

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22881

研究課題名(和文)発酵食品の腸-内臓連関を介した糖代謝改善機構の解明-マルチオミクス解析を用いて-

研究課題名(英文) Mechanism of Improvement of Glucose Metabolism through Intestine-Gut Interaction of Fermented Foods

研究代表者

岡村 拓郎 (Okamura, Takuro)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：00885163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：食習慣の欧米化(脂質・ショ糖の過剰摂取)によって引き起こされる腸内細菌の乱れ(Dysbiosis)や内臓脂肪組織の慢性炎症は糖尿病の成因の一つである。本研究では欧米化食を模した高脂肪高ショ糖食を野生型マウスに投与し、発酵食品の代表として味噌を追加投与することで耐糖能障害を始めとした代謝障害の改善を明らかにしただけでなく、腸内では短鎖脂肪酸が増加し、腸内細菌叢解析では短鎖脂肪酸の生成に関与するAlloprevotella属を含むPrevotellaceae科やChristensenellaceae科が増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

欧米化している食習慣によるDysbiosisと内臓脂肪組織の慢性炎症、ならびにわが国の伝統的な発酵食によるDysbiosisの改善と抗炎症作用において、機構の中心となる腸内細菌・メタボライトをマルチオミクス解析により同定した。糖尿病発症予防の観点から日本の伝統的食文化としての和食の医学的価値を創造し、和食への回帰を医学的に提案することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Dysbiosis, a disorder of gut microbiota and chronic inflammation of visceral adipose tissue caused by Western diet (excessive intake of fat and sucrose), is one of the causes of diabetes mellitus. In this study, we not only demonstrated that administration of a high-fat, high-sucrose diet to wild-type mice mimicking a Western diet and additional administration of miso as a representative fermented food improved metabolic disorders including impaired glucose tolerance, but also that short-chain fatty acids increased in the intestine, and intestinal microflora analysis showed that the production of short-chain fatty acids was not affected by the administration of miso, which is involved in the production of Prevotellaceae and Christensenellaceae families, including Alloprevotella spp.

研究分野：栄養学

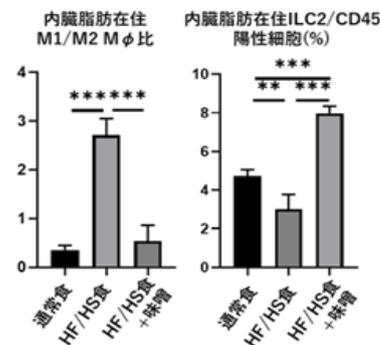
キーワード：発酵食品

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。

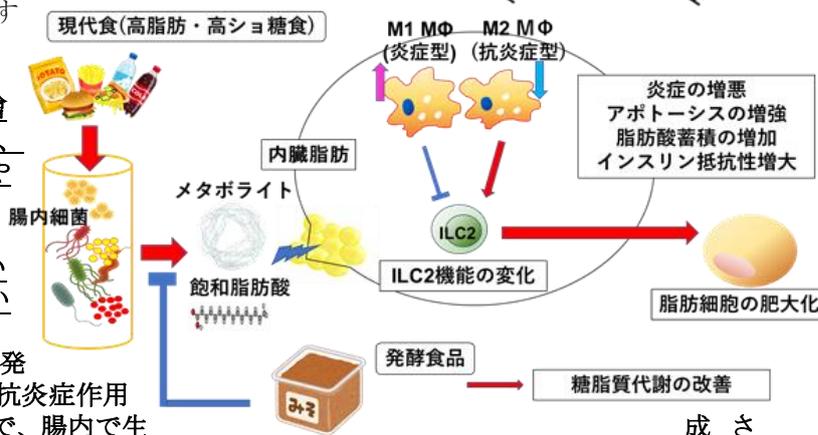
1. 研究開始当初の背景

【“腸—内臓脂肪連関”により発酵食品は抗炎症作用を発揮し糖脂質代謝を改善する】

内臓脂肪での慢性炎症に起因するインスリン抵抗性は2型糖尿病患者の基盤病態である。こうした抗原特異性の明らかでない慢性炎症においてはマクロファージ(Mφ)等が中心となる自然免疫が制御しているが、近年、自然リンパ球(Innate Lymphoid cell: ILC)が Mφ を制御する可能性が示唆されている(Moro et. al Nature.2010)。申請者の先行研究において、野生型マウスに高脂肪高シヨ糖食(HF/HS食)を給餌すると内臓脂肪内で炎症型の M1 Mφ が増加、抗炎症型の M2 Mφ・2型自然リンパ球(ILC2)が減少すること、さらに ILC2 の除去により慢性炎症が悪化するだけでなく内臓脂肪組織の飽和脂肪酸含有量が増加する知見を得た。



このように慢性炎症と代謝障害には連関がみられ、発酵食品は抗炎症作用を発揮し、健康長寿と関連すること知られているが、その機序は明らかでない。申請者は実際に代表的発酵食品である味噌を動物モデルに給餌することで、内臓脂肪組織において M2 Mφ や ILC2 のような抗炎症作用を有する細胞が増加することで(図)、糖尿病発症に抑制的に働いているという先行知見を得ている。



これらの学術的背景より、この発酵食品による内臓脂肪組織での抗炎症作用として、腸内環境を整えることで、腸内で生れる中間代謝産物(メタボライト)が炎症性から抗炎症性に切り替えられる機構=“腸—内臓脂肪連関”を想定し、この機序及びその中心となるメタボライトを包括的に明らかにするためにはマルチオミクス解析が有力であると考えた。

2. 研究の目的

発酵食品により増加する抗炎症作用の中心となる腸内細菌・メタボライトを同定する。同定した代謝産物を中心とした“腸—内臓脂肪連関”を明らかにする。

3. 研究の方法

研究計画 1. 発酵食品による抗炎症作用の中心となる腸内細菌・メタボライトの同定

先行試験により抗炎症作用が明確であった味噌(フンドーキン醤油株式会社、麦みそ)を発酵食品の代表として用いる。B6/J マウス(♂・8 週齢、各群 10 匹)に 12 週間高脂肪高シヨ糖食+味噌食を給仕し、以下の解析を実施することで、発酵食品による抗炎症作用の中心となる腸内細菌・メタボライトを同定する。

ショットガンメタゲノム解析：虫垂残便を新鮮凍結し、菌体ゲノムを凍結破碎抽出し、NGS にて測定する。得られたデータは KEGG Orthology を用いて腸内細菌の機能解析を行う。菌種の存在比率および予測機能の定量値について 2 群間で WAD 法(A weighted average difference method)により評価する。

リピドーム・メタボローム解析：味噌、虫垂内残留便、門脈血、肝臓、内臓脂肪の各検体を凍結粉碎後、糖質・有機酸の固相抽出(AISTI 社)・脂質抽出(ナカライテスク社)にて誘導体化処理後、GC/MS システム(Agilent7890B/5977B)を用いて解析する。得られた結果は Mass Profiler Professional にて Pathway 解析を実施、代謝マップに投影し、対照(慢性炎症状態)群で増加し味噌投与(抗炎症状態)群で減少したメタボライトを炎症性メタボライト、対照群で減少し味噌投与群で増加したメタボライトを抗炎症性メタボライトの候補として、変化の大きかったものを統計学的にランキングし、選定する。

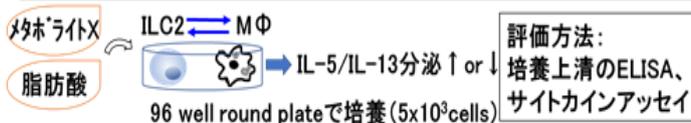
慢性炎症の評価：肝臓・内臓脂肪組織から total RNA を抽出し、Real time PCR により il6, tnf, ccl2, ccr2 の発現を定量評価する。さらに肝臓・内臓脂肪の浸潤単核球を抽出し、Multi-color Flow cytometry 法にて各免疫細胞の存在比率を評価する。

インスリン抵抗性評価：iPGTT により耐糖能を、ITT により全身性インスリン抵抗性を評価する。安定同位体標識グルコース投与とグルコースクランプ法により、肝・筋インスリン抵抗性を評価する。

研究計画2. 同定したメタボライトの免疫調節作用の解明 (ex vivo)

研究計画1のメタボローム解析におけるランキング上位の抗炎症性メタボライト候補を選定し、この免疫調節作用をそれぞれ検証する。内臓脂肪組織内の炎症を惹起する主要な物質であることが予想される脂肪酸を単独で内臓脂肪組織より採取した ILC2 及び Mφ に投与すると IL-5/IL-13 の分泌が障害されることを先行研究で明らかにしている。本申請では研究計画1で同定した抗炎症性メタボライト及び脂肪酸を同時に投与すると ILC2 の IL-5/IL-13 の産生が増加し、抗炎症作用が増強することを明らかにする。

研究計画1で明らかとしたメタボライトがマクロファージ・ILC2の相互作用を介してサイトカイン環境を改変する機序をex vivoにて明らかにする



4. 研究成果

4-1. 体重、握力および耐糖能評価

味噌(フンドーキン醤油株式会社、麦みそ)を発酵品の代表として用いる。B6/J マウス(雄・8 週齢、各群 10 匹)に 12 週間 12 週間、欧米化食を模した高脂肪高シヨ糖食(40%シヨ糖、40%脂質、20%タンパク質)±味噌(塩分濃度 0.9%で飲用水に溶解)を給仕した。20 週齢時の 2 群(対照群、味噌投与群)の B6/J マウスの間で有意な体重の差はなかったが、握力/体重比は味噌投与群で上昇し(図 1)、iPGTT および ITT で評価した耐糖能は味噌投与群で有意に改善していた(図 2)。

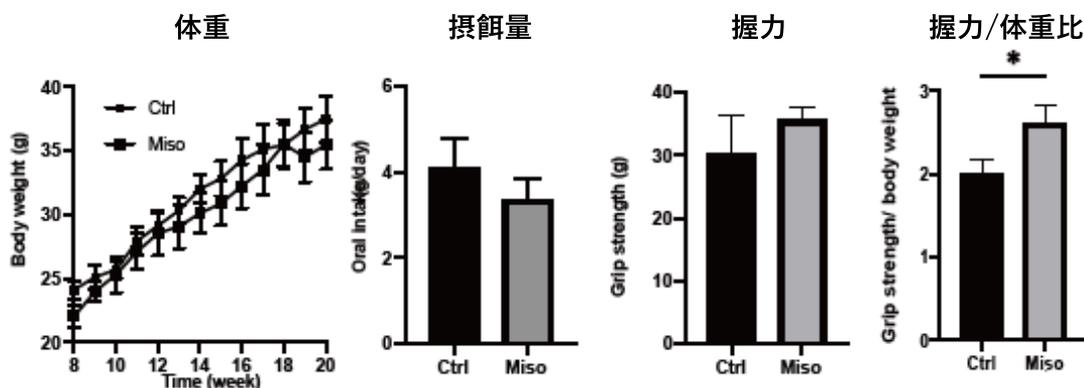


図 1. 味噌投与による体重、摂餌量(20 週齢時)、握力

Ctrl, 対照群; Miso, 味噌投与群. Mean±SD で表示。統計解析は t 検体で評価。

*, p<0.05.

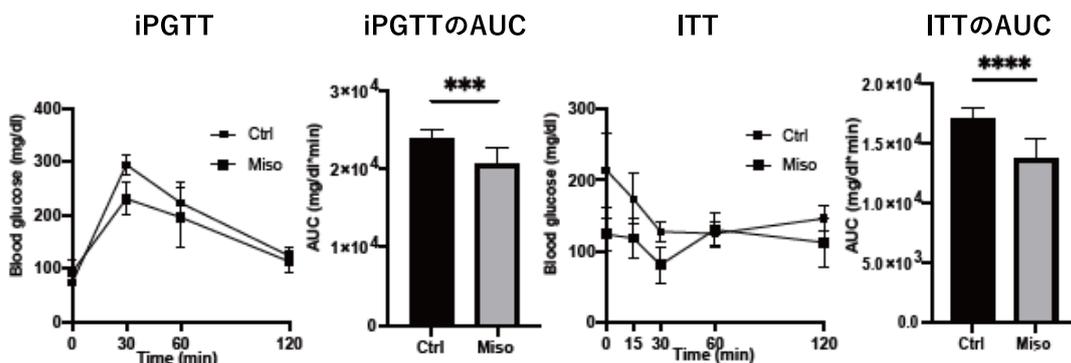


図 2. 耐糖能の評価

AUC, area under the curve; Ctrl, 対照群; iPGTT, 腹腔内グルコース負荷試験; ITT, インスリン負荷試験; Miso, 味噌投与群.

Mean±SD で表示。統計解析は t 検体で評価。

, p<0.001, *, p<0.0001.

4-2. 内臓脂肪量および骨格筋量

内臓脂肪量は精巣上体周囲脂肪、骨格筋量はヒラメ筋で評価した。味噌投与群では対照群と比較して精巣上体周囲脂肪重量とその体重比が有意に低く、ヒラメ筋重量とその体重比は有意に高かった(図 3)。

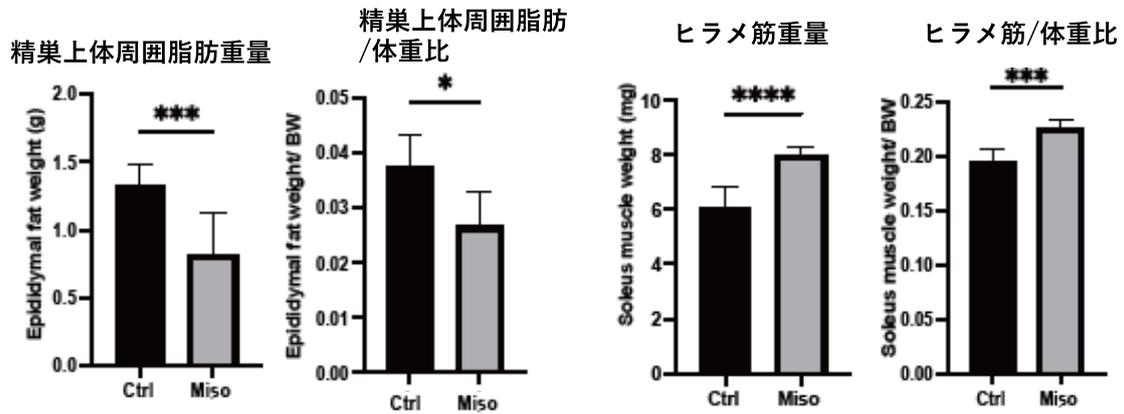


図 3. 内臓脂肪量および骨格筋量

Ctrl, 対照群; Miso, 味噌投与群. Mean±SD で表示。統計解析は t 検体で評価。

Mean±SD で表示。統計解析は t 検体で評価。
*, p<0.05; ***, p<0.001, ****, p<0.0001.

4-3. 腸内細菌叢解析

腸内細菌叢をショットガンメタゲノムシーケンスで調査した。LEfSe 解析において、味噌投与群において短鎖脂肪酸の生成に関わる *Alloprevotella* 属を含む *Prevotellaceae* 科や *Christensenellaceae* 科が増加していた(図 4)。

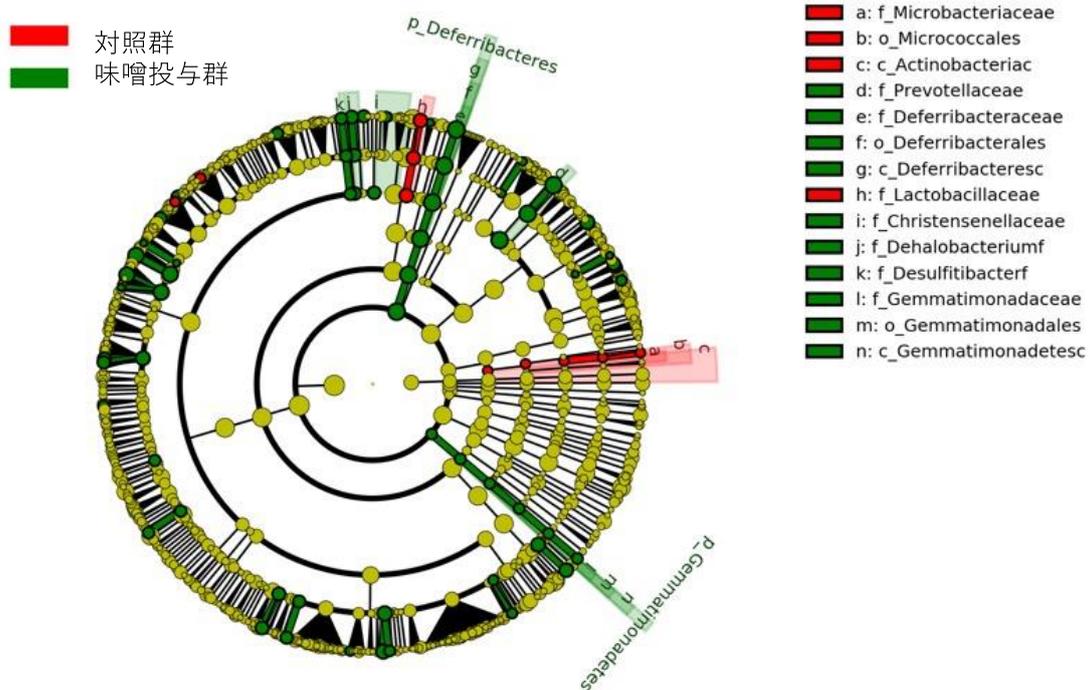


図 4. 腸内細菌叢解析

LEfSe 解析による Cladogram

4-4. メタボローム解析

味噌投与群で有意な便、血液、骨格筋中の酢酸、プロピオン酸、酪酸のような短鎖脂肪酸濃度の上昇を認めた一方で、血液、筋肉中のパルミチン酸濃度は低下し、反対に便中へのパルミチン酸排泄は上昇した(図 5)。

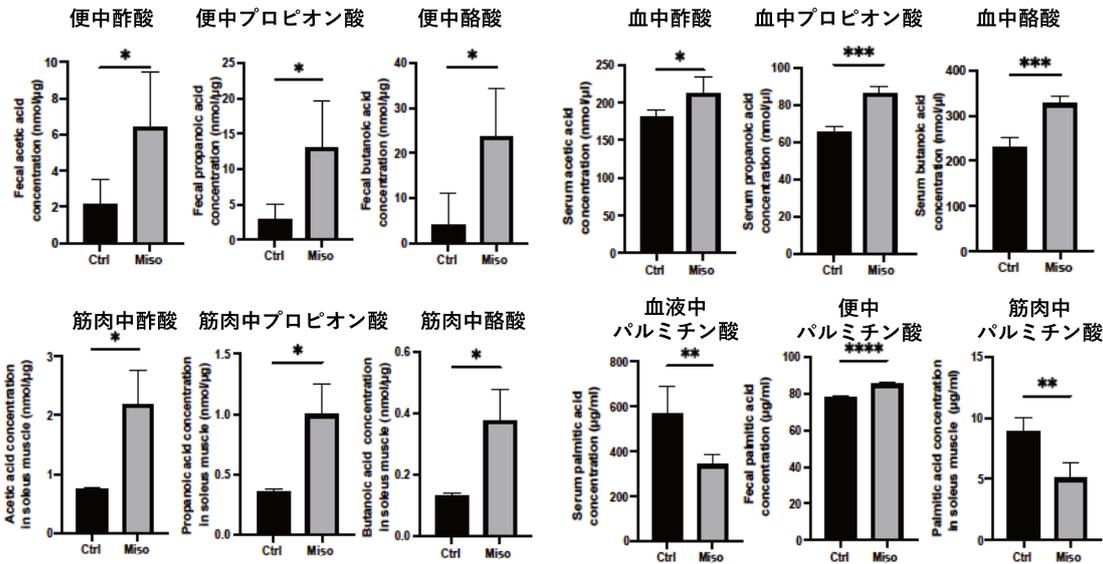


図5. メタボローム解析

Ctrl, 対照群; Miso, 味噌投与群. Mean±SD で表示. 統計解析は t 検体で評価. Mean±SD で表示. 統計解析は t 検体で評価.

*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001, ****, p<0.0001.

4-5. 小腸内の慢性炎症評価

味噌投与群で小腸粘膜固有層の炎症細胞(1型自然リンパ球, M1マクロファージ, NK細胞)が減少, 抗炎症細胞(3型自然リンパ球, M2マクロファージ)が増加した. さらに骨格筋および小腸の real time PCR では骨格筋の筋萎縮関連遺伝子(*Trim63*, *Fbxo32*), 炎症関連遺伝子(*Tnfa*)の発現は味噌投与群で減少し, 小腸の飽和脂肪酸トランスポーターである *Cd36* の遺伝子発現が有意に低下し, ムチン層の肥厚化に関与し, 腸管免疫を高めるサイトカインである *Il22* の発現は上昇, *Tnfa* の発現は低下した

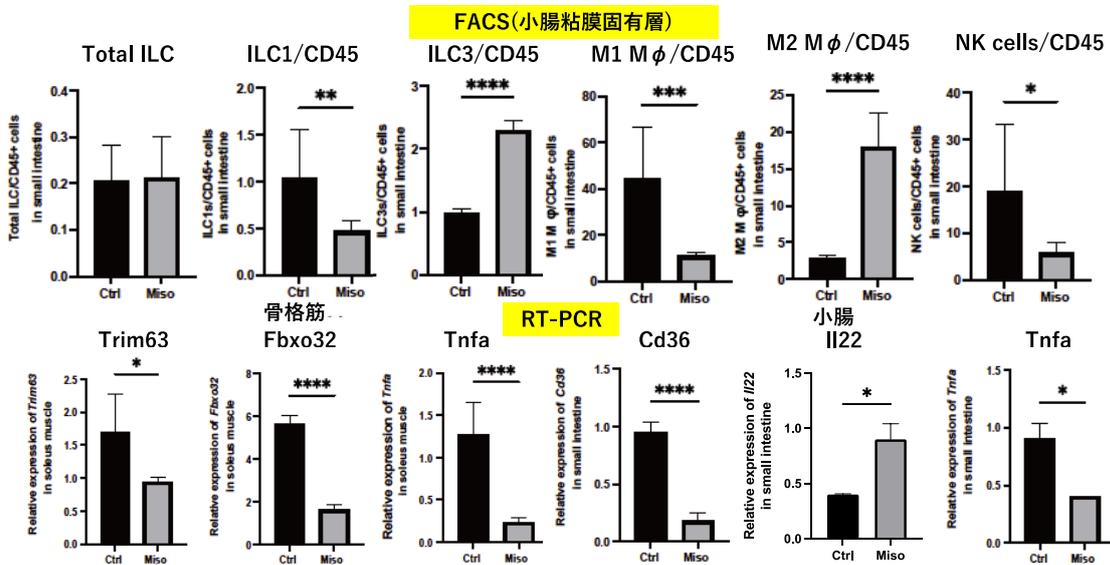


図6. 小腸および骨格筋内の慢性炎症評価

Ctrl, 対照群; Miso, 味噌投与群. Mean±SD で表示. 統計解析は t 検体で評価. Mean±SD で表示. 統計解析は t 検体で評価.

*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001, ****, p<0.0001.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡村 拓郎
2. 発表標題 型自然リンパ球は内臓脂肪内のベージュ化を介して耐糖能障害を抑制する
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
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
---------	---------