

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14808

研究課題名（和文）欧米化食によるDysbiosisを発酵食品が改善するメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism by which fermented foods improve dysbiosis induced by Western diet

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本申請では、日本伝統の発酵食品に着目し、食習慣の欧米化により誘発されたDysbiosisを発酵食品摂取が改善するメカニズムをマルチオミクス解析により解明することを目的とした。B6/Jマウスに12週間、高脂肪高ショ糖食±味噌食を給仕し、20週齢時に種々の解析を実施した。両群間で体重に有意な差はなかったが、味噌投与群で耐糖能は有意に改善し、有意な便および血液中の短鎖脂肪酸濃度の上昇を認めた。さらに、味噌投与群で小腸粘膜固有層の炎症細胞が減少、抗炎症細胞が増加した。最後に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ところ、短鎖脂肪酸産生菌が味噌投与群で増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では味噌の投与により、欧米化食によるDysbiosisを改善し、耐糖能障害や脂質異常症を改善した。わが国の伝統的な発酵食品を摂取することでDysbiosisを改善し、糖尿病発症を予防、血糖値を改善することを科学的に証明したことで、日本の伝統的食文化としての和食への回帰を提案することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：In this application, we focused on traditional Japanese fermented foods and aimed to elucidate the mechanism by which fermented food intake ameliorates dysbiosis induced by Westernization of eating habits through multi-omics analysis. B6/J mice were fed a high-fat, high-sucrose diet ± miso diet for 12 weeks, and various analyses were conducted at 20 weeks of age. Although there was no significant difference in body weight between the two groups, glucose tolerance was significantly improved in the miso-treated group, and significant increases in fecal and blood short-chain fatty acid levels were observed. Furthermore, inflammatory cells in the mucosal lining of the small intestine decreased and anti-inflammatory cells increased in the miso-treated group. Finally, shotgun metagenomic sequencing of the intestinal microbiota revealed an increase in short-chain fatty acid-producing bacteria in the miso-treated group.

研究分野：内分泌代謝内科学

キーワード：発酵食品 マルチオミクス dysbiosis

1. 研究開始当初の背景

A. 食習慣の欧米化が Dysbiosis を引き起こす

欧米化食に代表される高脂肪高シヨ糖食や抗生物質などが原因で腸内細菌叢の乱れ (Dysbiosis) が生じることが知られている。安定している腸内細菌叢からは短鎖脂肪酸が産生され正常な腸管粘膜機能を維持しているが、Dysbiosis をきたすと短鎖脂肪酸の産生が減少し、短鎖脂肪酸を含む腸内代謝産物(メタボライト)の変化が、タイトジャンクションを破綻させ腸管上皮細胞を障害することにより、本来は腸管粘膜を通過しない未消化栄養素、腸内細菌代謝産物や菌体由来成分、さらには細菌自体が腸管粘膜を通過し、炎症を起こすことが知られている (PLoS One. 2019;14:e0218384)。さらに、申請者らは Dysbiosis に伴い血中及び肝臓内の飽和脂肪酸含有量が増加し、便中の飽和脂肪酸含有量が減っていること、腸管粘膜固有層に炎症細胞が増えることで飽和脂肪酸トランスポーターである CD36 mRNA の発現が上昇することを先行研究において明らかにしている。

B. 発酵食品による Dysbiosis 改善の可能性(動物実験による先行知見)

一方、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が知られているが、その機序は明らかでない。その中で、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と、Dysbiosis が改善し、血中及び肝臓内の飽和脂肪酸含有量が低下したのに対し、便中の飽和脂肪酸含有量は増加し、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(右図)。これらの学術的背景より、Dysbiosis が糖尿病を発症させるメカニズムとして、Dysbiosis により腸管での飽和脂肪酸の吸収が促進、排泄が低下する、一方、発酵食品が Dysbiosis を改善し腸管での飽和脂肪酸の排泄を促進することで、糖尿病発症に抑制的に働いていると考えた。そこで、本申請では食習慣の欧米化により生じている Dysbiosis およびそれに伴う腸管での飽和脂肪酸の吸収が促進、排泄が低下する機序および発酵食品がこの機序を改善するメカニズムを解明するべく、腸内細菌叢の変化及びそれに伴うメタボライトの候補を探索するとともに、腸管での飽和脂肪酸の吸収におけるそれらの役割を明らかにする。

2. 研究の目的

食習慣の欧米化により増加している Dysbiosis を発酵食品が改善する際に中心となる腸内細菌・メタボライトを同定するとともに、腸管での飽和脂肪酸の吸収への関与を明らかにする。

3. 研究の方法

発酵食品による Dysbiosis 改善作用とそ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(X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 Dysbiosis 改善時に変化した腸内細菌叢および腸管上皮細胞で変化した遺伝子と Dysbiosis 改善作用の中心となるメタボライトを同定する。

タイトジャンクション破綻の確認：10%ホルマリン固定した空腸検体を Occludin や Claudin(膜貫通型タンパク質)、Zonula occludens(細胞内裏打ちタンパク質)の抗体を用いて免疫染色を実施し、それらの発現低下に起因したバリア機能の低下を確認する。

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。

腸内細菌叢解析：虫垂残便を新鮮凍結し、菌体ゲノムを凍結破砕抽出し、ショットガンメタゲノム解析にて腸内細菌叢を解析する。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。味噌投与によって増加した菌叢を善玉腸内細菌と同定する。

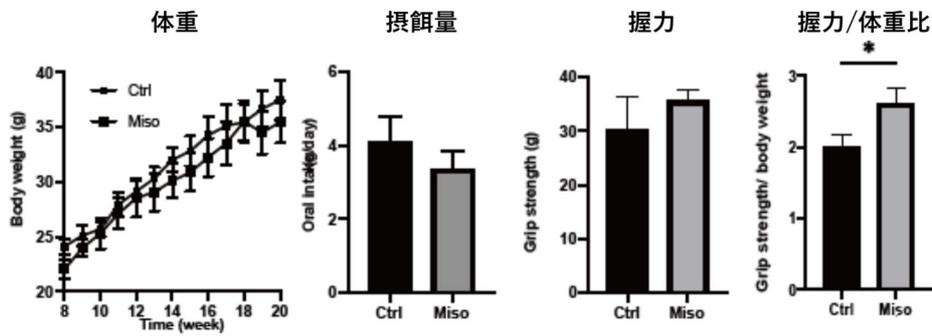
トランスクリプトーム解析：空腸、虫垂及び直腸から total RNA を抽出し、味噌投与による腸上皮細胞の遺伝子改変を網羅的に解析する。

メタボローム解析：凍結粉砕された虫垂内残留便、肝臓(15mg)及び門脈血(50μL)の各検体を、糖質・有機酸・短鎖脂肪酸・胆汁酸の固相抽出(AISTI社)にて誘導体化处理後、GC/MSシステム(Agilent7000)を用いて解析する。

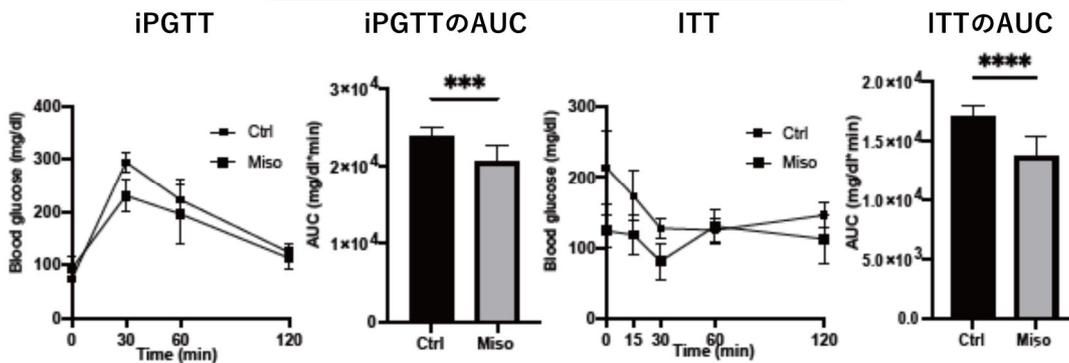
4. 研究成果

4-1. 体重、握力および耐糖能評価

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、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1)。



両群間で体重に有意な差はなかったが、握力/体重比は味噌投与群で有意に高値であった。

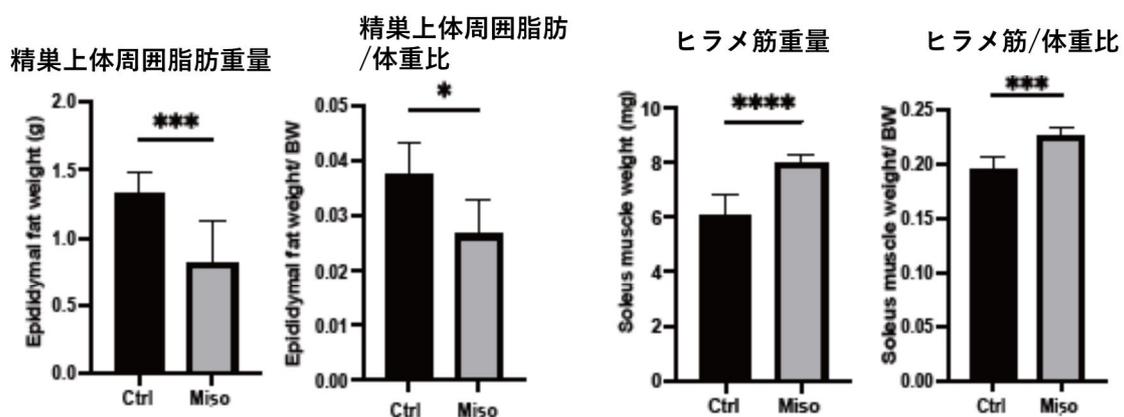


味噌投与群で耐糖能は有意に改善した。

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2)。

図2

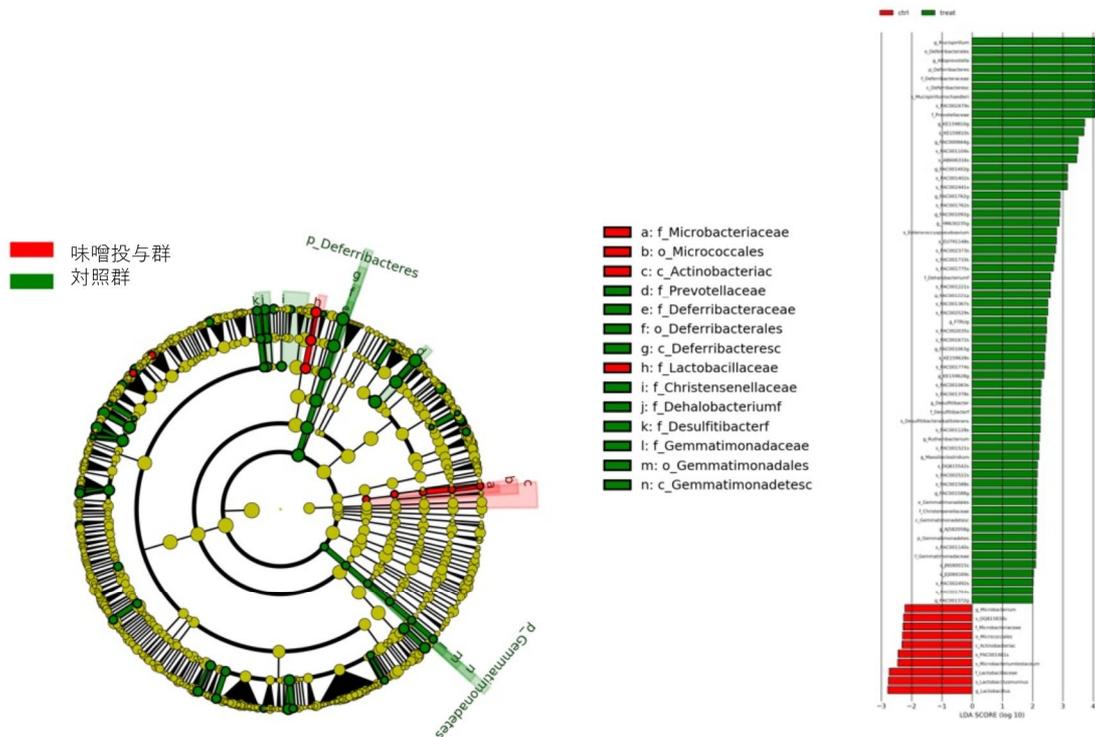


味噌投与群で有意な内臓脂肪量の減少、ヒラメ筋重量の増加を認めた。

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Lactobacillus属、Lactobacillus murinus種、Lactobacillaceae科が増加していた(図3)。

図 3

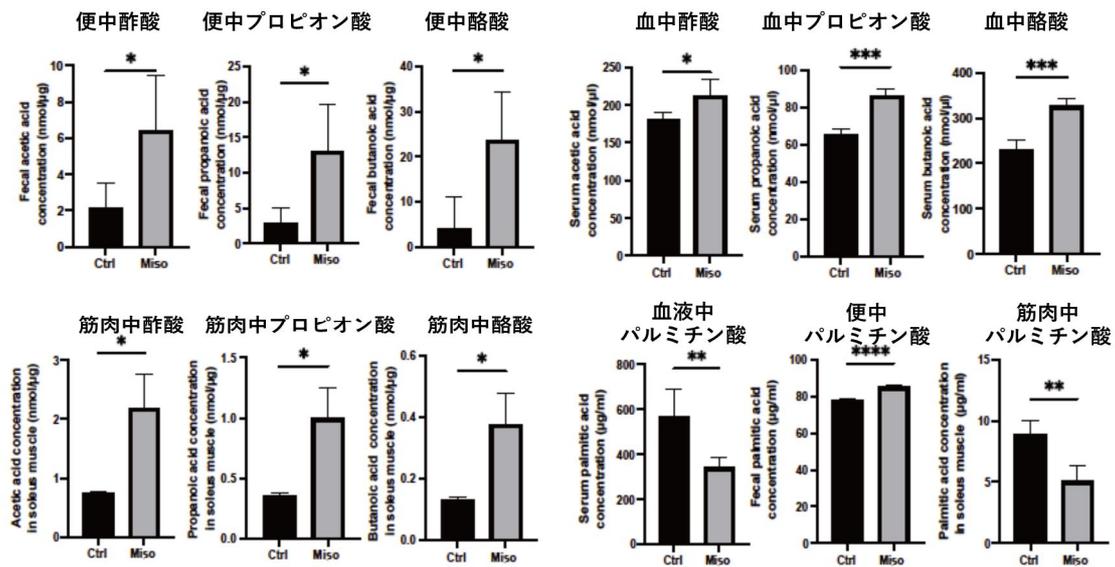


味噌投与により腸内細菌叢が変化した。

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と一方で、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 4)。

図 4



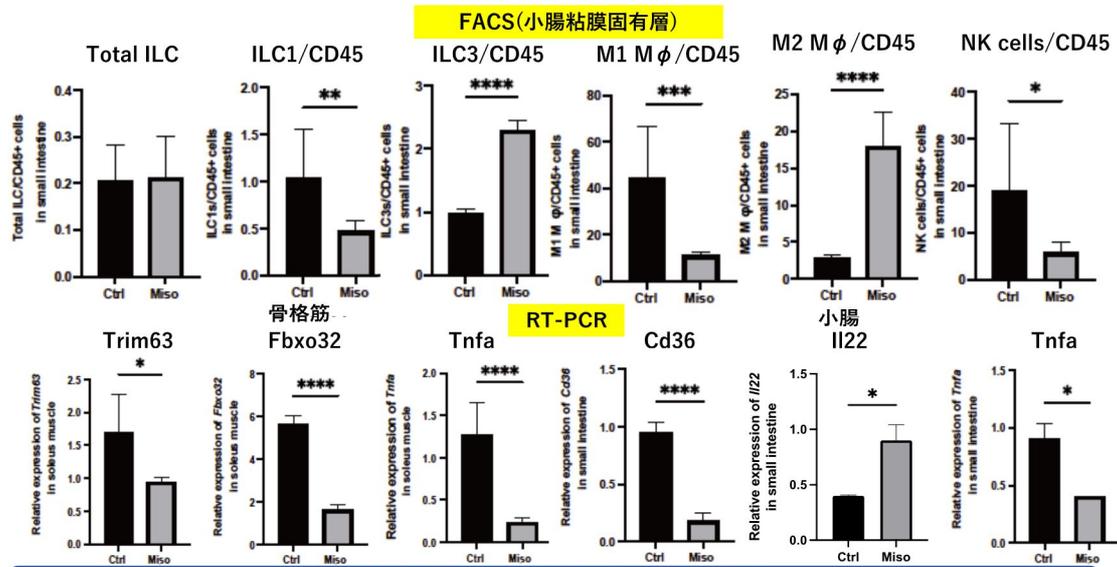
味噌投与群で有意な便、血液、骨格筋中の短鎖脂肪酸濃度の上昇を認めたと一方で、血液、筋肉中のパルミチン酸濃度は低下し、反対に便中へのパルミチン酸排泄は上昇した。

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 I122 の発現は上昇、Tnfa の発現は低下した(図 5)。

図 5



味噌投与群で小腸粘膜固有層の炎症細胞が減少、抗炎症細胞が増加し、小腸粘膜固有層の炎症細胞が減少、抗炎症細胞が増加した。

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、高橋芙由子、橋本善隆、間嶋紗織、千丸貴史、牛込恵美、中西尚子、浅野麻衣、濱口真英、山崎真裕、福井道明
2. 発表標題 発酵食品による耐糖能障害改善に起因するサルコペニア予防機構の解明
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------