

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17861

研究課題名（和文）メタゲノム及びメタボローム解析による重症病態の腸内環境デザインの開発

研究課題名（英文）Development of intestinal environment design for severe pathological conditions using metagenomic and metabolomic analysis

研究代表者

村津 有紗（Muratsu, Arisa）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90737199

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：敗血症などの重症救急病態では、腸内細菌叢の崩壊が全身性炎症反応を引き起こすことが明らかにされている。一方で腸内細菌及び代謝産物の統合的かつ網羅的な解析は行われていなかった。本研究ではメタゲノム解析とメタボローム解析を用いて、敗血症マウスモデルにおける腸内細菌叢と代謝産物を明らかにし、全身性炎症の潜在的要因を探ることを目的とした。研究結果から、侵襲後急性期には Enterobacteriaceae科が増加し、亜急性期にはLachnospiraceae科とRuminococcaceae科が増加することがわかった。代謝産物は、分岐鎖アミノ酸やCholineが増加した一方で、短鎖脂肪酸は減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

侵襲後、腸内細菌叢と代謝産物は大きく変化していることが示された。今後増減する腸内細菌や代謝産物が病態へと与える影響を評価することで、重症救急病態に対する新たな治療法の開発のために役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In severe emergency conditions such as sepsis, it has been shown that disruption of the intestinal microbiota leads to a systemic inflammatory response. However, an integrated and comprehensive analysis of intestinal bacteria and metabolites has not been performed. In this study, we used metagenomic and metabolomic analyses to elucidate the intestinal microbiota and metabolites in a mouse model of sepsis and to explore potential factors contributing to systemic inflammation.

Our study showed that Enterobacteriaceae increased in the acute phase after invasion, and Lachnospiraceae and Ruminococcaceae families increased in the subacute phase. Branched-chain amino acids and Choline increased, while short-chain fatty acids decreased.

研究分野：救急医学

キーワード：腸内細菌 代謝産物

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、腸内細菌の総遺伝子数はヒトの持つ遺伝子の 100 倍以上にのぼり、ヒトとは異なる独自の代謝経路で様々な代謝産物を産生・分泌することがわかってきた。

最近では解析手法の発展とともに、特定の疾患における腸内細菌や代謝産物の特徴が明らかとなり、各疾患に対し腸内の恒常性を維持する治療が全身恒常性にも大きな影響を与えることがわかってきている。その一方で重症救急病態においては腸内細菌叢が崩壊することは知られているものの、各疾患における腸内細菌叢の特徴や腸内の恒常性の維持という観点からみた全身に対する腸内環境へのアプローチほとんどなされていなかった。

我々は腹膜炎敗血症モデル (CLP: Cecal ligation puncture モデル) を作成し、侵襲に伴い Enterobacteriaceae が増加することを確認した。そして代謝産物の 1 つである水素を高濃度水素水として胃内に投与すると、Enterobacteriaceae が減少することで腸内細菌叢が維持され、生存率は改善することがわかった。そして便中の代謝産物の中でも短鎖脂肪酸が有意に減少することを示した。このような研究結果から敗血症をはじめとする重症病態において腸内細菌とその代謝産物の変化を統合的・網羅的に解析することや、その変化に合わせた治療を行い腸管内の恒常性を保つことは、生命予後を規定するきわめて重要な因子であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、敗血症マウスモデルにおける腸内細菌叢と代謝産物をメタゲノム解析とメタボローム解析を用いて明らかにし、全身性炎症の潜在的要因を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 敗血症モデルマウスにおける腸内細菌叢の変化:

C57BL/6J マウス (6 週齢、20 ~ 25 g) に対し盲腸結紮穿孔 (Cecal ligation and puncture : CLP) を実施し、1 週間生存率 100% の軽症敗血症モデルを作成した。処置前 (day0)、処置 1 日後 (day1)、3 日後 (day3)、7 日後 (day7) の糞便を採取し、16S rRNA sequencing により解析した。

(2) 敗血症モデルマウスにおける代謝産物の変化:

敗血症モデルマウスにおける糞便中の代謝産物を調べるため、CE-TOFMS (キャピラリー電気泳動質量分析/飛行時間法) を用いて解析を行った。

(3) 血清・腸管のサイトカイン産生:

敗血症モデルマウスにおける血清および大腸中の TNF- α 、IL-6、および IL-10 を ELISA キットを用いて分析した。大腸中の IL-4、IL-17、TGF- β および IFN- γ は、ELISA キットを用いて分析した。糞便サンプルを PBS で 10 倍に希釈し、3000rpm で 5 分間、8000rpm で 5 分間、12000rpm で 5 分間遠心分離し、ELISA キットを用いて cathelicidin を測定した。

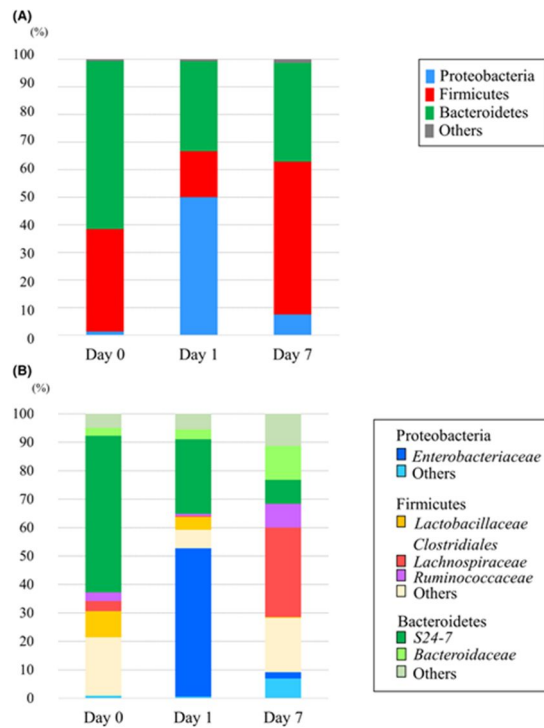
(4) 腸管の免疫細胞:

敗血症モデルマウスにおける腸管組織中の白血球を抽出し、CD4、CD8 などの表面マーカーを解析し、CD4+細胞における Foxp3+ 細胞の割合を調べた。

4. 研究成果

(1) 敗血症モデルマウスにおける腸内細菌叢の変化:

day1 で Proteobacteria 門の Enterobacteriaceae 科が増加し、Bacteroidetes 門および Firmicutes 門の割合は減少した。Enterobacteriaceae 科は腸管炎症に伴って増加するとされ、この増加は敗血症と関わりがある可能性が示唆された。day7 では Proteobacteria 門は有意に減少し、Firmicutes 門の Lachnospiraceae 科と Ruminococcaceae 科が増加した。増加したこれらは制御性 T 細胞の分化を促進する酪酸を産生することが知られており、炎症を制御する方向に働いた可能性が示唆された。



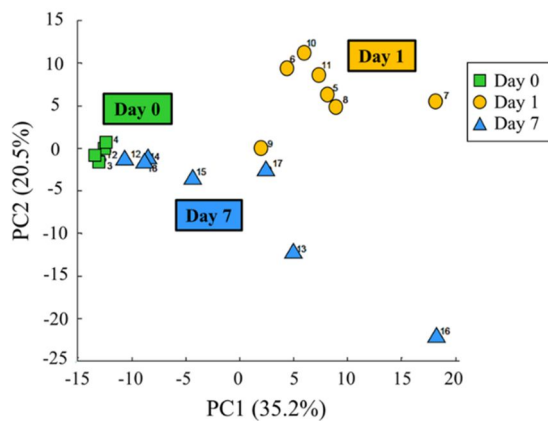
(図) 腸内細菌叢の変化

(2)敗血症モデルマウスにおける代謝産物の変化:

主成分分析 (PCA)

CLP 後の糞便代謝産物から、CE-TOFMS により 313 の代謝物が同定された。day0、day1、day7 の糞便代謝産物では著しく異なる主成分が観察された。

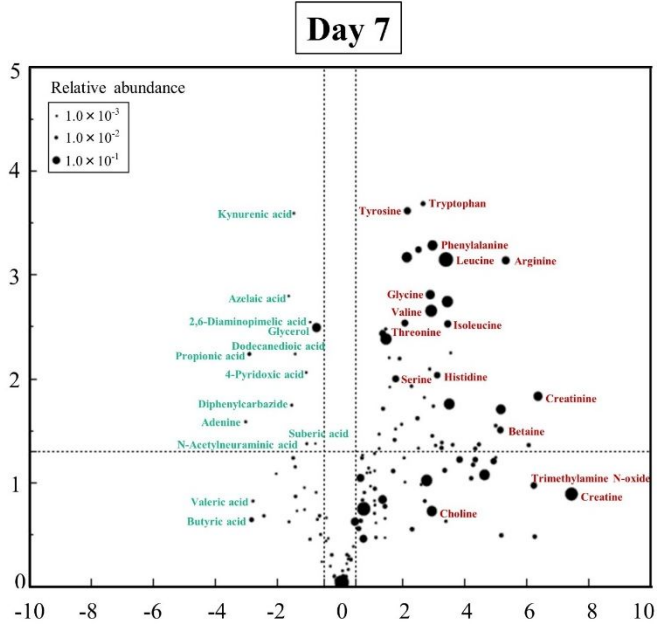
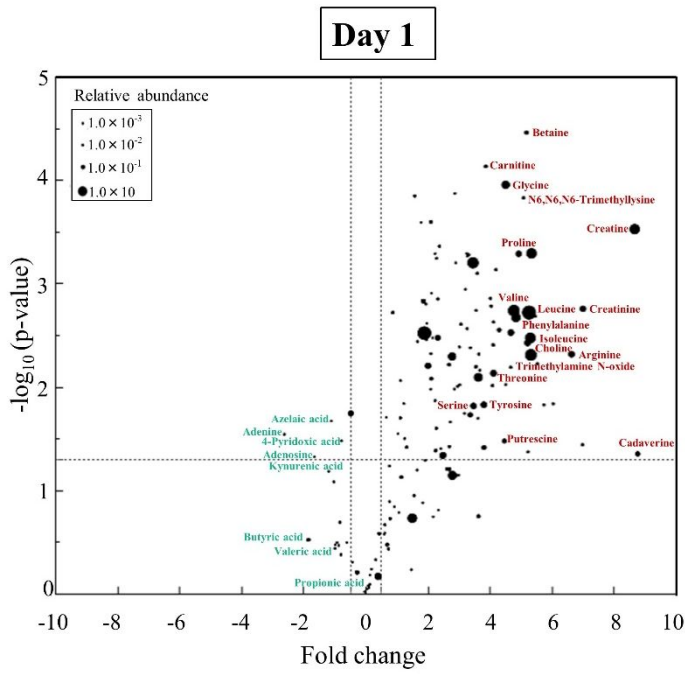
Principal coordinate analysis (PCA)



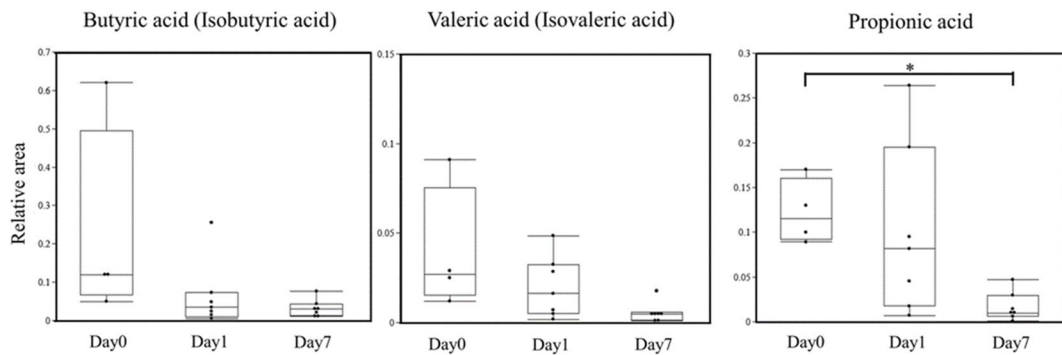
(図) 主成分分析

Volcano plot 解析

多くの代謝物が day0 と比較し day1 (261 代謝物) および day7 (236 代謝物) に増加した。Valine などの分岐鎖アミノ酸や、動脈硬化などに関与する Choline などが増加した。一方、抗炎症効果のある酪酸、吉草酸、プロピオン酸などの短鎖脂肪酸は減少した。



(図) Volcano plot 解析



(図) 短鎖脂肪酸の変化

(3) 血清・腸管のサイトカイン産生:
 敗血症モデルマウスにおいて腸管内の TNF- α 、IL-6、IFN- γ などのサイトカインは、day1 で増加し day7 で減少した。抗菌分子である cathelicidin は day1 で増加し day7 で減少した。これ

は day1 における Enterobacteriaceae 科の増加など腸内細菌叢の変化に対し抗菌分子の産生が増加した可能性が示唆された。

Blood

	Day0 (n=4)	Day1 (n=6)	Day7 (n=6)
TNF- α (pg/mL)	21.0 (21.0-21.0)	66.5 (21.0-195.3)	82.0 (21.0-195.3)
IL-6 (pg/mL)	0.6 (0.6-0.6)	2227.9 (416.8-4405.2)*	59.1 (4.9-102.1)
IL-10 (pg/mL)	1.8 (1.8-1.8)	97.8 (11.7-366.9)	1.8 (1.8-45.7)

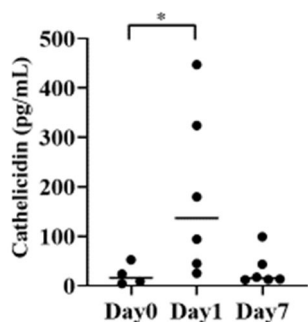
Large intestine

	Day0 (n=4)	Day1 (n=6)	Day7 (n=6)
TNF- α (ng/mL)	6.7 (0.1-14.9)	19.8 (11.2-24.6)	14.2 (8.0-18.1)
IL-6 (ng/mL)	11.4 (9.9-13.9)	29.3 (23.0-49.8)*	12.8 (10.5-18.4)
IL-10 (ng/mL)	8.8 (7.9-10.6)	16.3 (11.5-17.9)*	9.6 (8.0-12.6)
IFN- γ (ng/mL)	6.9 (6.4-7.1)	8.5 (7.4-10.0)	6.5 (4.1-7.2)
IL-4 (ng/mL)	6.7 (6.1-7.4)	9.5 (8.5-9.9)*	6.0 (5.2-8.4)
IL-17 (ng/mL)	24.6 (23.7-25.4)	32.7 (28.9-40.4)*	24.2 (19.5-28.2)
TGF- β (ng/mL)	16.2 (13.2-17.4)	21.2 (20.1-26.3)*	16.6 (13.5-18.7)

*p< 0.05 vs. Day0

Date represent median (interquartile range, IQR).

(図) 血清・腸管内のサイトカイン産生

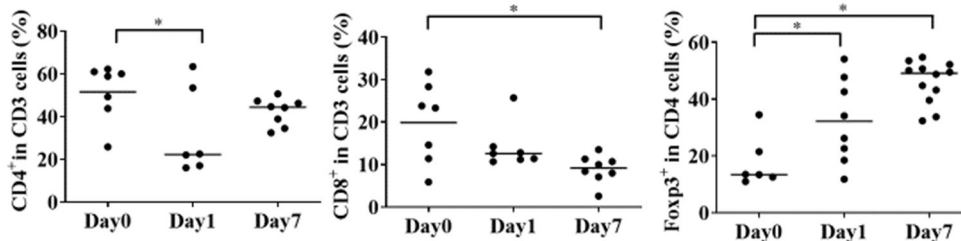


*p< 0.05 vs. Day0

(図) 便中 Cathelicidin の変化

(4) 腸管の免疫細胞:

Foxp3+細胞の割合は day1・day7 で増加し、抗炎症反応が亢進したことが示唆された。



*p< 0.05 vs. Day0

(図) 腸管内の Foxp3+CD4+T 細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Muratsu Arisa, Ikeda Mitsunori, Shimizu Kentaro, Kameoka Shoichiro, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Matsumoto Hisatake, Ogura Hiroshi, Shimazu Takeshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Dynamic change of fecal microbiota and metabolomics in a polymicrobial murine sepsis model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acute Medicine & Surgery	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） 10.1002/ams2.770	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村津有紗
2. 発表標題 敗血症における腸内細菌と便中代謝産物の評価 メタゲノムとメタボローム解析を用いて
3. 学会等名 日本救急医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村津有紗
2. 発表標題 敗血症マウスモデルにおける腸内細菌叢とメタボロミクスを用いた代謝産物の変動
3. 学会等名 日本集中治療医学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------