

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21530

研究課題名（和文）炎症性腸疾患における腸内細菌病因説の検証

研究課題名（英文）Verification of gut microbial pathogenesis in Inflammatory Bowel Disease

研究代表者

金 倫基（Kim, Yun-Gi）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・教授

研究者番号：00620220

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）：炎症性腸疾患（IBD: Inflammatory bowel disease）は、腸管における慢性的な炎症により、下痢・便秘・血便・発熱などを引き起こす疾患である。IBDは、遺伝学的・環境要因が関与する疾患であると言われているが詳細な発症メカニズムについては不明である。近年、IBDの発症に腸内細菌が関与している可能性が示唆されている。本研究では実験的腸炎の感受性を高める腸内細菌群を同定し、腸炎惹起にかかわる腸内細菌遺伝子を特定するための足掛かりとなるデータを得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IBDの発症や病態変化に腸内細菌が関与していることが示唆されているが、実際に特定の腸内細菌が腸炎を惹起しているのか、また、その場合にどのようなメカニズムを介しているのか、については未だ不明である。本研究では実験的腸炎の感受性を高める腸内細菌を同定し、遺伝子レベルでの解析を行うことができた。この腸炎惹起にかかわる腸内細菌由来の遺伝子の機能を同定できれば、腸内細菌が腸炎を引き起こす新たな作用メカニズムを明らかにすることができ、IBDの病因を理解する上で重要な知見が得られると期待している。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory bowel disease (IBD) is an inflammatory disorder of the gastrointestinal tract. Although the etiology of IBD is unknown, gut microbiota alteration is considered a novel factor involved in the pathogenesis of IBD. In this study, we were able to identify a group of gut microbiota that increase the susceptibility to experimental colitis, and obtained the data that can be used as a stepping stone to identify the gut microbiota-related genes involved in inducing experimental colitis.

研究分野：腸内細菌学

キーワード：腸内細菌 炎症性腸疾患 遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD: Inflammatory bowel disease) は、腸管における慢性的な炎症により、下痢・便秘・血便・発熱などを引き起こす疾患である。IBD は、遺伝学的・環境要因が関与する疾患であると言われていたが詳細な発症メカニズムについては不明である。近年、IBD の発症に腸内細菌が関与している可能性が示唆されている。そこで申請者は、IBD が特定の腸内細菌によって引き起こされるという「IBD 腸内細菌病因説」を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究は、IBD 疾患モデルマウスを用いることにより、腸炎惹起に関わる腸内細菌を同定し、その作用メカニズムを解明することで、ヒト IBD の発症原因を明らかにするための基盤的知見を得ることを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験的腸炎の惹起に関わる腸内細菌の同定

候補責任細菌の単離を行うために、腸内細菌叢の異なる同系統のマウスの DSS (ドデシル硫酸ナトリウム) 誘導性大腸炎に対する感受性を検証した。また、腸炎感受性における腸内細菌の寄与を検証するため、腸炎感受性の異なる同系統のマウスを同一のケージで飼育し、腸炎病態の変化を観察するとともに、病態変化に関わる腸内細菌の同定を行った。

#### (2) 腸炎惹起に関わる腸内細菌の遺伝学的解析

腸炎惹起に関わる腸内細菌代謝経路を明らかにするために、腸炎惹起性細菌の保有する遺伝子を解析するためにショットガンメタゲノムシーケンスを行った。高純度かつ断片サイズの大きいゲノム DNA を抽出し、PacBio RSII でシーケンス後、HiSeq X Ten でエラー補正を行った。さらに、腸内細菌のシングルセルゲノムシーケンス解析も行った。

### 4. 研究成果

2つの成育所から搬入した腸内細菌叢の異なる同系統のマウスの DSS (ドデシル硫酸ナトリウム) 誘導性大腸炎に対する感受性を検証したところ、一方の群 (SPF1) では重篤な大腸炎が発症したのに対し、他方の群 (SPF2) では大腸炎がほとんど起こらないことを見出した (図1)。SPF1 マウスでは DSS 投与後に顕著な体重低下や大腸組織の傷害、病理スコアの上昇が見られたが、SPF2 マウスでは強い症状が引き起こされなかった (図1)。次に、SPF1 マウスと SPF2 マウスを共飼育することで、DSS 誘導性大腸炎に対する感受性が変化するのかを検証した。その結果、SPF1 マウスと共飼育した SPF2 マウスでは、

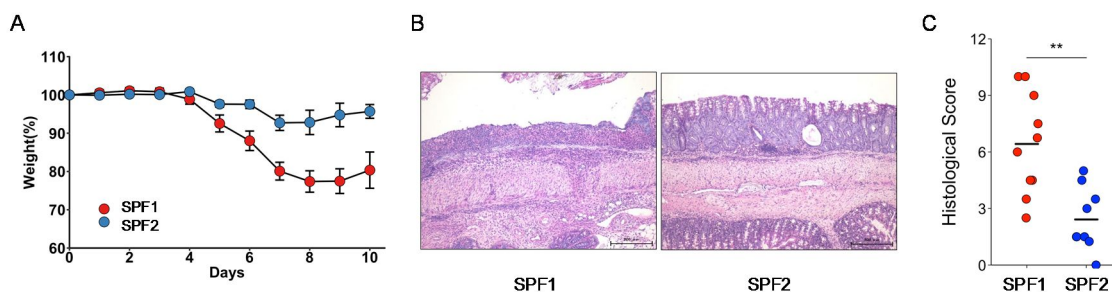


図1. SPF1 マウスと SPF2 マウスでは、DSS 誘導性大腸炎に対する感受性が異なる。

SPF1 または SPF2 マウスに 2% DSS を 5 日間投与し、大腸炎を誘導させた。

(A) 各マウス群の体重変化。(B) DSS 投与開始から 10 日目の各マウスの大腸組織の HE 染色像 (スケールバー; 200  $\mu$ l)。

(C) 大腸組織の HE 染色像の臨床スコア (\*\*:  $p < 0.01$ )。

DSS 投与後の体重低下が顕著に見られるようになった(図2)。そこで次に、SPF1 マウスと SPF2 マウスの腸内細菌叢を比較した。その結果、SPF1 マウスと SPF2 マウスは異なる腸内細菌組成を示し、SPF1 と SPF2 マウスの共飼育マウスはすべて SPF1 マウスの腸内細菌組成と類似していることが明らかとなった(図3)。さらに、SPF2 マウスの腸内には存在せず、SPF1 マウスおよび共飼育マウスの腸内に検出される腸内細菌として、ASV\_38、ASV\_44、ASV\_51、ASV\_75、ASV\_77、ASV\_108 が見出された。以上の結果から、腸炎を惹起する腸内細菌(候補責任細菌)が SPF1 マウスの腸内に存在すること、この候補責任細菌は腸炎感受性の低い SPF2 マウスに移行する可能性が示唆された。

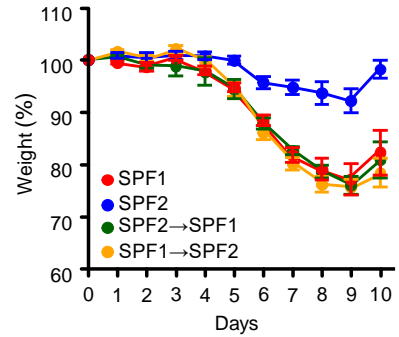


図2 . SPF1 および SPF2 マウスの共飼育により、SPF2 マウスは DSS 誘導性大腸炎に対して感受性を示す。SPF1 または SPF2 マウス、2 週間共飼育したマウスに 2%DSS を 5 日間投与し、各マウス群の体重変化を観察した。

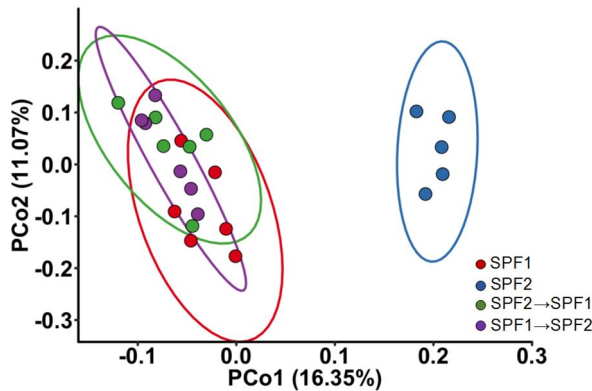


図3 . SPF1 および SPF2 マウスの共飼育により、SPF2 マウスは SPF1 マウスの腸内細菌叢に近づく。SPF1 または SPF2 マウス、2 週間共飼育したマウスの腸内細菌叢の主座標分析

さらに、ショットガンメタゲノムシーケンスおよびシングルセルゲノムシーケンスを行い、腸炎惹起に関わる腸内細菌およびその特異的遺伝子について引き続き解析を行っている。

IBD の発症や病態変化に腸内細菌が関与していることが示唆されているが、実際に特定の腸内細菌が腸炎を惹起しているのかについては未だ不明である。本研究では実験的腸炎の感受性を高める腸内細菌を絞り込むことができた。この腸炎惹起にかかわる腸内細菌由来の遺伝子の機能を同定できれば、腸内細菌が腸炎を引き起こす新たな作用メカニズムを明らかにすることができ、IBD の病因を理解する上で重要な知見が得られると期待している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件/うち国際共著 12件/うちオープンアクセス 12件）

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Kurashima Y, Kigoshi T, Murasaki S, Arai F, Shimada K, Seki N, Kim YG, Hase K, Ohno H, Kawano  | 4. 巻<br>12(1)       |
| 2. 論文標題<br>Pancreatic glycoprotein 2 is a first line of defense for mucosal protection in intestinal inflammation  | 5. 発行年<br>2021年     |
| 3. 雑誌名<br>Nat Commun.  | 6. 最初と最後の頁<br>1067  |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41467-021-21277-2   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する        |
| 1. 著者名<br>Seki N, Akiyama M, Yamakawa H, Hase K, Kumagai Y, Kim YG   | 4. 巻<br>46(2)       |
| 2. 論文標題<br>Adverse effects of methylmercury on gut bacteria and accelerated accumulation of mercury in organs due to disruption of gut microbiota        | 5. 発行年<br>2021年     |
| 3. 雑誌名<br>J Toxicol Sci  | 6. 最初と最後の頁<br>91-97 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2131/jts.46.91  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する        |
| 1. 著者名<br>Yakabe K, Uchiyama J, Akiyama M, Kim YG  | 4. 巻<br>13(2)       |
| 2. 論文標題<br>Understanding Host Immunity and the Gut Microbiota Inspires the New Development of Vaccines and Adjuvants                                     | 5. 発行年<br>2021年     |
| 3. 雑誌名<br>Pharmaceutics  | 6. 最初と最後の頁<br>163   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/pharmaceutics13020163  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する        |
| 1. 著者名<br>Kimizuka T., Seki N., Yamaguchi G., Akiyama M., Higashi S., Hase K., Kim Y.G.  | 4. 巻<br>13(6)       |
| 2. 論文標題<br>Amino acid-based diet prevents lethal infectious diarrhea by maintaining body water balance in a murine citrobacter rodentium infection model | 5. 発行年<br>2021年     |
| 3. 雑誌名<br>Nutrients  | 6. 最初と最後の頁<br>-     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/nu13061896   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する        |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Hattori K., Akiyama M., Seki N., Yakabe K., Hase K., Kim Y.G. | 4. 巻<br>13(6)   |
| 2. 論文標題<br>Gut microbiota prevents sugar alcohol-induced diarrhea       | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>Nutrients   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/nu13062029                          | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する    |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Sun X., Zheng W., Hua R., Liu Y., Wang L., Kim Y.G., Liu X., Mimuro H., Shen Z., Li L., Yoshida S. | 4. 巻<br>5(1)       |
| 2. 論文標題<br>Macropinocytosis and SARS-CoV-2 cell entry  | 5. 発行年<br>2021年    |
| 3. 雑誌名<br>Blood and Genomics   | 6. 最初と最後の頁<br>1-12 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する       |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Ejima R., Akiyama M., Sato H., Tomioka S., Yakabe K., Kimizuka T., Seki N., Fujimura Y., Hirayama A., Fukuda S., Hase K., Kim Y.G.                           | 4. 巻<br>13(8)   |
| 2. 論文標題<br>Seaweed dietary fiber sodium alginate suppresses the migration of colonic inflammatory monocytes and diet-induced metabolic syndrome via the gut microbiota | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>Nutrients  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/nu13082812   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する    |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Aoki R., Onuki M., Hattori K., Ito M., Yamada T., Kamikado K., Kim Y.G., Nakamoto N., Kimura I., Clarke J.M., Kanai T, Hase K. | 4. 巻<br>9(1)    |
| 2. 論文標題<br>Commensal microbe-derived acetate suppresses NAFLD/NASH development via hepatic FFAR2 signalling in mice                      | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>Microbiome   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1186/s40168-021-01125-7   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する    |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Li S., Yakabe K., Zai K., Liu Y., Kishimura A., Hase K., Kim Y.G., Mori T., Katayama Y.  | 4. 巻<br>9(21)             |
| 2. 論文標題<br>Specific adsorption of a $\beta$ -lactam antibiotic: In vivo by an anion-exchange resin for protection of the intestinal microbiota | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Biomaterials Science   | 6. 最初と最後の頁<br>7219 - 7227 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/d1bm00958c   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する              |

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Ishikawa D., Zhang X., Nomura K., Seki N., Haraikawa M., Haga K., Shibuya T., Kim Y.G., Nagahara A.   | 4. 巻<br>9            |
| 2. 論文標題<br>A randomized placebo-controlled trial of combination therapy with post-triple-antibiotic therapy fecal microbiota transplantation and alginate for ulcerative colitis (FLAG): protocol | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Front. Med.   | 6. 最初と最後の頁<br>779205 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fmed.2022.779205  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する         |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Uchiyama J., Akiyama M., Hase K., Kumagai Y., Kim Y.G.   | 4. 巻<br>38(10)       |
| 2. 論文標題<br>Gut Microbiota Reinforces Host Antioxidant Capacity via the Generation of Reactive Sulfur Species | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Cell Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>110479 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.celrep.2022.110479   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する         |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Akiyama M., Shinkai Y., Yamakawa H., Kim Y.G., Kumagai Y.  | 4. 巻<br>-            |
| 2. 論文標題<br>Potentiation of methylmercury toxicity by combined metal exposure: in vitro and in vivo models of a restricted metal exposome | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Chemosphere  | 6. 最初と最後の頁<br>134374 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.chemosphere.2022.134374  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する         |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 0件）

|                                 |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名<br>金 倫基                 |
| 2. 発表標題<br>腸内細菌の創薬応用            |
| 3. 学会等名<br>腸内デザイン学会（招待講演）（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2020年                 |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>金 倫基                       |
| 2. 発表標題<br>抗肥満作用を発揮する腸内細菌関連代謝物の探索     |
| 3. 学会等名<br>第20回日本抗加齢医学会総会（招待講演）（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2020年                       |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>金 倫基                      |
| 2. 発表標題<br>抗肥満作用を発揮する腸内細菌由来代謝物の探索    |
| 3. 学会等名<br>第32回微生物シンポジウム（招待講演）（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2020年                      |

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>金 倫基                  |
| 2. 発表標題<br>腸内細菌と肥満               |
| 3. 学会等名<br>第64回日本薬学会関東支部大会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2020年                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>金 倫基   |
| 2. 発表標題<br>腸内微生物を対象とした Live Biotherapeutic Productsの開発の現状 |
| 3. 学会等名<br>第23回日本臨床腸内微生物学会総会（招待講演）                        |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>金 倫基                           |
| 2. 発表標題<br>腸内細菌の宿主生理機能や疾患に与える影響           |
| 3. 学会等名<br>L0皮膚科学研究会（スカイクラブ）夏季プログラム（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2020年                           |

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>金 倫基                   |
| 2. 発表標題<br>抗肥満作用を発揮する腸内細菌由来代謝物の探索 |
| 3. 学会等名<br>第93回日本内分泌学会学術総会（招待講演）  |
| 4. 発表年<br>2020年                   |

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>金 倫基                    |
| 2. 発表標題<br>腸内環境制御によるサクセスフルエイジングの実現 |
| 3. 学会等名<br>第2回PAC国際シンポジウム（招待講演）    |
| 4. 発表年<br>2021年                    |



〔図書〕 計2件

|                                      |                 |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>矢加部 恭輔, 金 倫基               | 4. 発行年<br>2021年 |
| 2. 出版社<br>Medical Science Digest     | 5. 総ページ数<br>6   |
| 3. 書名<br>炎症性腸疾患をターゲットにした腸内細菌製剤の開発と現状 |                 |

|                              |                 |
|------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>山口 元輝, 秋山 雅博, 金 倫基 | 4. 発行年<br>2022年 |
| 2. 出版社<br>機能性食品と薬理栄養         | 5. 総ページ数<br>6   |
| 3. 書名<br>腸内細菌叢の変動因子と生活習慣病    |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

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