

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11484

研究課題名(和文) 腸微生物叢と骨格筋マイオスタチン腸筋相関による大腸がん発生機序の解明と予防法開発

研究課題名(英文) Gut-muscle-microbiota axis in colon tumor in high-fat diet induced obesity

研究代表者

松本 啓志(Hiroshi, Matsumoto)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20309553

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)：糞便移植(FMT)により大腸ポリープを抑制できるか検討した。高脂肪食誘発肥満マウスにおけるアゾメキタン誘発大腸腫瘍に対して、FMTを行った。ドナー糞便として普通食FMT(ND)、ND+運動FMT(ND+Ex)、FMT(HFD+Ex)マウス便を投与した。FMT(ND+Ex)群は、他の群と比較して有意にマウス大腸ポリープは抑制された。FMT(ND+Ex)群の糞便中のコハク酸、プロピオン酸は有意に減少、一方酢酸は有意に増加していた。またミユリコール酸が有意に増加していた。FMTは大腸腫瘍抑制効果を認め、その抑制効果は腸管バリア機能増強に関連している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動したマウスの糞便を移植してマウス大腸腫瘍抑制効果を示した報告は、国内外になく学術的な意義がある。また、その効果は腸管粘膜バリア機能に関連することまで解明しており、それに関連する腸内細菌を同定することができれば、今後新たな大腸腫瘍予防法の可能性を示唆することができる。

研究成果の概要(英文)：Diet and exercise(Ex) are effective methods for controlling body weight and are linked to alterations in gut microbiota. These factors are also associated with a colorectal tumor. We investigated whether fecal microbiota transplantation(FMT) from a normal fat diet(NFD) or high-fat diet(HFD), exercise, and their combination would affect colon tumorigenesis in azoxymethane (AOM)-treated diet-induced obesity mice. The number of colon tumors treated with FMT was significantly decreased from that of HFD only group. Regarding short-chain fatty acids in feces, the FMT(NFD+Ex)+HFD group showed a significantly more decrease in succinic acid and propionic acid than HFD only group. Regarding fecal acetic acid, muricholic acid (MCA) in the FMT(NFD+Ex) group was significantly increased than that of other groups. These fecal metabolic factors were associated with intestinal barrier functions. Now we are analyzing the mucosa-associated microbiota, fecal microbiota, and intestinal barrier functions.

研究分野：消化器内科

キーワード：大腸腫瘍 糞便移植 肥満 短鎖脂肪酸 腸管バリア

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

わが国の死因として、ここ 30 年間悪性腫瘍が第一位となっている。そのなかでも大腸癌の罹患および死亡率は増加の一途をたどっている。大腸癌のリスク要因には、肥満、食事を含む生活習慣、運動不足、腸内微生物叢などの環境要因が知られている。わが国において大腸癌が増加している要因は明らかになっていない。そのため、その原因解明および、その予防はきわめて重大な国民衛生上の課題と考えられる。

現在、大腸発癌リスクを減少させる唯一の確実な因子として、WCRF/AICR は身体活動を挙げている。身体活動とは、骨格筋の収縮を伴い、安静時よりも多くのエネルギー消費を伴う状態をさす。日常生活における「生活活動」と体力の維持・向上を目的とした計画的・意図的に行う「運動」に分けられる。身体活動は、大腸癌ならびに大腸前癌病変としてみなされている腺腫に対する予防効果が示されているが、そのメカニズムに関しては未だ不明点が多い。

近年、骨格筋は収縮して関節を動かす運動器としての役割以外にも、ホルモン様生理活性物質を分泌する内分泌器官としての役割が注目されている。その分泌される生理活性物質の総称はマイオカインと呼ばれている。運動による様々な健康効果はマイオカインの働きの可能性が示唆されており、現在研究が進んでいるが、まだ十分にわかっていない。

また一方で、腸内細菌叢と大腸腫瘍との関連性を示唆する報告がされている。例えば、口腔内で歯周病の原因菌として知られるフソバクテリウム・ヌクレアタム (Fusobacterium nucleatum) は、大腸がんの患者さんの便中に多く存在することが報告されている。しかし、運動と大腸腫瘍の観点から、腸内細菌叢を解析した研究はない。

そこで本研究では、大腸腫瘍と運動および腸内細菌叢の関連性を明らかにすることを目的に、食事誘発肥満マウスにおける大腸腫瘍モデルを用いて食事、運動、糞便移植による影響を検討した。

## 2. 研究の目的

高脂肪食誘発肥満マウスにおけるアゾキシメタン(AOM)誘発大腸腫瘍への運動の影響をマイオカイン、腸内細菌叢の観点から検討する

## 3. 研究の方法

### ・検討

検討 1: AOM 誘発マウス大腸ポリープに対する食事と運動による影響の検討: 食事(普通食(normal diet:ND)、高脂肪食(high fat diet:HFD)と運動(Ex)(なし、あり)で 4 群間比較を行った。

検討 2: HFD 誘発肥満 AOM マウス大腸ポリープに対する糞便移植(FMT)による影響の検討: 移植

するドナー糞便として、ND、ND+Ex、HFD+Ex を使用した。(図1)

- ・ マウス種 : Balb/c 雄、各群 6-8 匹、体重測定を週 1 回行った。
- ・ 食事および食事誘発肥満の作成 : 普通食(normal diet:ND)と高脂肪食(high fat diet:HFD)を使用した。HFD は 5 週齢から変更し、終了まで継続した。
- ・ AOM 誘発大腸腫瘍モデル : アゾキシメタン(AOM) 10mg/kg body 6 回(6-11 週) 週 1 回腹腔内投与を行った。マウス大腸内視鏡検査を 4 週ごとに行い、ポリープ発生を確認した。
- ・ トレッドミル運動 : 18m/分, 30 分/日, 5 日/週、20 週間継続 (6-26 週目)して行った。トレッドミル運動は 5-7m/分で開始して 3m/分ずつ早くしていき、最大 18m/分とした。
- ・ 糞便移植(Fecal transplantation;FMT) : レシピエントマウスは、FMT をうける 2 日前 (10 週目の最後) 抗菌薬投与 Ciprofloxacin 0.2g/L + metronidazole 1g/L (Sigma-Aldrich) 飲み水として内服した。FMT は 12 週から 26 週まで(14 週間)、週 5 回行った。移植する糞便は、ドナーマウスから毎日新鮮糞便 100mg (約 5-6 個の糞便) を採取したものを使用した。採取後 1ml sterile saline で攪拌、800g、3min 遠心し、上澄み 500-600ul を 10 分以内に経口投与した。
- ・ 採血 : 26 週目の血清コレステロール、グルコース値を測定した。
- ・ qPCR 測定 : 26 週目に大腸(腫瘍部)、筋肉(足底筋、ヒラメ筋、腓腹筋)を採取しサイトカイン、マイオカイン、短鎖脂肪酸受容体発現を検討した。
- ・ 糞便メタボロノーム解析 : 26 週目に糞便を採取、- 80 保管し解析を行った。糞便メタボロノーム分析として、有機酸、非抱合型胆汁酸(pH 緩衝化ポストカラム電気伝導度検出法、テクノスルガ)で行った。
- ・ 糞便、腸粘液細菌叢解析 : 1 匹のマウスより約 5-6 個の糞便(100mg)を採取し、1ml inhibitEX buffer(Qiagen) に入れ - 80 保管した。腸粘液は腸管を長軸で切開した後 PBS で軽くリンスし、その後内腔をこすって粘液を採取した。採取したサンプルは、PowerFecal の protocol ビース破碎法にて処置した。腸内細菌解析に関して、先進ゲノム支援をうけ、16sRAN 解析にて現在解析中である。
- ・ 解析 : データの正規性検定 Kolmogorov-Smirnov 正規性検定 / Shapiro-Wilk 検定で検討を行った後、パラメトリック検定 平均値±SD 一元配置分散分析、あるいはノンパラメトリック検定 中央値[25%-75%] Kruskal-Wallis 検定を行った。

#### 4. 研究成果

**検討 1** : HFD 群は ND 群よりも体重が多かった。Ex は、ND 群・HFD 群両群で体重が減少させた。HFD は、ND よりも血糖値 (BS)、総コレステロール(TC)を上昇させた(BS;ND 105.8mg/dl, HFD 262.0mg/dl,  $p < 0.05$ )(TC;ND 54.0mg/dl, HFD 106.6mg/dl,  $p < 0.05$ )。Ex は、BS を低下させたが、TC は変化しなかった(BS: ND+Ex 82.0mg/dl, HFD+Ex 186.6mg/dl)(TC: ND+Ex 65.0mg/dl, HFD+Ex 105.0mg/dl)。HFD 群は ND 群よりも大腸ポリープ数が増加した(ND  $6.5 \pm 1.3$  個, HFD  $11.4 \pm 1.5$  個,  $p < 0.001$ )。Ex は、ND, HFD 両群で大腸

ポリープ数を抑制した(ND  $6.5 \pm 1.3$  個, ND+Ex  $2.8 \pm 2.5$  個,  $p < 0.05$ )(HFD  $11.4 \pm 1.5$  個, HFD+Ex  $5.2 \pm 0.8$  個,  $p < 0.01$ )。運動によるポリープ抑制効果は、ND と比較して HFD の方が大きかった。HFD 群は ND 群と比較して大腸腫瘍部の IL-6, TNF 発現が優位に高かった (IL-6: ND 0.33, HFD 1.62,  $p < 0.05$ )(TNF : ND 1.12, HFD 3.09,  $p < 0.05$ )。ND+Ex 群は ND 群と比較して大腸腫瘍部の SPARC 発現が優位に高かった ( SPARC: ND 0.47, ND+Ex 1.03,  $p < 0.05$  )。ND 群と比較して HFD 群, ND+Ex 群, HFD+Ex 群で大腸腫瘍部の GPR109A 発現が優位に高かった(GPR109a: ND 0.27, HFD 0.91, ND+Ex 0.68, HFD+Ex 0.60,  $p < 0.05$ )。HFD 群は ND 群と比較して糞便中のコハク酸、酢酸、酪酸、プロピオン酸が有意に低値を示した (コハク酸 HFD 0.59mg/g, ND 0.17mg/g: 酢酸 HFD 0.63mg/g, ND 2.41mg/g: プロピオン酸 HFD 0.10mg/g, ND 0.47mg/g: N 酪酸 HFD 0.31mg/g, ND 0.93mg/g,  $p < 0.05$  )。食事 ND の場合、Ex によってコハク酸、酪酸低下傾向にあった。(コハク酸 ND 0.17 mg/g, ND+Ex 0.12 mg/g: N 酪酸 ND 0.93 mg/g, ND+Ex 0.74 mg/g) 食事 HFD の場合、Ex による糞便中有機酸変化なし。糞便中の各胆汁酸濃度に有意に変化したものはなかった。

**検討 2:** FMT は HFD 誘発肥満における AOM 誘発大腸ポリープ数を有意に抑制した。(HFD 12.0 個, HFD+FMT(ND) 5.0 個, HFD+FMT(ND+Ex) 4.0 個, HFD+FMT(HFD+Ex) 8.0 個,  $p < 0.05$ )。FMT によるポリープ抑制効果が一番強かったのは、ND+Ex 群の糞便を移植した (FMT(ND+Ex))群であった(図 2)。FMT は、BS を低下させたが、TC は変化しなかった(BS; HFD 245 mg/dl, HFD+FMT(ND) 100 mg/dl, HFD+FMT(ND+Ex) 105 mg/dl, HFD+FMT(HFD+Ex) 150 mg/dl)(図 3)。FMT(ND+Ex)群は HFD 単独群と比較して糞便中のコハク酸、プロピオン酸が有意に減少し、糞便中の酢酸が有意に増加していた。(コハク酸 HFD 0.05mg/g, FMT(ND+Ex) 0.06mg/g: プロピオン酸 HFD 0.11mg/g, FMT(ND+Ex) 0.22mg/g)(図 4)。FMT(ND+Ex)群は ND 単独群と比較して糞便中の wMCA が有意に増加、HDCA は有意に減少していた(図 5)。

**結果のまとめ :** Ex による大腸腫瘍抑制効果は、マイオカイン SPARC と関連があった。

FMT(ND+Ex)は HFD 誘発肥満における AOM 誘発大腸ポリープ数を有意に抑制した。その効果は、FMT による腸管粘膜バリア強化作用、特に糞便中プロピオン酸増加、ムコール酸による粘液増加作用による可能性がある。これらの効果に対して、糞便、粘膜関連細菌叢が関与しているのか、現在追加検討中である。

図 1

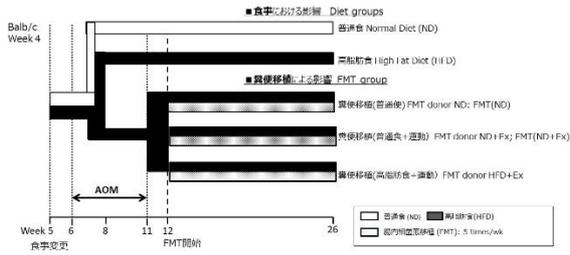


図 2

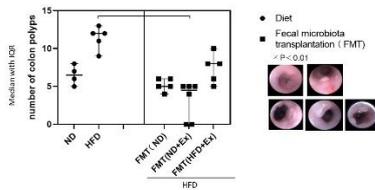


図 3

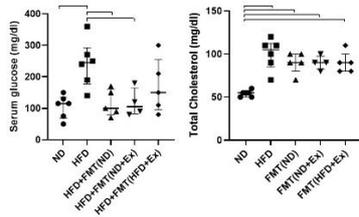


図 4

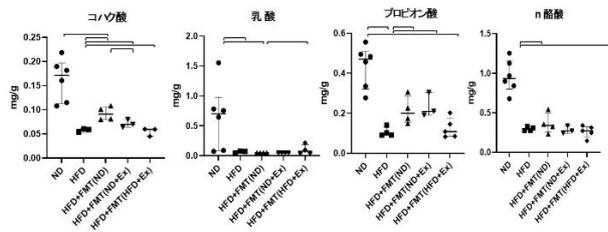
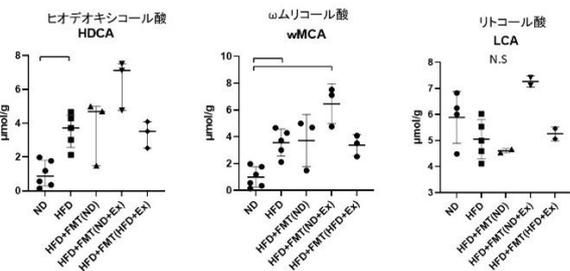


図 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	塩谷 昭子  (Shiotani Akiko)  (80275354)	川崎医科大学・医学部・教授   (35303)	
研究分担者	小椋 義俊  (Ogura Yoshitoshi)  (40363585)	久留米大学・医学部・教授   (37104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関