

Title	メタゲノム解析・メタボローム解析からみた肥満関連腫瘍発現における腸内細菌の役割
Sub Title	The role of the intestinal microbiota in the overweight related tumor genesis using a metabolome analysis
Author	豊田, 尚潔(Toyota, Naoyuki)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>肥満背景発癌モデルマウスとコントロールマウス(C57/BL)とでは発癌に違いがあることがわかり, 肥満背景発癌モデルマウスでより多くまた大きい腫瘍が形成される事がわかった。それぞれの腸内細菌を比較検討したところ腸内細菌の分布に違いがあることまでが分かった。腸内細菌の分泌の違いについて, 追加実験を行うこととした。</p> <p>1) 抗菌薬を投与し無菌化状態にすることで, 腫瘍形成や腸内細菌叢にどのような影響を与えるか。</p> <p>2) Co-Housingにより2種間の腸内細菌叢が類似するかどうか, また腫瘍形成にどのような影響を与えるか。</p> <p>We found out the difference in carcinogenesis between an overweight background carcinogenic model mouse and a control mouse (C57/BL), and a big tumor was formed out in an overweight background carcinogenic model mouse. From the comparison of intestinal bacteria between overweight model mouse and control mouse, the distribution of the intestinal bacteria was different. As we thought further inspection was necessary to investigate the difference in the secretion of intestinal bacteria, we decided to do the following supplemental experiment .</p> <p>1) to investigate the impact of temporary germ-free environment by using antibiotics on tumorigenesis and an and an intestinal flora.</p> <p>2) to investigate the impact of co-housing on a tumorigenesis and intestinal flora.</p>
Notes	<p>研究種目：若手研究(B)</p> <p>研究期間：2016～2017</p> <p>課題番号：16K19955</p> <p>研究分野：消化管悪性腫瘍</p>
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K19955seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K19955seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

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 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19955

研究課題名(和文)メタゲノム解析・メタボローム解析からみた肥満関連腫瘍発現における腸内細菌の役割

研究課題名(英文)The role of the intestinal microbiota in the overweight related tumor genesis using a metabolome analysis

研究代表者

豊田 尚潔 (Toyota, Naoyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40772596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)：肥満背景発癌モデルマウスとコントロールマウス(C57/BL)とでは発癌に違いがあることがわかり、肥満背景発癌モデルマウスでより多くまた大きい腫瘍が形成される事がわかった。それぞれの腸内細菌を比較検討したところ腸内細菌の分布に違いがあることまでが分かった。腸内細菌の分泌の違いについて、追加実験を行うこととした。

- 1) 抗菌薬を投与し無菌化状態にすることで、腫瘍形成や腸内細菌叢にどのような影響を与えるか。
- 2) Co-Housingにより2種間の腸内細菌叢が類似するかどうか、また腫瘍形成にどのような影響を与えるか。

研究成果の概要(英文)：We found out the difference in carcinogenesis between an overweight background carcinogenic model mouse and a control mouse (C57/BL), and a big tumor was formed out in an overweight background carcinogenic model mouse. From the comparison of intestinal bacteria between overweight model mouse and control mouse, the distribution of the intestinal bacteria was different. As we thought further inspection was necessary to investigate the difference in the secretion of intestinal bacteria, we decided to do the following supplemental experiment.

- 1) to investigate the impact of temporary germ-free environment by using antibiotics on tumorigenesis and an and an intestinal flora.
- 2) to investigate the impact of co-housing on a tumorigenesis and intestinal flora.

研究分野：消化管悪性腫瘍

キーワード：大腸 発癌 肥満関連発癌

## 1. 研究開始当初の背景

細菌の遺伝子に共通に存在する16sRNA領域の存在が明らかになってから、ここ10年程の間でヒトの腸内には1個体の全細胞数を超える100兆個以上の腸内常在菌が共生していることが明らかとなった。その遺伝子の数は1個体の2万数千個を遥かにしのぎ、数十万～100万個と試算される。その腸内細菌は、腸内において独自の代謝系を構築し、宿主との相互作用により腸環境系としての恒常性を保っており、恒常性の維持や破綻が宿主の生理的・病的状態に深く関わっていると考えられている。ビタミンや必須アミノ酸など宿主が産生できない栄養素や大腸上皮のエネルギーとなる酪酸などの短鎖脂肪酸の供給源であり、さらには病原微生物の競合阻害や宿主免疫系の発達を促すなど生体防御においても重要な役割を担っていることが知られている。そして、大腸がんや炎症性腸疾患などの消化器疾患の発症や増悪に関与すること、あるいは消化器のみならず肥満や糖尿病、動脈硬化症などの内分泌代謝疾患や、多発性硬化症やうつ・不安神経症といった神経疾患など、全身性あるいは遠隔臓器の疾患との関連性も相次いで報告されている。

### (1) 肥満と癌化

当教室に所属する岡林助教らのメタアナリシス解析では肥満が大腸癌発生の危険因子であった (Okabayashi K et al.: Am J Gastroenterol 2012)。また、肥満により大腸ポリープの発生率が増加するとの報告もあり、われわれは肥満環境下においては何らかのメカニズムにより、ポリープ発癌が亢進するという仮説を立てた。さらにわれわれはこのメカニズムの上流もしくはメカニズムそのものとして腸内細菌叢の変化が重要であると推測している。

### (2) 大腸癌と腸内細菌

大腸癌の発生機序として 腺腫の癌化 (adenoma-carcinoma sequence)、de novo 発癌、鋸歯状ポリープの癌 (serrated polyp neoplasia pathway) と、潰瘍性大

腸炎を主とする炎症粘膜における炎症性発癌、の4つの経路が想定されている。これらの大腸癌の発生機序のうち最も一般的である adenoma-carcinoma sequence にわれわれは着目し、遺伝的肥満モデルマウスに azoxymethane (AOM) を投与し発癌させ、肥満からの発癌に関わる腸内細菌叢の変化を検証した。

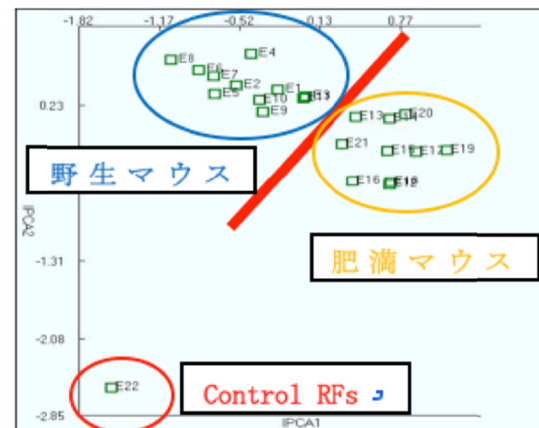


図1 野生マウスと肥満マウスの腸内細菌の分布 (AMMI 解析)

図1は、遺伝子操作による肥満モデルマウスと野生マウスにAOMを腹腔内投与し、大腸ポリープ発癌を誘導させ、2群間の腸内細菌分布を the Additive Main Effects and Multiplicative Interaction (AMMI) モデル (Culman SW et al.: J Microbiol Methods 2008) を用いたT-RFLP法により解析した結果を示している。肥満モデルマウスで有意にポリープおよび大腸癌の発生頻度が高かったことから、腸内細菌分布の違いが何らかの影響を及ぼした可能性は高い。大腸癌と腸内細菌に関する報告は数々あるものの、今回はいわゆる善玉菌で代表される乳酸菌、酪酸産生菌の抗腫瘍効果に着目した。

### (3) 肥満と腸内細菌

メタゲノム解析から健常者と比較して肥満や糖尿病患者では腸内細菌の組成が異なり多様性が乏しいことが報告された (Vanessa K. Ridaura et al.: Science 2013)。さらに、

遺伝子改変による肥満マウスの腸内細菌を正常遺伝子マウスに移入すると正常マウスも肥満になることから、少なくとも腸内細菌の組成が肥満の発症あるいは増悪因子となることが示唆される (Delzenne NM, Cani PD.: Annu Rev Nutr 2011)。肥満、糖尿病モデルマウスに腸管上皮の粘液分解菌である *Akkermansia mucinifila* (以下、*A. muciniphila*) の生菌を摂取させるとインスリン抵抗性、肥満が改善するという報告があり (A Everard et al.: PNAS 2013)、この菌は肥満、腸管粘液のバリア機能という点で癌発生に関わる可能性があるとして着目している。

#### (4) 細菌同士の相互作用

酪酸産生菌は単独培養するのに比し、乳酸菌と共培養することで単独培養の約10倍の菌量となるとされている。また、*A. muciniphila* が粘液を分解する際に酪酸を代謝産物として腸管内へ排泄する。過去の報告にあるように酪酸は大腸癌発生には非常に重要な役割を果たしているが (Manon D. Schulz et al.: Nature 2014)、酪酸産生菌単独ではなく、いくつかの菌の相互作用により酪酸をはじめとした短鎖脂肪酸 (SCFA) が腸管内に多く産生されることが発癌に関与していると考えられる。

## 2. 研究の目的

ヘリコバクター・ピロリ菌の発見および胃潰瘍、胃癌の病態発生における役割の同定は、予防医学の歴史の中で革新的出来事であった。一方、腸内細菌に関しては、培養が困難であることから、つい最近までその疾病に対する役割はブラックボックスと考えられていた。ところが、細菌の遺伝子に共通に存在する 16sRNA 領域の存在が明らかになり、多くの腸内細菌の同定が可能になるにつれて、種々の慢性代謝性疾患や悪性疾患との関わりが少しずつ明らかになりつつある。また、adenoma-carcinoma sequence で知られる大腸癌の前段階であるポリープの発生が肥満と強い関連があることが報告され、その橋渡しとして我々は腸内細菌に着目した。大腸癌と肥満に関してはそれぞれ腸内細菌との関連が数多く報告されているが、肥満環境下での大腸癌発癌を一元的に説明する腸内細菌はこれまでに報告されていない。そこで今回、

肥満関連の大腸癌発現における腸内細菌叢の役割を明らかにすることを目的に研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 肥満背景発癌モデルマウスを作製し、その腸内細菌叢の変化をみる。

コントロールマウス、型糖尿病モデルの KK マウス、および肥満遺伝子が導入された KK-Ay マウスに aberrant crypt foci (ACF) を介して発癌を誘導する azoxymethane (AOM) を週に 1 回連続 6 週間腹腔内に投与し、さらに 14 週経過後に十分な麻酔下 (4% イソフルレン) で開腹後、下大静脈から可能な限り採血を行い、腹部大動脈を切断し失血死させる。その後無菌的に盲腸から腸内容物を採取し、-80℃ で凍結保存する。その他、腸管を採取し、一部を凍結保存、残りはホルマリン固定する。腸内容に関しては後日、便からの DNA 精製キット、QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を精製する。また、T-RFLP キット、Phusion Bacterial Profiling Kit (Finnzymes) を用いて、16s rRNA に特異的なプライマーを用いて PCR 増幅を行った後、制限酵素で DNA を切断し、キャピラリー電気泳動システムを用いた DNA シーケンサー (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer : Applied Biosystems) を用いて解析する。フラグメント (RFs) の長さによる、腸内細菌の分布を AMMI 解析 (Culman SW et al.: J Microbiol Methods 2008) によって比較検討する。また、Kit に付随の DNA ライブラリーから特定の細菌をある程度推定することができるため原因細菌の類推が可能となる。さらに、特定の細菌に関しては、qPCR 法を用いてその菌体量を具体的に定量分析する。血漿成分は、EIA 法を用いて種々の炎症性サイトカインを分析する。さらに凍結腸管は DNA を抽出しやはり、炎症性サイトカインの遺伝子レベルを qPCR 法で分析する。パラフィンブロック包埋を行った組織は 5 μm に薄切し、組織免疫染色法を用いてやはり炎症性サイトカインに

加えて癌幹細胞マーカーである CD133 および CD44 の発現レベルを検証する。上記検討を大腸ポリープモデルマウスとコントロールマウスだけでなく、肥満マウスモデル内で発癌がみられた群とみられなかった群で比較する。

#### (2) 便中の SCFA 濃度測定 (メタボローム解析)

Sacrifice 前に収拾した便検体を凍結したままヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社へ送り解析を行う。前処置として、まず 50 mg の検体を 30 % 重水  $D_2O$ 、0.002% (w/v) TSP、0.03% 窒素ナトリウム ( $Na_3N$ ) が混じった 500  $\mu$ l の PBS Buffer (0.1 M  $K_2HPO_4/NaH_2PO_4 = 4/1$ , pH = 7.4) に混ぜ、ボルテックスした後、液体窒素で凍結、解凍を 3 サイクル繰り返す。ホモジナイズした後、10000G、4 で 10 分間遠心し上澄みを採取、残ったペレットに対し、再度同じ工程を繰り返す、2 回の工程で得た上澄みを合わせ、10000G、4 で 10 分間遠心し 600  $\mu$ l の上澄みを解析用チューブへ移す。その後、核磁気共鳴スペクトル測定装置 (NMR) を用いて網羅的に代謝産物の解析を行う。  
(平成 29 年度)

#### (3) 治療介入

KK-Ay マウスに酪酸産生菌、乳酸菌、*A.mucinifila* の生菌をそれぞれ飼料に混合し上記実験と同様に解析する。具体的に酪酸産生菌として *Clostridium butyricum* T0-A(東亜薬品工業)を 3000mg/kg/day を極量として飼料に混入、乳酸菌として *Lactobacillus casei* T0-A(東亜薬品工業)を 6000 mg/kg/day を極量として飼料に混入、*A.mucinifila* として *A.mucinifila* MucT(ATCC BAA-835)を  $2.0 \times 10^8/0.2$  mL の用量で連日胃管から服用させる。治療介入の時期は AOM を腹腔内注射する 6 週間のみとする。治療介入しない control 群、酪酸産生菌のみを服用する CD 群、酪酸産生菌+乳酸菌を服用する BC+LC 群、酪酸産生菌、乳酸菌、*A.mucinifila* すべてを服用する BC+LC+AM 群、*A.mucinifila* のみを服用する AM 群の 5 群に

分け、20 週間後に sacrifice を行う。その後の腸内細菌解析、メタボローム解析に関しては前述の通りである。

#### (4) 腸管上皮の粘液の測定

近位大腸の切片を 4 で 2 時間 Carnoy 's 溶液 (エタノール 6 : 酢酸 3 : クロロホルム 1 , vol/vol) で固定する。その後 24 時間、100% エタノールに浸し、5 $\mu$ m のパラフィン切片を alcian blue で染色する。最低 20 の異なる部位から粘液層に垂直になるように切り出す。切り出した切片を画像解析ソフトを用いて inner mucus layer (IM) の厚さを解析する。  
(Motic-image Plus 2.0ML; Motic)

#### 4 . 研究成果

肥満背景発癌モデルマウスとコントロールマウス (C57/BL) とでは発癌に違いがあることがわかり、肥満背景発癌モデルマウスでより多くまた大きい腫瘍が形成される事がわかった。それぞれの腸内細菌を比較検討したところ肥満モデルマウスとコントロールマウス、肥満背景発癌モデルマウス、発癌のコントロールマウス それぞれで、腸内細菌の分布に違いがあることまでが分かった。今後腸内細菌の分泌の違いについて更なる検証が必要と考えた為、以下の追加実験を行うこととした。

(1) 抗菌薬を投与し無菌化状態 (一度腸内細菌叢をリセット) にすることで、腫瘍形成や腸内細菌叢にどのような影響を与えるかということを検証する。 2) Co-Housing (肥満モデルマウスとコントロールマウスを共環境) により 2 種間の腸内細菌叢が類似するかどうか、また腫瘍形成にどのような影響を与えるかどうかを検証する。現在上記の研究を進めているところである。

#### 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)

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
豊田 尚潔(TOYOTA, Naoyuki)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教  
40772596

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者