様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　５　月　１２　日現在

機関番号：　１４５０１
研究種目：　基盤研究(C)　(一般)
研究期間：　2014～2016
課題番号：　２６３５０９６０

研究課題名（和文）高脂肪食摂取が腸疾患に与える影響における腸内細菌と腸内代謝物の関与の検証

研究課題名（英文）Role of intestinal flora and its related metabolites in influences of high-fat diet on intestinal diseases

研究代表者
西海　信（NISHIUMI, SHIN）

神戸大学・医学研究科・特命准教授

研究者番号：２０５１４７０６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、高脂肪食の継続摂取が、腸管腫瘍、あるいは、炎症性腸疾患に影響を及ぼすのか否か、そして、その原因となる腸内細菌由来代謝物候補をメタボロミクスにより同定することを目的とした。その結果、脂肪含量の多さが腸疾患の発症に影響を与えるというよりは、脂肪の質が大きく影響する可能性を示唆できた。さらに、アミノ酸の一種であるサルコシンが、腸管腫瘍発生に寄与する腸内細菌由来代謝物候補のひとつである可能性を明らかにできた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate whether the successive intake of high-fat diet affects the pathogenesis of intestinal tumor and inflammatory bowel disease, and to find the candidates of intestinal flora-related metabolites that contribute to the pathogenesis of intestinal tumor and inflammatory bowel disease. As a result, I could suggest the possibility that quality of the fat affects the pathogenesis more greatly than quantity of the fat. In addition, I could clarify the possibility that sarcosine, which is one of amino acids, is one of the candidates of intestinal flora-related metabolites that contribute to the pathogenesis of intestinal tumor.

研究分野：　メタボロミクス

キーワード：　高脂肪食　メタボロミクス　代謝物　腸管腫瘍　腸炎　腸内細菌

１．研究開始当初の背景

腸管疾患である大腸がんや炎症性腸疾患は、その発症要因のひとつが環境因子の変化とされており、日本でも、近年、高脂肪食や高カロリー食といった食生活の欧米化が進んでいることから、その結果として、これらの患者数が増加してきた可能性が疑われている（Giovannucci et al., Cancer Res 1994 etc)。また、最近では、脂肪含量の多い食事の摂取が、腸内細菌叢に影響を与えることを示す報告がなされており（Turnbaugh et al., Nature 2006 etc)、肥満の人の腸内細菌をマウスの腸に移植することで、そのマウスも太りやすくなるという、肥満と腸内細菌叢との直接的な関連性も明らかにされた（Ridaura et al., Science 2013)。腸内細菌は、宿主腸内に共生しているが、様々な分子を菌外に分泌し、宿主に影響を与える。例えば、ビタミンB群など栄養学的に有用成分を産生するビフィズス菌や、酢酸、プロピオン酸、酪酸など大腸上皮細胞の栄養となる短鎖脂肪酸を分泌する腸内細菌などが存在する。一方で、宿主に対して有害な分子が腸内細菌によって産生される場合も存在し、発がん物質として注目されている二次胆汁酸などが挙げられる。これらの結果から、研究代表者は、高脂肪食を摂取することで、腸内細菌叢の変化が起こり、その結果として、腸内代謝物環境が変わり、ある代謝物が刺激となって、大腸がんの initiation や promotion に、あるいは、腸炎の発症や増悪につながるのではないかと考えた。

研究代表者はこれまで、メタボロミクス研究を中心に様々な研究を進めてきた。メタボロミクスとは、低分子代謝物を網羅的に解析する技術であり、ヒトゲノム塩基配列の完全解読が宣言された後、ポストゲノム研究としてタンパク質研究とともに、代謝物研究の重要性が認識されつつある。メタボロミクスで解析対象となる低分子代謝物（メタボローム）は、遺伝子の総体であるゲノムやタンパク質の総体であるプロテオームと比較して、酵素の変動が生じて初めて変化し、タンパク質の活性に依存することから、生体の表現形に近い変動を示すことや、種差がないため小動物実験系の結果をヒト臨床研究に外挿しやすいなどの利点が挙げられる。これらのことから、メタボロミクスは疾患を含めた生体の様々な状態をより詳細に表現できると考えた。実際に、近年、様々な疾患の発症により低分子代謝物が変動することが証明されつつあり（Hirayama et al., Cancer Res 2009; Sreekumar et al., Nature 2009 etc)、研究代表者も、血中代謝物の変動により、大腸がんや膵臓がんなどを早期の段階で識別できる可能性を明らかにした。

研究代表者はまた、メタボロミクス研究とは別に、消化器疾患の発症機構に関する研究も行ってきた。消化管感染症を含めた消化器疾患は、遺伝的素因のみならず、食事的要因や環境的要因により発症し、日常的に遭遇する可能性のある疾患が多い。研究代表者らはこれまでに、Helicobacter pylori 感染において、H. pylori の病原因子である CagA（Odenbreit et al., Science 2000）が樹状細胞の機能を低下させることで、宿主の免疫応答を抑制するということや、病原性大腸菌である Citrobacter rodentium 感染において、その宿主における C. rodentium の排除には、抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞が産生する IFN-γが必須であり、逆に、IL-4 は必要でないことを分子生物学的、ならびに、免疫学的検討により明らかにした。また、人畜感染症菌の一つとされている Helicobacter heilmannii 感染により誘発される胃悪性リンパ腫の発症には IFN-γが必須であることや、生体防御機構としての H. heilmannii 排除には、FcRn と呼ばれる IgG 制御に重要な因子が必要であることも証明した。さらに、APC 遺伝子変異に基づいた大腸がん発症抑制に、AP1B が重要な役割を担っていることも明らかにした。

このようなメタボロミクス研究の実績と消化器疾患研究の実績から、研究代表者は、消化器疾患に対して、メタボロミクスを用いて更なる検討を実施し、これまでの蓄積されてきた知見と統合させることで、新たな発見が得られるのはないかと考えた。そこで、食の欧米化と大腸がんや腸炎との関連性、肥満と腸内細菌叢との関係性、宿主と腸内細菌とのクロストークという、注目されている課題に対し、メタボロミクスを組み込むことはできないかと考え、本研究を立案した。

２．研究の目的

近年における大腸がんや炎症性腸疾患患者数の増加の要因の一つとして、高脂肪食や高カロリー食といった食生活の欧米化が疑われている。また、脂肪含量の多い食事摂取は、腸内細菌叢に影響を与えることも明らかにされつつある。腸内細菌は、腸内に様々な分子を分泌することから、研究代表者は、高脂肪食を摂取することで、腸内細菌叢の変化が起こり、その結果として、腸内代謝物環境が変わり、大腸がんや炎症性腸疾患の発症や増悪につながるのではないかと着想した。そこで、高脂肪食摂取が腸管腫瘍や炎症性腸疾患に及ぼす影響の原因となる腸内細菌由来代謝物をメタボロミクスにより同定し、その作用機序を明らかにすることを研究の目的とした。

３．研究の方法

（１）高脂肪食が腸管腫瘍発生に及ぼす影響の検討

本項目では、大腸がんモデルとして広く使用されている APCmin/+マウスを用いて実験を実施した。

具体的には、APCmin/+マウスに、高脂肪食

を摂取させ、一定期間ごとにマウス解剖を実施し、組織病理学的、分子生物学的、生化学的評価を行った。そして、通常食を摂取したAPCmin/+マウスとの比較に基づき、高脂肪食の摂取により、腸管腫瘍発生の程度が増悪されるのか否かを検討した。さらに、飼育期間中に回収した糞便、あるいは、解剖時に回収した大腸内容物から遺伝子の抽出を行い、腸内細菌叢の変化を検討した。なお、腸内細菌解析に関しては、次世代シークエンサーにより実施した。また、糞便や大腸内容物から水溶性代謝物や脂溶性代謝物を抽出し、続けて、代謝物分析を実施した。アミノ酸、有機酸、脂肪酸の分析にはガスクロマトグラフ四重極型質量分析計（GC-MS）を、脂質分子とカチオン系分子の分析には液体クロマトグラフトリプル四重極型質量分析計（LC-QqQMS）を、そして、アニオン系分子の分析にはイオンペア試薬と LC-QqQMS とを組み合わせたシステムを使用した。これらの結果から、腸内細菌叢と代謝物に基づく腸内環境が、高脂肪食を摂取することでどのように変化し、そして、腸管腫瘍に対し、どのような影響を与えるのかを検証した。

（２）高脂肪食が炎症性腸疾患発症に及ぼす影響の検討

本項目では、炎症性腸疾患モデルとして広く使用されているデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発性潰瘍性大腸炎モデル（下痢や血便症状、大腸の組織形態学的特徴など、ヒトの潰瘍性大腸炎に類似した症状を誘発）と IL-10 遺伝子欠損マウスクローン病モデル（Th1 型免疫応答や断続的な貫壁性炎症などクローン病様病変を呈する）とを用いて実験を実施した。

具体的には、DSS 投与マウス、あるいは、IL-10 遺伝子欠損マウスに、高脂肪食を摂取させ、一定期間ごとにマウス解剖を実施し、通常食を摂取した各種マウスとの比較に基づき、高脂肪食の摂取により、腸炎の発症の程度が増悪されるのか否かを、組織病理学的、分子生物学的、生化学的評価により検討した。

（３）腸管腫瘍発生や腸炎に寄与する腸内細菌由来代謝物の同定

（１）と（２）の実験結果に基づいて、高脂肪食の摂取により、大腸内容物中レベルが増加した代謝物を、APCmin/+マウス、DSS 投与マウス、IL-10 遺伝子欠損マウスに投与し、腸管腫瘍発生率や腸炎発症の程度の評価を行い、腸管腫瘍発生や腸炎に寄与する代謝物候補について検討した。

## ４．研究成果

（１）高脂肪食が腸管腫瘍発生に及ぼす影響の検討

APCmin/+マウス、あるいは、その野生型対照マウスに、高脂肪食、あるいは、対照通常食を一定期間摂取させ、続けて、マウス解剖を実施した。続けて、小腸、ならびに、大腸を摘出し、小腸、あるいは、大腸に発生したポリープ数の計測を行った（図 1）。

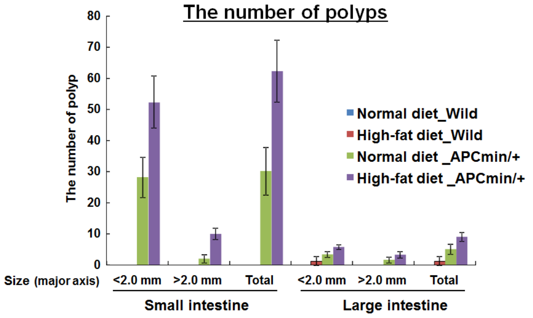

図1　小腸、ならびに、大腸に発生したポリープ数

その結果、APCmin/+マウスにおいて、小腸、大腸ともに、高脂肪食を摂取することで、ポリープ数が増加することが確認できた。また、野生型対照マウスにおいて、通常対照食を摂取しても、ポリープ数の発生は観察できなかったが、高脂肪食を摂取した野生型対照マウスのうち数匹で、ポリープの発生が確認できた。

次に、各マウスの糞便を用いて、腸内細菌叢解析を実施した。その結果、APCmin/+マウスとその野生型対照マウスいずれにおいても、高脂肪食を摂取することで、クロストリジウム属細菌が有意に増加すること、また、ラクトバチルス属細菌が減少する傾向があることが確認できた。また、APCmin/+マウスとその野生型対照マウスとの間で、腸内細菌叢の違いは見られなかった。

（２）高脂肪食が炎症性腸疾患発症に及ぼす影響の検討

IL-10 遺伝子欠損マウスに、大豆油由来の高脂肪食、あるいは、ラード由来の高脂肪食、そして、それぞれの対照通常食を長期間摂取させ、腸炎発症に関わる因子の分析を行った。なお、本実験に先立ち、大豆油由来の高脂肪食、あるいは、ラード由来の高脂肪食、そして、それぞれの対照通常食中の脂肪酸含量を分析した結果、大豆油由来の餌には、多価不飽和脂肪酸が多く含まれており、特に、n-6 脂肪酸の量が多かった。一方、ラード由来の高脂肪食は、飽和脂肪酸や１価不飽和脂肪酸の量が多かった。

はじめに、IL10 遺伝子欠損マウスの結腸、ならびに、直腸のサイトカイン発現について検討した。TNFαに関しては（図 2）、結腸において、ラード由来高脂肪食で高発現が観察された。大豆油由来高脂肪食とラード由来高脂肪食とを比較解析した結果、結腸と直腸、いずれにおいても、大豆油由来高脂肪食摂取における TNFαの発現量は低レベルであった。次に、TGFβの発現量について検討した。TGFβに関しては、結腸と直腸とで逆の結果となり、結腸では、大豆由来高脂肪食が、直腸で

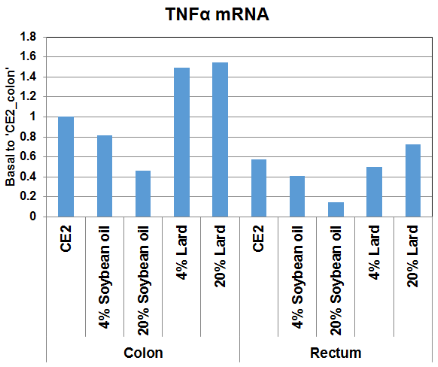


図2　IL10遺伝子欠損マウスの結腸、ならびに、直腸のTNFα発現

は、ラード由来高脂肪食が、TGFβの高発現を誘導した。IL17a の発現量に関しては、結腸と直腸ともに、ラード由来高脂肪食を摂取した場合のみ高値を示した。一方、Foxp3 については、結腸では、大豆油由来高脂肪食とラード由来高脂肪食との間で大きな差は確認できなかったが、直腸では、ラード由来高脂肪食で高値を示した。マウス体重の推移に関しても、大豆油由来の餌を摂取していた群では、その摂取期間に従って増加していたが、ラード由来の餌については、摂取後半で、体重増加が止まる、あるいは、体重の減少が観察されたことから、脂肪含量の多さが腸炎の発症に影響するというよりは、脂肪の質が大きく影響する可能性が示唆された。

続いて、C57BL/6J マウスに、大豆油由来の高脂肪食、あるいは、ラード由来の高脂肪食、そして、それぞれの対照通常食を1週間摂取させ、続けて、DSS を自由摂取させることで腸炎を発症させて、その発症に関わる因子の分析を行った。DSS の実験では、結腸と直腸を含めた全大腸部位を併せて組織の回収を行い、腸炎関連因子の分析を行った。TNFα の発現量に関しては、IL-10 遺伝子欠損マウスの場合と同様に、ラード由来の高脂肪食を摂取することで、その高発現が観察された。TGFβの場合も同様に、ラード由来の高脂肪食を摂取することによる高発現が確認できた。IL17a の発現量に関しても、ラード由来高脂肪食の摂取による高発現が観察された。一方、MCP1 については、大豆油由来高脂肪食摂取による発現量の増加が確認できた。

IL-10 遺伝子欠損マウス、ならびに、DSS 誘発性腸炎マウスの結果から、やはり、脂肪含量の多さが腸炎の発症に影響するというよりは、脂肪の質が大きく影響する可能性が示唆され、さらに、動物性油脂であるラード中に存在するなんらかの脂質が腸炎発症に、特に、影響を与える可能性を確認できた。

（3）腸管腫瘍発生や腸炎に寄与する腸内細菌由来代謝物の同定

腸管腫瘍発生に寄与する腸内細菌由来代謝物を同定する目的として、APCmin/+マウス、あるいは、その野生型対照マウスに、高脂肪食、あるいは、対照通常食を一定期間摂取させ、続けて、糞便中、ならびに、大腸内容物中の代謝物分析を実施した。その結果、APCmin/+マウスと、その野生型対照マウスとの間で、糞便中、ならびに、大腸内容物中代謝物において、大きな違いは見られなかった。一方、いずれのマウスにおいても、高脂肪食を摂取することで、糞便中、ならびに、大腸内容物中代謝物の特徴的な変動が確認できた。例えば、高脂肪食摂取により、食事由来と思われるラウリル酸の糞便中、ならびに、大腸内容物中レベルの増加が確認できた。一方、腸内細菌叢由来と思われるコハク酸やリンゴ酸といった有機酸レベルの減少も確認できた。さらに、高脂肪食摂取におけるサルコシンの大腸内容物中レベルの増加が観察された。そこで、APCmin/+マウスにサルコシンを含む水を自由摂取させ、サルコシンが腸管腫瘍発生に及ぼす影響を検討した。まず、体重の推移に関しては、サルコシン摂取による増加傾向が確認できた。続いて、小腸、ならびに、大腸におけるポリープ発生数について検討した。その結果、APCmin/+マウスがサルコシンを含む水を継続摂取することで、ポリープ数の増加する可能性を示す結果を得ることができた。

サルコシンは、これまでの他施設の研究により、前立腺がんの転移・浸潤に悪影響を与える可能性が指摘されており、さらに、我々の研究においても、ヒト大腸がん細胞株の細胞増殖を亢進する可能性を明らかにしている。本研究では、このサルコシンレベルの変動が、高脂肪食摂取による腸内細菌叢の変化に起因するものなのか否かついては明らかにできていないものの、腸内細菌叢によるサルコシンの合成は、過去の文献により明らかにされていることから、サルコシンが腸管腫瘍発生に寄与する腸内細菌由来代謝物のひとつである可能性を示すことができた。

今後の展望としては、まず、脂肪の質と疾患との関連性をより詳細に検討することである。この関連性が明らかにできれば、大腸がんや腸炎に対する予防的戦略を立てることが可能であり、ヒト健康問題への貢献も大きいと思われる。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　7　件）


① Suzuki M., **<u>Nishiumi S.</u>**, Kobayashi T., Azuma T., Yoshida M. (2016) LC-MS/MS-based metabolome analysis detected changes in the metabolic profiles of small and large intestinal adenomatous polyps in ApcMin/+ mice. Metabolomics, 12,(68), 1-9. DOI: 10.1007/s11306-016-0988-7.

② Nababan S., Kawano Y., **Nishiumi S.**, Yano Y., Yoshida M., Azuma T. P-0894 Ether phospholipid profile in mice with non-alcoholic steatohepatitis (S400) (2016) Abstracts of the 25th Annual Conference of APASL, February 20-24, 2016, Tokyo, Japan. Hepatology International (Suppl 1), S1–S506. DOI: 10.1007/s12072-016-9707-8.

③ Suzuki M., **Nishiumi S.**, Kobayashi T., Sakai A., Iwata Y., Uchikata T., Izumi Y., Azuma T., Bamba T., Yoshida M. (2017) The use of on-line SFE-SFC/MS/MS to analyze disease biomarkers in dried serum spots compared with serum analysis using LC/MS/MS. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 31, 886-894. DOI: 10.1002/rcm.7857.

④ **西海 信**、東 健、吉田 優 (2017.2) 特集「オミックスと栄養学のパラダイムチェンジ」 メタボローム最新の話題-腸疾患に対するメタボローム. 医と食, Vol.9, No.1, 18-21.

⑤ **Nishiumi S.**, Kobayashi T., Kawana S., Unno Y., Sakai T., Okamoto K., Yamada Y., Sudo K., Yamaji T., Saito Y., Kanemitsu Y., Tsuda Okita N., Saito H., Tsugane S., Azuma T., Ojima N., Yoshida M. (2017) Investigations in the possibility of early detection of colorectal cancer by gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry. Oncotarget, 8(10), 17115-17126. DOI: 10.18632/oncotarget.15081.

⑥ **Nishiumi S.**, Shima K., Azuma T., Yoshida M. Evaluation of a novel system for analyzing hydrophilic blood metabolites. Journal of Bioscience and Bioengineering, in press. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.01.015.

⑦ Fukumoto T., **Nishiumi S.**, Fujiwara S., Yoshida M., Nishigori C. Novel serum metabolomics-based approach by gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry for detection of human skin cancers: candidate biomarkers. The Journal of Dermatology, in press. DOI: 10.1111/1346-8138.13921.

〔学会発表〕（計 6 件）

① **西海 信**、寺島 禎彦、東 健、吉田 優 (2014) メタボロミクスによる非アルコール性脂肪性肝炎に対する治療薬の探索. 第 39 回日本医用マススペクトル学会年会. 2014.10.16-17. 三井ガーデンホテル千葉（千葉）

② Yoshihiko Terashima, **Shin Nishiumi**, Namiko Hoshi, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma (2014) Metabolome Analysis-Based Attempt to Discover Therapeutic Agents for Non-Alcoholic Steatohepatitis. AGA-DDW2014. 2014.5.4-6. Chicago, USA.

③ **西海 信**, 吉田 優 (2015) 高脂肪食摂取が引き起こす腸内環境の変化に対するメタボローム解析による評価. 第 40 回 日本医用マススペクトル学会年会. 2015.9.16-17. アクトシティ浜松 コングレスセンター（静岡）

④ 吉田 優, **西海 信**, 吉江 智郎, 東 健 (2015) 「アミノ酸研究の新展開：細胞シグナルとしての動的制御機構」ワークショップ：APC 遺伝子変異による大腸癌の代謝プロファイル変動と細胞増殖に対する影響. 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会（BMB2015）. 2015.12.1-5. 神戸ポートアイランド（神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸商工会議所）（兵庫）

⑤ Saut Nababan, Yuki Kawano, **Shin Nishiumi**, Yoshihiko Yano, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma (2016) Ether phospholipid profile in mice with non-alcoholic steatohepatitis. The 25th Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2016). February 20-24, 2016. International Convention Center Pamir, Grand Prince Hotel New Takanawa (Tokyo, Japan).

⑥ 鈴木 誠、西海 信、小林 隆、東 健、吉田 優 (2016) 家族性大腸腺腫症モデル ApcMin/+マウスにおける腸管ポリープのメタボローム解析. 第 10 回メタボロームシンポジウム. 2016.10.19-21. 鶴岡メタボロームキャンパス レクチャーホール（山形）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
神戸大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野ホームページ
http://www.med.kobe-u.ac.jp/gi/index.html

６．研究組織
(1)研究代表者
西海　信　　（NISHIUMI, Shin）
神戸大学・大学院医学研究科・特命准教授
研究者番号：２０５１４７０６

(2)研究分担者
(　　　)

研究者番号：

(3)連携研究者
(　　　)

研究者番号：

(4)研究協力者
(　　　)