

卵殻膜粉末摂取による炎症性腸疾患抑制作用の腸内細菌叢メタゲノム解析

東京大学総括プロジェクト機構・特任教授 加藤 久典

■ 緒言

我々の先行研究により卵殻膜粉末摂取がデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発性大腸炎の抑制効果を有することが明らかとなった。その作用機構として、腸上皮細胞増殖の促進等による抗原流入の低減と大腸におけるケモカイン遺伝子発現の減少による免疫反応の抑制や、それに伴う腸間膜リンパ節の Th17 発現減少、また肝臓におけるエネルギー産生活動の亢進が関与していることが示唆された。

炎症性腸疾患(IBD)の病因は腸内細菌叢に対する病原性免疫応答から生じるため、本研究ではメタゲノム解析を用いて微生物機能プロファイルを分析することにより、腸内細菌叢変化を調べ、卵殻膜の作用機構のさらなる探索を行った。また体内のヘルパー-T細胞(Th)を中心とする免疫応答制御の破綻により大腸炎が自然発症する Interleukin 10(IL10)遺伝子欠損マウスを用いて、卵殻膜粉末摂取の効果を検討するとともに、二つのモデルに対して卵殻膜粉末の摂取効果、作用機構を比べ、卵殻膜粉末摂取による大腸炎症状の進行抑制の真の作用機序を明らかにすることを目指している。これにより、食品機能の解明にメタゲノム解析を含む統合オミクス解析を行う研究例を世界へ提案し、機能性食品の疾患予防・改善効果をこれまでよりも正確に深く理解する事ができるようになると考えている。

■ 方法

【卵殻膜摂取による DSS 誘発性大腸炎モデルマウスにおける腸内細菌叢変化のメタゲノム解析】

腸内細菌は免疫系の発達、制御性 T 細胞(Tregs)と Th17 細胞の分化、炎症性と抗炎症性サイトカインのバランスおよび腸のバリア機能に寄与するため、DSS 誘発性大腸炎に対する卵殻膜粉末の抑制効果は腸内細菌叢バランス失調の緩和に起因しているかを調べた。

DSS 誘発大腸炎のマウスモデル実験において、通常飼料および滅菌水道水を与える群(CON 群)、通常飼料および 1.5% DSS(M.W. 36000-50000)水を与える群(DSS 群)、卵殻膜粉末を 8% 添加した飼料および 1.5% DSS 水を与える群(D-ESM8 群)の 3 群に分けた。これらマウスの盲腸内容物からメタゲノミック DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子の可変領域 3 および 4 を増幅するために、プライマー(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' および 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')を使用し、イルミナアダプターおよびバーコード配列を付加した後、ライブラリを作成した。Illumina MiSeq により取得した配列の中、重複したペアエンドリードは、Quantitative Insights Microbial Ecology(QIIME v1.8.3)ソフトウェアにより解析した。Greengenes アラインメント(vgg_13_8)に対して USEARCH 法を用いてキメラ配列を除去し、得られた配列は、97%以上の同一性の閾値を有する分類単位(OTU)に割り当てられ、代表的な配列は、Greengenes データベースに従って分類された。サンプル間の距離は、算術平均(UPGMA)クラスタリングを伴う加重および非加重ペアグループ法により Principal Coordinate Analysis(PCoA)を使用してグラフィカルに視覚化した。分類群の相違は、ノンパラメトリック Kruskal-Wallis 検定を用いて分析し、0.05 未満の FDR 値は有意であるとみなされた。いくつかの病原性細菌の検証のために、定量的リアルタイム PCR を実施した。

【卵殻膜粉末摂取が IL10 遺伝子欠損マウスにおける大腸炎の発症に与える影響の解析】

IBD の自然発症モデルとして IL10 遺伝子欠損マウスを交配、ジェノタイプリング後、母親がホモ型由来の雄性ホモ遺伝子個体は各群にそれぞれ 7 匹になるよう、通常飼料および滅菌水を与える群(KO-CON 群)と卵殻膜粉末を 8% 添加した飼料および滅菌水を与える群(KO-ESM 群)に分けた。また 8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに通常飼料および滅菌水を与える群(WT 群)を設けた。各飼料を 28 週間摂取させ、大腸炎進行の指標である体重減少及び軟便スコア推移を評価し、さらに好中球浸潤の指標である myeloperoxidase 活性値、血中ヘモグロビン量を測定することにより、卵殻膜粉末摂取は IL10 遺伝子欠損マウスの大腸炎症状を軽減するかどうかを検討した。

■ 結果

【卵殻膜粉末摂取は腸内細菌叢異常を改善した】

メタゲノム解析による門レベルでの解析では、3つの実験群の間で最も一般的な細菌門の相対量が有意に異なっていることを明らかにした。*Bacteroidetes* は、CON の 67.0% から DSS の 34.6% に減少し、D-ESM8 群では 55.2% に回復した。*Firmicutes* はそれぞれ 26.5%、13.7% および 18.6%、*Proteobacteria* は、それぞれ 0.9%、40% および 8% であった (図 a)。

腸内細菌叢構造の特徴を明らかにするため、2つに分類された α および β と呼ばれる細菌の多様性を評価した。観察された種とシャノン指数を用いた α 多様性解析により、DSS マウスは 3 種の群の中で最も細菌種数が少なく (図 b)、これはヒトにおける IBD およびマウスにおける DSS 大腸炎を含む疾患状態と細菌種数の少なさが関連している¹⁾。D-ESM8 群の菌種の豊富さは、大腸炎に対する卵殻膜粉末の有益な効果と一致した。

豊富な細菌および特定の細菌分類群をそれぞれ測定し、2つの系統学的距離メトリックス (weighted and unweighted Unifrac distances) を用いて β - 多様性の解析をした。CON、DSS および D-ESM8 群の unweighted metric による変動率は、それぞれ 21.10%、7.27% および 13.13% であり (図 c)、希少細菌がこれらの群の腸内細菌叢構造を変化させたことを示している。CON、DSS および D-ESM8 群の weighted metric によるクラスタリングは、それぞれ 62.36%、3.23% および 20.38% の変動を示した (図 d)。これらのデータは、希少な細菌か豊富な細菌かにかかわらず、卵殻膜粉末によって腸内細菌叢の構造が改善され、細菌の多様性の変化が卵殻膜粉末の抗炎症効果に関連する可能性があることを示唆した。

CON 群と比較して DSS 群では、ヒト IBD と大腸炎マウスにおける大腸炎および酸化ストレスのマーカーである *Enterobacteriaceae* (*Proteobacteria* 門、全細菌の 39% に達する) は顕著に検出された。これに対して、D-ESM8 群では、*Enterobacteriaceae* の検出は有意に低い値であった (約 6%)。同様に、DSS 投与により *Enterococcaceae* の相対量が増加したが、卵殻膜粉末摂取によってほぼ正常レベルにもどった (図 e)。

また、DSS 群ではリポ多糖類 (LPS) 産生病原菌である *Enterobacteriaceae* 科に属する大腸菌 (*E. coli*) の相対量が増加したが、D-ESM8 群ではほぼ正常レベルに回復させた (図 f)。さらに大腸菌の相対量について、リアルタイム PCR の結果とメタゲノムデータとの間には、非常に高い相関性 ($r=0.90$) があった (図 g)。同様に、大腸菌の存在量と LPS 濃度間 ($r=0.63$)、ならびに大腸菌の存在量と炎症スコア DAI 間 ($r = 0.53$) の正の相関性は、大腸炎に対する卵殻膜粉末の抑制効果に関して、大腸菌の存在量への負の影響を介し、その後の炎症および組織損傷を抑制している可能性がある。

【卵殻膜粉末摂取は自然発症モデルの大腸炎症状を改善した】

IL10 遺伝子欠損マウスを用いて大腸炎症状の解析及び血中、肝臓、大腸における生化学検査を行い卵殻膜粉末摂取による大腸炎抑制効果の検討を行った結果、卵殻膜粉末摂取は大腸炎進行の指標である体重減少、脂肪重量減少、脾臓重量増加、大腸重量 / 長さおよび血中ヘモグロビン量を有意に抑制した。大腸の好中球の浸潤指標となる myeloperoxidase 活性値は低い傾向を示し、卵殻膜粉末摂取が自然発症大腸炎の進行抑制効果を有することが確認できた。現在解剖時に採取した大腸、肝臓、血漿、盲腸内容物を用いて各種オミクス技術 (トランスクリプトーム、プロテオーム、メタゲノム) を利用し、mRNA 発現、タンパク質発現、腸内細菌叢の変動など統合的な解析を行っている。また炎症局所である腸管の免疫組織として IBD の病態形成への関与が知られる Th17 の細胞数をフローサイトメトリにより測定する。

■ 考察

大腸菌などの病原性グラム陰性細菌によって産生される LPS は、腸上皮防御機構障壁の炎症性破壊を引き起こす。我々のメタゲノムデータでは、DSS 群において大腸菌は有意に増加、毒素分泌または刺激されたサイトカイン産生に起因する下痢および組織損傷に関連した可能性がある²⁾。卵殻膜粉末摂取マウスの肝臓における LPS レベルの低下および LPS 免疫反応の低下は、卵殻膜粉末が細菌性 LPS を解毒する回復能力と関連し、それによって IBD の病因である腸管上皮細胞の恒常性を調節することを示唆している。

炎症環境下では、抗菌タンパク質を放出し、栄養環境を変えることによって細菌の増殖に影響を及ぼす「栄養免疫」と呼ばれる防御メカニズムが存在する³⁾。大腸における炎症反応は、好中球および

マクロファージの浸潤から始まり、次に活性化されたマクロファージが多くの強力な炎症性サイトカインを産生する。好中球の上皮を介した移動とその後の死滅好中球から S100A8 と S100A9 になるヘテロ二量体カルプロテクチンの放出は、腸内腔の細菌増殖に必要な亜鉛の利用可能性を低下させる³⁾。また、腸内腔へ好中球が移動することで、組織化された管腔内構造の生成をもたらす。それによって共生細菌の封入、共生細菌の腸上皮への接触の制限をもたらす。そしてそのプロセスは高親和性 N-ホルミルペプチド受容体、Fpr1²⁹⁾ によって調節される。さらに、Lcn-2 は、エンテロバクチンに結合し補足することによって細菌の鉄の獲得を防止し^{3,4)}、細菌の増殖を阻害する。

一方、大腸炎において、誘導性一酸化窒素シンターゼ(iNOS)によって生成される硝酸塩および N-オキシドなどの炎症性宿主応答の酸化副産物は、嫌気性呼吸のため外因性電子受容体として働き、細菌の増殖環境を大幅に変える。したがって、このような条件下では、*Enterobacteriaceae* が嫌気呼吸に必要なとされる酵素をエンコードする可能性が高く、*Enterobacteriaceae* の制御不能な拡大をもたらす。腸障害をもたらす。D-ESM8 群においてサイトカイン、ケモカインおよび S100A8、S100A9、Fpr1、Nos2、Lcn2 の発現が DSS 群と比較して低く、*Enterobacteriaceae* と大腸菌の豊富さおよび MPO の活性が低いことを考えると、腸内細菌叢と自然免疫系が卵殻膜粉末および低炎症性宿主応答栄養免疫の両方に応答し、それによって細菌の増殖に影響が少なく、細菌の多様性を回復させることを示している。

細菌叢に対する卵殻膜粉末のこれらの影響に関して、我々は以下の仮説を立てた。単純な炭水化物およびタンパク質は上部消化管で消化および吸収されるので、大腸内の絶対嫌気性細菌の増殖を支える主な栄養素は複雑な炭水化物(例えば食物繊維)および非消化性タンパク質(例えばグルテン)である。より多くの非消化性タンパク質を提供することができる卵殻膜粉末は、腸内細菌に窒素源を提供することによって、盲腸発酵を刺激する食物繊維の生理学的機能と類似の機能を有する可能性がある。大腸炎を改善するための介入予防治療には、さらなる研究、特にバランスの取れた腸内細菌叢構造の回復のメカニズムに関する研究が求められている。

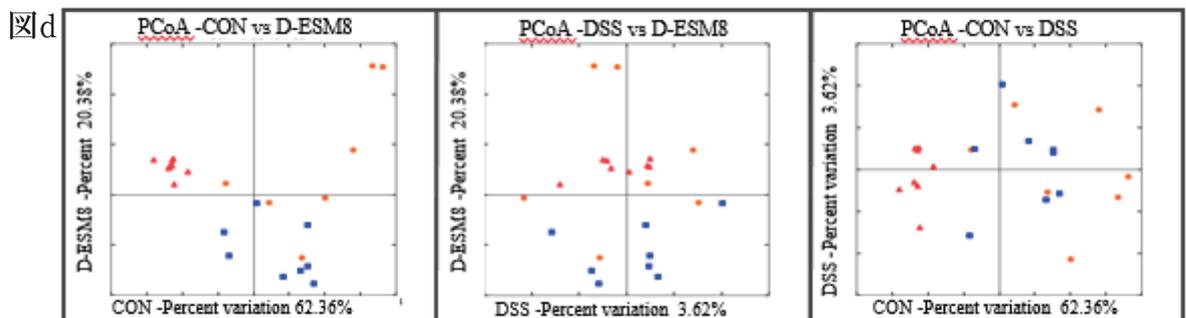
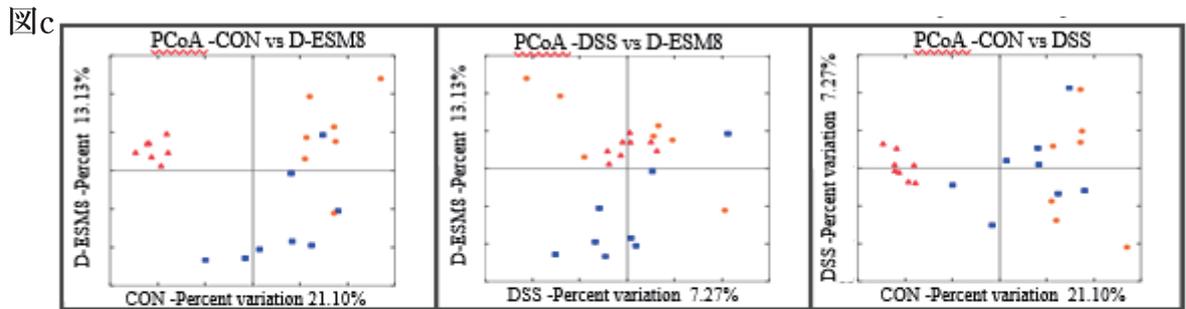
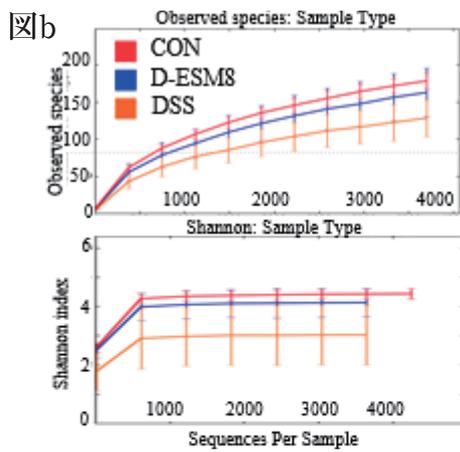
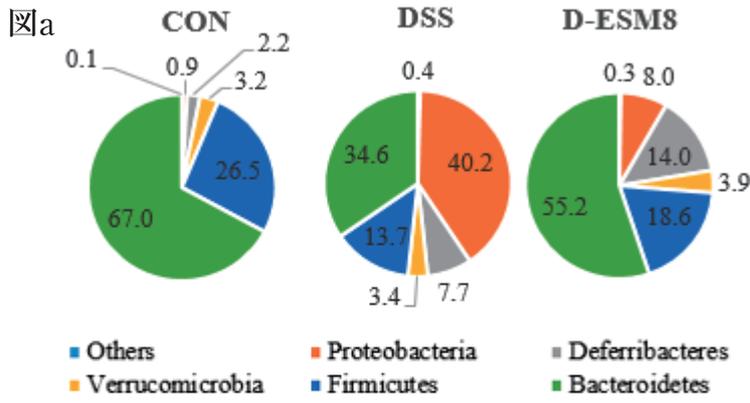
■ 要 約

以上の結果から、卵殻膜粉末摂取による大腸炎症状の抑制効果、腸内細菌の多様性増大と病原性細菌の減少を特徴とする腸内細菌叢バランス失調の改善効果が示された。その作用機構として、腸上皮細胞増殖の促進等による抗原流入および細菌等異物の侵入の低減と大腸におけるケモカイン遺伝子発現の減少による免疫反応の抑制や、それに伴う腸間膜リンパ節の Th17 発現減少、また肝臓におけるエネルギー産生活動の亢進が関与していることが示唆された。これらの知見は、腸管に引き起こされた潰瘍の治癒を早め、疾患の寛解改善に寄与している可能性があると考えられた。

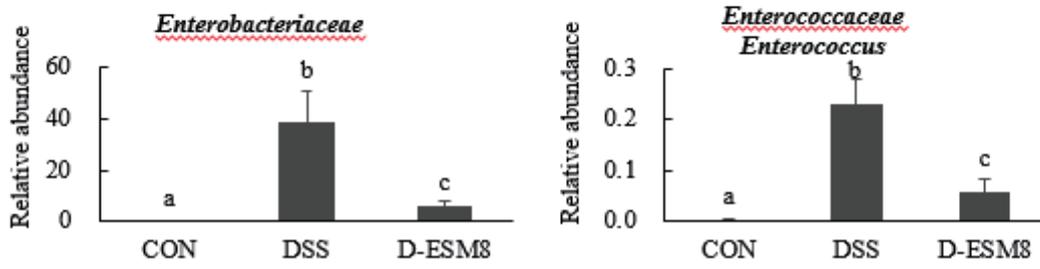
本研究により、卵殻膜による IBD 予防、治療の可能性を提示することができた。卵殻膜による IBD の予防および治療は、副作用がないと考えられるため、患者の QOL を上げ、また医療費の削減にもつながると考えられる。加えて卵殻膜は、食品業界では卵製品の製造過程で生じる産業廃棄物であることから、天然で安価な卵殻膜の利用推進は環境問題対策にもつながることが期待される。このように、今後も卵殻膜の有用性についての研究を進めることで、新たな機能性食品の創出や産業への貢献が期待できる。

■ 文 献

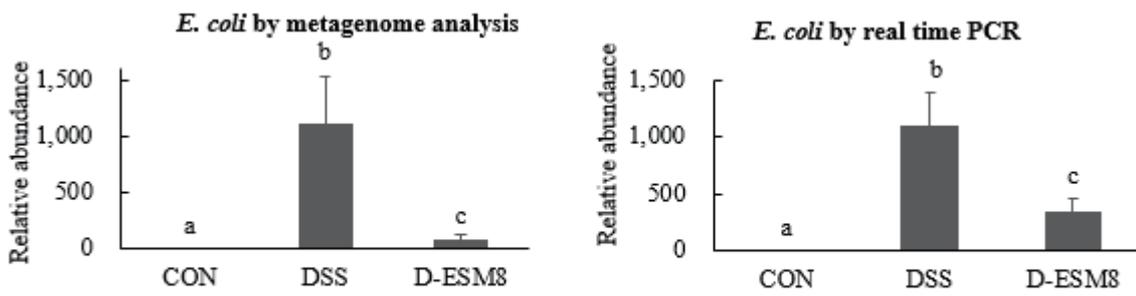
1. Allen JM, et al. Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol* 118, 1059-1066(2015).
2. Huang YL, Chassard C, Hausmann M, von Itzstein M, Hennet T. Sialic acid catabolism drives intestinal inflammation and microbial dysbiosis in mice. *Nat Commun* 6, 8141(2015).
3. Faber F, Baumler AJ. The impact of intestinal inflammation on the nutritional environment of the gut microbiota. *Immunol Lett* 162, 48-53(2014).
Molloy MJ, et al. Intraluminal containment of commensal outgrowth in the gut during infection-induced dysbiosis. *Cell Host Microbe* 14, 318-328(2013).
4. Flo TH, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432, 917-921(2004).



☒e



☒f



☒g

