

腸内細菌データがもたらす次世代医療の可能性

○増田貴宏* (指導教員 富田勝**)

*慶應義塾大学 環境情報学部 4年 (2017年3月卒業予定)

**慶應義塾大学 環境情報学部

*t13847tm@sfc.keio.ac.jp, **mt@sfc.keio.ac.jp

キーワード：腸内細菌, コハク酸, 肝障害, 医療

1 概要

ヒトの腸管内に生息する多種多様な腸内細菌は、ヒトの健康状態に大きな影響を及ぼすことから、近年では1つの臓器として見なされるほど重要視されている。その一方、未だその包括的な理解はなされておらず、その全貌は今も多くの謎に包まれている。本研究では、バランスの乱れた腸内細菌叢から産生されるコハク酸が、肝臓に発現するGタンパク質共役受容体を介して肝障害を引き起こし、肝疾患の発症や増悪に寄与するという新たな可能性を見出した。 本研究成果は、腸内細菌叢を標的とした薬に非依存的な新たな肝疾患医療戦略へと発展することが期待される。

2 研究背景

ヒトの体のいたるところには無数の微生物が生息しており、特に腸管内には数百種類以上でおよそ100兆細胞もの腸内細菌が生息していることが知られている。これらの腸内細菌は、宿主の消化の補助や免疫系の構築などにより、宿主の恒常性維持に大きく貢献している一方で、食習慣や生活習慣の乱れによりそのバランスが崩れると、炎症性腸疾患や大腸癌などの腸管疾患に加え、肥満や肝臓癌、糖尿病などの全身における多様な疾患の発症につながるものが報告されている [1]。このように腸内細菌はヒトの健康状態に大きな影響を及ぼすことから、腸内細菌叢と呼ばれる腸管内の微生物生態系は、近年では1つの臓器として見なされるほど重要視されている。その一方、未だその包括的な理解はなされておらず、その全貌は今も多くの謎に包まれている。

従来の腸内細菌研究においては、菌種ごとに固有な16S rRNA 遺伝子配列の解読に基づいた菌種の解析が主として行われており、大規模なヒト腸内細菌叢解析としては MetaHIT プロジェクトなど、腸内細菌叢の菌種の構成と宿主に与える影響との関係性について多くの研究がなされてきた。しかしながらこれらの細菌叢解析の研究成果は、健康な人や特定の疾患患者に特徴的な腸内細菌叢の構成を示すだけであり、その分子メカニズムについてはほとんど解明することができずにいた。

そのような中、代謝物質を網羅的に解析することが可能なメタボローム解析技術の発達に伴い、近年の研究では、腸内細菌が産生する代謝物質を介して

宿主に及ぼす影響が大きな注目を浴びている。腸内細菌は宿主が消化吸収することのできない食物繊維を基質として腸管内で嫌気発酵を行っており、この最終代謝産物として、酢酸、酪酸、プロピオン酸などの短鎖脂肪酸や、乳酸やコハク酸といった有機酸を産生している。これらは腸管内において mM オーダーの高濃度で産生されている数少ない代謝物質であり、近年ではこれらの腸内細菌叢由来の短鎖脂肪酸や有機酸が腸管から吸収された後に、宿主に対して様々な生理機能をもつことが明らかとなってきた。その代表例としては、ビフィズス菌が産生する酢酸が腸管のバリア機能を高めて病原菌の感染を防ぐことや [2]、クロストリジウム目細菌が産生する酪酸が過剰な免疫反応を抑制する制御性 T 細胞を誘導することで腸炎を防ぐことなどが報告されている [3]。

このように、近年の腸内細菌研究においては腸内細菌叢の菌種、代謝物質、宿主に与える影響という3者の複雑な相関関係を調べることで、今まで解明することのできなかつた腸内細菌を介した宿主の生体修飾機構を解明することが可能になってきている。また腸内細菌叢の構成は、宿主の食事やヨーグルトに代表される有用細菌を摂取するプロバイオティクスにより大きく変化することが報告されている。従って、これらの腸内細菌叢を介した生体修飾機構の解明は、腸内細菌叢を標的とした薬に非依存的な疾患の予防及び治療戦略として次世代医療に大きく貢献する可能性が期待されている。

そこで我々は、次世代医療に貢献するような腸内細菌叢を介した新規生体修飾機構の解明を目指し、未だに宿主に及ぼす影響が明らかとなっていない腸内細菌叢由来のコハク酸に着目して研究を行ってきた。コハク酸はバクテロイデス属細菌などのいわゆる悪玉菌により産生され、酢酸、酪酸、プロピオン酸などと同様に腸管内において高濃度で産生されている代謝物質である。また肥満や腸炎などの発症に伴って増加することが報告されていることから、宿主に悪い影響を及ぼす代謝物質である可能性が示唆されている一方で、その機能の詳細や作用メカニズムは未だ明らかとなっていない [4, 5]。そこで我々は、マウスを対象とした複数の動物試験を行い、腸内細菌叢由来のコハク酸を介した新規生体修飾機構の解明を目指した。

3 研究内容

3.1 腸管から吸収されたコハク酸が宿主に及ぼす生理機能の検討

本研究では初めに、腸管から吸収されたコハク酸が宿主にどのような生理機能を及ぼすのかを解明することを目的として、マウスへ 200 mM コハク酸水溶液の飲水投与試験を 2 週間行った。その結果、水道水を投与した対照群と比較して、有意な体重の減少が認められた (図 1)。

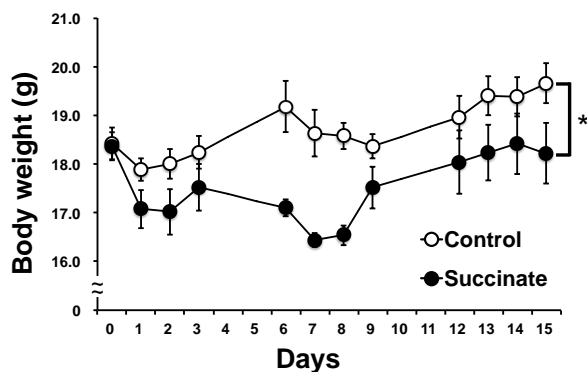


図 1: コハク酸の飲水投与による体重の変化
マウスの 2 週間の体重変化を折れ線グラフで示した。水道水を投与した対象群 (Control) を白、200 mM のコハク酸飲水投与群 (Succinate) を黒でプロットした。各群 5 匹のマウスの体重の平均値としてプロットし、標準偏差をもとにエラーバーを記した。2 群間の有意差は反復測定 の 2 元配置分散分析により検定を行い、* $P < 0.05$ で 2 群間に有意差を示した。

この結果を受けて、体重減少をもたらした要因を検討することを目的として、体重減少に伴う全身性の代謝プロファイルの変化を調べるためにマウスの血漿のメタボローム解析を行った。

その結果、様々な肝疾患の発症に伴って亢進することが報告されているグルタミン代謝やメチオニン代謝の亢進、マウスにおける急性肝炎のバイオマーカーとして報告されているオプタルミン酸の有意な増加などが認められ、腸管から吸収されたコハク酸が肝臓において代謝異常を誘導した可能性が示唆された (図 2) [6]。また腸管から吸収された腸内細菌叢由来代謝物質は、門脈を通過してまず肝臓に流入することから、肝臓では腸内細菌叢由来代謝物質の影響を強く受けることが知られている。従って本研究においても、腸管から吸収されたコハク酸が肝臓に影響を及ぼした可能性が高いと推察された。

□ = Control ■ = Succinate

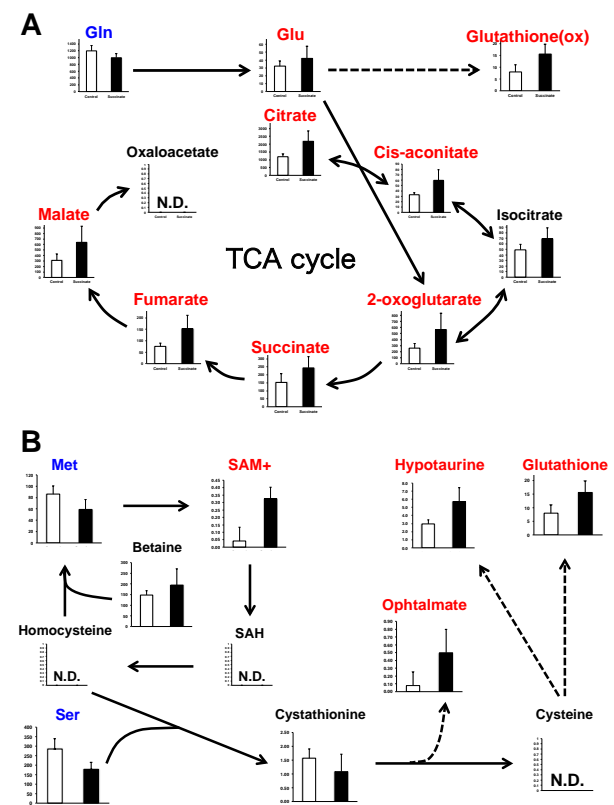


図 2: コハク酸の飲水投与による血漿メタボロームの変化
マウスの血漿のメタボローム解析の結果、亢進が認められたグルタミン代謝 (A) とメチオニン代謝 (B) の代謝パスウェイを示した。各群 5 匹のマウスにおける各代謝物質の平均濃度を棒グラフで示し、標準偏差をもとにエラーバーを記した。水道水を投与した対象群 (Control) を白、200 mM のコハク酸飲水投与群 (Succinate) を黒で示した。マンホイットニーの U 検定により $P < 0.05$ で有意な増加の認められた代謝物質名を赤字、有意な減少の認められた代謝物質名を青字で示した。

3.2 腸管から吸収されたコハク酸が肝臓に及ぼす影響の解明

続いて、コハク酸の飲水投与により代謝異常が誘導された可能性が示唆された肝臓において、腸管から吸収されたコハク酸が及ぼす影響とその分子メカニズムの検討を行った。先行研究において、肝臓に 5-8% 存在する線維芽細胞である肝星細胞にはコハク酸受容体の G タンパク質共役型受容体 91 (G protein-coupled receptor 91; GPR91) が発現し、コハク酸はこの GPR91 を介して肝星細胞を活性化することが報告されている [7]。活性化された肝星細胞は、I 型コラーゲンなどの細胞外マトリックスなどを多量に産生することにより、肝障害や炎症、肝臓の線維化を誘導することが知られており [8]、腸管から吸収されたコハク酸がこの GPR91 を介して肝星細胞の活性化を誘導した可能性が推察された。そこで、マウスへ 20 mM と 100 mM コハク酸水溶液の飲水投与試験を 2 週間行い、採取したマウスの肝臓組織において活性化された肝星細胞が高発現す

ること知られるタンパク質の mRNA 発現量を RT-PCR により測定した。

その結果、活性化した肝星細胞が高産生することで知られる TGF- β (Transforming growth factor- β) や CTGF (Connective tissue growth factor) などの肝臓の線維化に寄与する成長因子、細胞外マトリックスの分解を阻害する酵素の TIMP-2 (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2), I 型コラーゲンの前駆体の COL1A1 (Collagen type 1 α 1) の mRNA 発現量において、コハク酸濃度依存的に有意な増加が認められた (図 3)。従って、腸管から吸収されたコハク酸は肝星細胞に発現する GPR91 を介して肝星細胞の活性化を誘導し、肝障害や炎症、肝臓の線維化を誘導した可能性が示唆された。また活性化された線維芽細胞では、グルタミン代謝が亢進することが報告されており、血漿のメタボロームの結果認められたグルタミン代謝の亢進は、この肝星細胞の活性化に起因するものと推察された [9]。さらに、肝障害が起きた際の表現型の 1 つとして体重の減少が知られていることから、コハク酸の飲水投与により認められた体重の有意な減少も、この肝星細胞の活性化に起因するものと推察された。

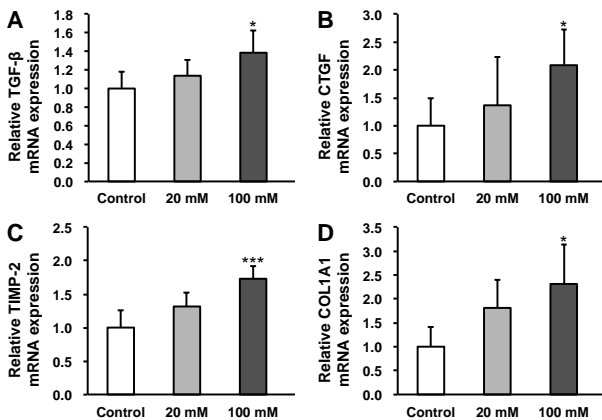


図 3: コハク酸の飲水投与による肝臓の mRNA 発現量の変化
それぞれマウスの肝臓組織における (A) TGF- β , (B) CTGF, (C) TIMP-2, (D) COL1A1 の mRNA 発現量を棒グラフ示した。水道水を投与した対象群 (Control) を白, 20 mM のコハク酸飲水投与群 (20 mM) を薄い灰色, 100 mM のコハク酸飲水投与群 (100 mM) を濃い灰色で示した。各群 5 匹のマウスの mRNA 発現量の平均値として計算し、標準偏差をもとにエラーバーを記した。Dunnnett 法による多重比較検定を用いて、* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$ で有意差を示した。

3.3 腸管から吸収されたコハク酸が NASH マウスモデルに及ぼす影響の検討

これまでの研究成果より、腸管から吸収されたコハク酸は肝星細胞に発現する GPR91 を介して肝星細胞を活性化し、その結果肝障害や炎症が促進されたことで体重の有意な減少が誘導された可能性が示唆された。肝星細胞の活性化は肝硬変や門脈圧亢進症、肝不全、肝臓癌などの様々な肝疾患の発症に寄与することが報告されており [10], 腸管から吸収

されたコハク酸が肝星細胞の活性化を介してこれらの肝疾患の発症に寄与する可能性が考えられた。そこで我々は、数ある肝疾患の中でも特に多くの研究がなされている非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis; NASH) の発症に腸管から吸収されたコハク酸が及ぼす影響を検討するために、NASH マウスモデルへの 200 mM コハク酸水溶液の飲水投与を行った。

その結果、水道水を投与した対照群と比較して、コハク酸の飲水投与開始直後から著しい体重減少が認められた (図 4A)。さらには、投与開始から 2 週間目以降においてマウスの死亡が認められ、最終的には飼育を行った 7 週間までの間に 5 匹中 3 匹のマウスの死亡が認められた (図 4B)。この試験に関しては、今後飲水投与するコハク酸濃度を下げて再現性を確かめる試験を行う必要があるが、今回得られた結果から、腸管から吸収されたコハク酸が肝星細胞の活性化を介して重篤な肝疾患の悪化を引き起こす可能性が示唆された。

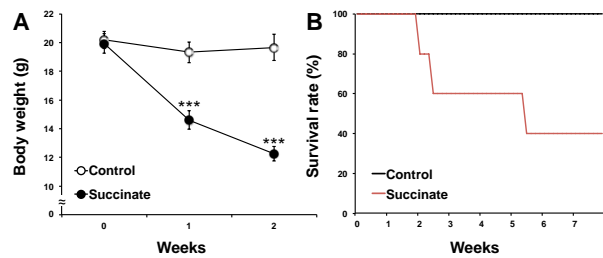


図 4: コハク酸の飲水投与が NASH マウスモデルに及ぼす影響
(A) マウスの体重変化を折れ線グラフで示した。水道水を投与した対象群 (Control) を白, 200 mM のコハク酸飲水投与群 (Succinate) を黒でプロットした。各群 5 匹のマウスの体重の平均値としてプロットし、標準偏差をもとにエラーバーを記した。2 群間の有意差は各タイムポイントにてスチューデントの t 検定を行い、*** $P < 0.0005$ で 2 群間に有意差を示した。
(B) 各群 5 匹のマウスの生存率を百分率で示した。水道水を投与した対象群 (Control) を白, 200 mM のコハク酸飲水投与群 (Succinate) を赤で示した。

4 結論と展望

本研究の成果として、肥満や腸炎などのバランスが乱れた腸内細菌叢から多量に産生されることで知られるコハク酸は、肝星細胞に発現するコハク酸受容体の GPR91 を介して肝星細胞を活性化することで肝疾患の発症や増悪に寄与するという新たな可能性を見出した。そしてこれらの研究成果は、将来的には食事やプロバイオティクス投与により腸内細菌叢を変化させることで、腸内細菌叢を標的とした薬非依存的な肝疾患の予防及び治療戦略として次世代医療に大きく貢献する可能性が期待される。さらには腸内細菌叢のコハク酸産生量を測定することが、肝疾患発症リスクを評価するための指標として用いることができる可能性や、腸内細菌叢を介した新たな肝疾患発症メカニズムの解明により、新規分子標的薬の開発に繋がる可能性も期待され

る。

5 参考文献

- [1] Bull MJ, Plummer NT. Part 1: The human gut microbiome in health and disease. *Integr Med (Encinitas)*. 2014 Dec;13(6):17-22.
- [2] Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*. 2011 Jan 27;469(7331):543-7.
- [3] Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013 Dec 19;504(7480):446-50.
- [4] Jakobsdottir G, Xu J, Molin G, Ahrne S, Nyman M. High-fat diet reduces the formation of butyrate, but increases succinate, inflammation, liver fat and cholesterol in rats, while dietary fibre counteracts these effects. *PLoS One*. 2013 Nov 13;8(11):e80476.
- [5] Ariake K, Ohkusa T, Sakurazawa T, Kumagai J, Eishi Y, Hoshi S, Yajima T. Roles of mucosal bacteria and succinic acid in colitis caused by dextran sulfate sodium in mice. *J Med Dent Sci*. 2000 Dec;47(4):233-41.
- [6] Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, Kakazu Y, Ishikawa T, Robert M, Nishioka T, Tomita M. Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem*. 2006 Jun 16;281(24):16768-76.
- [7] Li YH, Woo SH, Choi DH, Cho EH. Succinate causes alpha-SMA production through GPR91 activation in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Aug 7;463(4):853-8.
- [8] Friedman SL. Hepatic stellate cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008 Jan;88(1):125-72.
- [9] Ghesquiere B, Wong BW, Kuchnio A, Carmeliet P. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature*. 2014 Jul 10;511(7508):167-76.
- [10] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005 Feb;115(2):209-18.