチンをエタノール沈殿法により精製し、蛍光標識することにより定量した。糞便試料を酢酸緩衝液 (pH 5.5) に懸濁した後、ブタ胃粘膜ムチンを基質としてムシナーゼ活性を評価した。

4. 研究成果

(1) 炎症性腸疾患におけるディスバイオーシスの特徴化

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC) やクローン病 (Crohn's disease: CD) などの炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) は、遺伝的要因と環境要因の両方によって引き起こされる再発性の炎症性疾患である。先行研究によって、腸内細菌叢の構成異常 (dysbiosis) が IBD の発症や増悪に関与することが示唆されている。実際に、動物実験において dysbiosis 下の腸内細菌叢が腸管炎症を促進することが報告されている。しかし、IBD において dysbiosis が炎症を促進するメカニズムについては不明な点が多い。

本研究では炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) 患者では、ともに糞便中の酪酸濃度が減少していることを確認した。酪酸の減少は特に活動期の患者で顕著であった。酪酸濃度減少の原因を調べるために、腸内細菌構成を解析したところ、UC および CD 患者の腸内細菌は、健常者と比べて α 多様性が有意に低く、通性嫌気性細菌の増加と偏性嫌気性細菌が認められた。また CD 患者では主要な酪酸産生菌である *Faecalibacterium prausnitzii* が減少しており、特に活動期ではほとんど存在しなかった。対照的に、UC 患者においては、*F. prausnitzii* の割合は有意な減少は認められなかった。このことから、CD 患者における酪酸減少は *F. prausnitzii* の減少によると考えられるが、UC 患者については他にも原因があると考えられた。

ムチン糖鎖の解析から、ムチン O 結合型糖鎖利用が UC 患者において損なわれており、それが最終的に酪酸産生の低下に繋がっていることが示唆された。従来酪酸などの短鎖脂肪酸は食物繊維などの外来因子から産生されていることが知られてきたが、動物実験により宿主が産生するムチンの糖鎖も短鎖脂肪酸の産生源になることを見出した。以上のように、UC と CD では異なるメカニズムによって酪酸が減少していることが明らかとなった。酪酸は腸炎を抑制することが示されていることから、酪酸産生の低下が IBD における腸炎の悪化または慢性化に寄与していると考えられる。

(2) リーキーガットモデルによる全身性疾患発症の検証

本遺伝子組み換えマウスにタモキシフェンを投与して、リーキーガットが誘導されることを確認した。リーキーガットは炎症性腸疾患、自己免疫疾患、肝疾患など種々の疾患の原因となる。我々は、本マウスにリーキーガットを誘導することで顕著なディスバイオーシスが誘導され、さらに多発性硬化症またはギランバレー症候群に類似した自己免疫疾患症状を示すことを見出した。本マウスでは腸内細菌の異常が認められ、また抗自己抗体の産生が観察された。病態メカニズムの解明については今後の検討課題ではあるものの、本研究ではリーキーガットが自己免疫疾患の形成に直接関わっていることを実験モデルによって示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 7件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kimura Ikuo, Hase Koji et al. | 4. 巻 367 |
| 2. 論文標題 Maternal gut microbiota in pregnancy influences offspring metabolic phenotype in mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Science | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aaw8429 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kimura Shunsuke, Nakamura Yutaka, Kobayashi Nobuhide, Shiroguchi Katsuyuki, Kawakami Eiryō, Mutoh Mami, Takahashi-Iwanaga Hiromi, Yamada Takahiro, Hisamoto Meri, Nakamura Midori, Udagawa Nobuyuki, Sato Shintaro, Kaisho Tsuneyasu, Iwanaga Toshihiko, Hase Koji | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Osteoprotegerin-dependent M cell self-regulation balances gut infection and immunity | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 234 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13883-y | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Nakamura Yutaka, Mimuro Hitomi, Kunisawa Jun, Furusawa Yukihiro, Takahashi Daisuke, Fujimura Yumiko, Kaisho Tsuneyasu, Kiyono Hiroshi, Hase Koji | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Microfold cell-dependent antigen transport alleviates infectious colitis by inducing antigen-specific cellular immunity | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Mucosal Immunology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-020-0263-0 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Isobe Junya, Maeda Shintarou, Obata Yuuki, Iizuka Keito, Nakamura Yutaka, Fujimura Yumiko, Kimizuka Tatsuki, Hattori Kouya, Kim Yun-Gi, Morita Tatsuya, Kimura Ikuo, Offermanns Stefan, Adachi Takahiro, Nakao Atsuhito, Kiyono Hiroshi, Takahashi Daisuke, Hase Koji | 4. 巻 32 |
| 2. 論文標題 Commensal-bacteria-derived butyrate promotes the T-cell-independent IgA response in the colon | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 International Immunology | 6. 最初と最後の頁 243-258 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz078 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Mabbott Neil A., Hase Koji | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Editorial: Immunological Consequences of Antigen Sampling at Mucosal Surfaces | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Immunology | 6. 最初と最後の頁 2773 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.02773 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Kobayashi Nobuhide, Takahashi Daisuke, Takano Shunsuke, Kimura Shunsuke, Hase Koji | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Immunology | 6. 最初と最後の頁 2345 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.02345 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Nagai Motoyoshi, Hase Koji et al. | 4. 巻 178 |
| 2. 論文標題 Fasting-Refeeding Impacts Immune Cell Dynamics and Mucosal Immune Responses | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cell | 6. 最初と最後の頁 1072-1087 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2019.07.047 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Yamada Takahiro, Hino Shingo, Iijima Hideki, Genda Tomomi, Aoki Ryo, Nagata Ryuji, Han Kyu-Ho, Hirota Masato, Kinashi Yusuke, Oguchi Hiroyuki, Suda Wataru, Furusawa Yukihiro, Fujimura Yumiko, Kunisawa Jun, Hattori Masahira, Fukushima Michihiro, Morita Tatsuya, Hase Koji | 4. 巻 48 |
| 2. 論文標題 Mucin O-glycans facilitate symbiosynthesis to maintain gut immune homeostasis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 EBioMedicine | 6. 最初と最後の頁 513-525 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2019.09.008 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Onuki Masayoshi, Watanabe Masaki, Ishihara Narumi, Suzuki Koichiro, Takizawa Kei, Hirota Masato, Yamada Takahiro, Egawa Aiko, Shibahara Osamu, Nishii Midori, Fujihara Michiko, Makishima Makoto, Takahashi Daisuke, Furusawa Yukihiro, Kakuta Hiroki, Hase Koji | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 A partial agonist for retinoid X receptor mitigates experimental colitis | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 International Immunology | 6. 最初と最後の頁 251 ~ 262 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1093/intimm/dxy089 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Zai Khadijah, Ishihara Narumi, Oguchi Hiroyuki, Hirota Masato, Kishimura Akihiro, Mori Takeshi, Hase Koji, Katayama Yoshiki | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 Regulation of inflammatory response of macrophages and induction of regulatory T cells by using retinoic acid-loaded nanostructured lipid carrier | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition | 6. 最初と最後の頁 1 ~ 11 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1080/09205063.2018.1493671 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kato Tamotsu, Yamazaki Kyoko, Nakajima Mayuka, Date Yasuhiro, Kikuchi Jun, Hase Koji, Ohno Hiroshi, Yamazaki Kazuhisa | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Oral Administration of Porphyromonas gingivalis Alters the Gut Microbiome and Serum Metabolome | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 mSphere | 6. 最初と最後の頁 e00460-18 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1128/mSphere.00460-18 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Zai Khadijah, Hirota Masato, Yamada Takahiro, Ishihara Narumi, Mori Takeshi, Kishimura Akihiro, Suzuki Koichiro, Hase Koji, Katayama Yoshiki | 4. 巻 286 |
| 2. 論文標題 Therapeutic effect of vitamin D3-containing nanostructured lipid carriers on inflammatory bowel disease | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Controlled Release | 6. 最初と最後の頁 94 ~ 102 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.jconrel.2018.07.019 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Suzuki K., Yamada T, Yamazaki K, Hirota M, Ishihara N, Sakamoto M, Takahashi D, Iijima H, Hase K. | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 Intestinal epithelial cell-specific deletion of α -mannosidase II ameliorates experimental colitis. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Cell Struct. Funct. | 6. 最初と最後の頁 25-39 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.17022 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Okubo K, Kurosawa M, Kamiya M, Urano Y, Suzuki A, Yamamoto K, Hase K, Homma K, Sasaki J, Miyauchi H, Hoshino T, Hayashi M, Mayadas TN, Hirahashi J. | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Macrophage extracellular chromatin release induced by Mac-1 mediated platelet-macrophage interactions triggers acute kidney injury in rhabdomyolysis. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Nat. Med. | 6. 最初と最後の頁 232-238 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nm.4462 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Date Y, Ebisawa M, Fukuda S, Shima H, Obata Y, Takahashi D, Kato T, Hanazato M, Nakato G, Williams IR, Hase K, Ohno H. | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 NALT M cells are important for immune induction for the common mucosal immune system. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Int. Immunol. | 6. 最初と最後の頁 471-478 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxx064 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Kunisada Y, Eikawa S, Tomonobu N, Domae S, Uehara T, Horii S, Furusawa Y, Hase K, Sasaki A, Udono H. | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 Attenuation of CD4+CD25+regulatory T cells in the tumor microenvironment by metformin, a type 2 diabetes drug | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 EBioMedicine | 6. 最初と最後の頁 154-164 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2017.10.009 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Jinnohara T, Kanaya T, Hase K, Sakakibara S, Kato T, Tachibana N, Sasaki T, Hashimoto Y, Sato T, Watarai H, Kunisawa J, Shibata N, Williams I, Kiyono H, and Ohno H. | 4. 巻 214 |
| 2. 論文標題 IL-22BP dictates characteristics of Peyer's patch follicle-associated epithelium for antigen uptake. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 J. Exp. Med. | 6. 最初と最後の頁 1607-1618 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20160770 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 3件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Koji Hase |
| 2. 発表標題 Nutritional signals regulate lymphocyte homing to gut-associated lymphoid tissue |
| 3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 長谷耕二 |
| 2. 発表標題 栄養シグナルによるパイエル板リンパ球動態制御 |
| 3. 学会等名 Science Pioneers Consortium (SPC) 2019 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 長谷耕二 |
| 2. 発表標題 腸内細菌を標的とした創薬イノベーション |
| 3. 学会等名 JASIS2019ライフサイエンスイノベーション (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Koji Hase |
| 2. 発表標題 Nutritional Signals regulate lymphocyte homing to gut-associated lymphoid tissue |
| 3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 長谷耕二 |
| 2. 発表標題 食物アレルギーの発症に及ぼす腸内代謝物の影響 |
| 3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 長谷耕二 |
| 2. 発表標題 栄養シグナルによるパイエル板リンパ球動態制御 |
| 3. 学会等名 日本食品免疫学会設立15周年記念学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 長谷耕二 |
| 2. 発表標題 腸管における免疫監視機構 |
| 3. 学会等名 第22回 日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 長谷耕二 |
| 2. 発表標題 栄養シグナルによる免疫バリアの制御 |
| 3. 学会等名 東邦大学研究ブランディング事業最終シンポジウム(招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Koji Hase |
| 2. 発表標題 Microbiota-derived metabolites shape mucosal barrier and immunity |
| 3. 学会等名 2017 International Congress on Obesity and Metabolic Syndromes (ICOMES) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | | | |