

プレバイオティックオリゴ糖による腸内恒常性維持機構の解明

福田 真嗣

独立行政法人理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター 研究員
(現 慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任准教授)

緒 言

われわれの腸内環境は腸管上皮細胞や粘膜免疫細胞、さらには 1,000 種類・100 兆個以上もの数の腸内共生細菌で構成されており、これらが複雑に相互作用することでその恒常性を維持している^{1,2)}。特に腸内細菌叢は宿主の健康維持・増進に寄与したり、あるいは逆に腸管関連疾患の発症にも関与することが知られているため、腸内細菌叢を含む腸内環境全体の代謝動態を理解し、それらを制御することは、われわれの Quality of Life を向上させるという意味でも重要である。腸内細菌叢の制御方法の一つとして、ビフィズス菌などのいわゆる善玉菌の増殖促進効果を有し、腸内環境の改善効果をもたらすプレバイオティクス的一种であるフラクトオリゴ糖 (FOS) 摂取があげられる。動物試験では FOS を摂取すると腸管免疫系が賦活化され、アレルギー抑制効果や病原菌の感染防御に重要な免疫グロブリン (Ig) の一種である IgA の産生が誘導されることが報告されている³⁻⁵⁾。しかしながら、FOS 摂取による腸内細菌叢の変動に伴う宿主免疫応答の詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。われわれはこれまでに、宿主-腸内細菌叢間相互作用の詳細を解析するための基盤技術として、腸内フローラの代謝動態をリアルタイムにモニタリングする手法を世界に先駆け構築し⁶⁾、その技術を基盤とした統合オミクス解析手法を用いることで、病原菌-プロバイオティクス間相互作用の一端を明らかにしてきた⁷⁾。また腸管免疫応答に重要であるパイエル板上皮層に点在する M 細胞からの細菌認識受容体を世界に先駆けて明らかにした⁸⁾。加えて、環境中に微生物が存在しない無菌環境下で飼育されたマウス (無菌マウス) に限られた菌のみを定着させたノトバイオートマウスモデル実験系を用いて、宿主-腸内フローラ間相互作用を解析することで、腸内細菌が産生する代謝産物が宿主免疫系へ大きく影響していることを明らかにした⁹⁾。統合オミクス解析手法により得られる多量の情報を統計的手法により

統合することで、腸内環境改善効果が報告されている難消化性多糖摂取時の腸内環境の変動を検出する新規な体系的な研究手法も構築している。

以上のことから本研究では、FOS 摂取時のヒト腸内環境の変動について、われわれが独自に構築した統合オミクス解析手法を用いることで、プレバイオティックオリゴ糖摂取による腸内恒常性維持機構について解析を行った。

実験方法

1. フラクトオリゴ糖摂取試験

20代から30代の健康なボランティア7名(男性4名、女性3名)に腸内細菌叢が大きく変動すると考えられる酒、菓、発酵食品などの摂取を試験期間中の1週間前から禁止し、10gのFOSを1日2回、1週間摂取してもらった。FOSは株式会社明治のメイオリゴWを使用した。FOS摂取前中後の各期間で2回以上糞便を採取し、-80°Cで保存した。

2. IgA量測定

糞便試料は凍結乾燥し、ジルコニアビーズを用いて物理的に破碎を行った。糞便サンプル10mgをタンパク質分解酵素阻害剤を含むPBSで希釈し、ELISAキット (Bethyl) を用いて IgA 量を測定した。

3. 腸内細菌叢解析

破碎した糞便サンプル10mgから常法に従ってDNAを抽出し、DNA100ngを鋳型としてGCクランプ付954fプライマーおよび1369rプライマーを用いてPCR反応を行った。その後、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) を行い、腸内細菌叢プロファイルの解析を行った¹⁰⁾。

4. 代謝物解析

凍結乾燥した糞便 10 mg に 90% 重水 と 1mM 3-(トリメチルシリル)-1-プロパンスルホン酸ナトリウム (DSS) を含む 600 μ l リン酸バッファー (0.1M K₂HPO₄/KH₂PO₄, (pH7.0)) を添加し、65°C、5 分で低分子化合物を抽出した。遠沈後 5 mm ϕ NMR 管に上清をうつし、DRU-700 NMR (Bruker) を用いて、¹H-NMR 測定を行った。NMR スペクトルは、NMRPipe ソフトウェアを使用して処理した。¹H-NMR の化学シフトデータは、0.06 ppm から 9.98 ppm の間を 0.04 ppm で分割し、化学シフトとシグナルの強度を数値化した^{6,7)}。

5. 多変量解析

FOS 摂食による腸内環境変動を評価するため、腸内細菌叢情報および代謝物情報をそれぞれ正規化し、R ソフトウェアを用いて主成分分析を行った。さらに解析結果に基づく寄与率および因子負荷率も算出した。加えて、FOS 摂食による菌叢および代謝物の変動情報の詳細について言及するため、両者間の相関係数をスピアマンの順位相関係数を用いて算出し、相関係数のパターンに基づいて最小分散法を用いてクラスタリングを行った¹⁰⁾。

結 果

1. 糞便中IgA量の変動

糞便中 IgA 量は ELISA 法によって測定した。7 名分の IgA 量を測定した結果、FOS 摂食前、FOS 摂食中、および FOS 摂食後の各期間の平均 IgA 量を比較しても有意な差は得られなかった (図 1A)。個人別に糞便中 IgA 量を FOS 摂食前、FOS 摂食中、および FOS 摂食後の期間ごとに平均した結果を図 1B に、またサンプル毎の IgA 量を図 1C に示す。IgA 量の変動は個体によって大きく異なり、ID4 および ID5 は FOS 摂食に伴い IgA 量が増加傾向にあったが、それら以外の検体では FOS の摂食による IgA 量の大きな変動は見られなかった (図 1B および C)。

2. 腸内細菌叢解析

FOS を摂食した際の腸内細菌叢の変動を DGGE 法を用いて評価した。ゲルのバンドパターンはマーカーに対するバンドの相対位置と強度で数値化を行い、それぞれを比較するために多変量解析手法のひとつである主成分分析を用いて解析を行った。その結果、個人間の腸内細菌

叢構成のプロファイルが大きく異なることが示され、個人間の違いが大きいため FOS の摂食による変動を評価することができなかった (図 2A および B)。そこで次に、各個人内での FOS 摂食による腸内細菌叢の変動を調べるために、個人ごとの腸内細菌叢の構成の変化を主成分分析によって解析した。菌叢解析の結果から、各々の検体で FOS 摂食時における共通した変動は見られなかった (図 2C)。

3. 代謝物解析

FOS 摂食による代謝物の変動を評価するために、糞便から抽出した代謝産物を NMR 法によって測定した。¹H NMR のシグナルを 0.04 ppm 毎に区切り、面積強度として数値化を行った。得られた代謝物の数値プロファイルを主成分分析によって解析した結果、腸内細菌叢の場合と同様に個人による違いが大きく反映され、FOS 摂食前、FOS 摂食中、および FOS 摂食後の各期間での違いは見られなかった (図 3A および B)。これらの個人差に強く寄与しているのは 1.9 ppm や 2.4 ppm にピークをもつ代謝物であることが示唆された。個人内での代謝物プロファイルの変動を調べるために個々について主成分分析を行ったが、FOS の摂食による共通した変動は見られなかった (図 3C)。

4. 相関解析による共変動因子の探索

FOS 摂食による代謝物と腸内細菌との関係性を明らかにするために、腸内細菌叢-代謝物間の相関解析を行った。個人ごとに腸内細菌叢-代謝物間の相関係数を算出し、相関情報に基づいて階層クラスタリングを行った (図 4)。FOS 摂食により IgA 量が増加していた ID4 と ID5 由来の複数のバンドより構成されるクラスターが存在したことから、これらのバンドのシーケンス解析を行ったところ、*Bifidobacterium* sp. や *Ruminococcus* sp. などに近縁な菌であることが明らかとなった (図 5)。また、IgA 量が増加した ID4 と ID5 のみに存在する腸内細菌で構成されるクラスターには、両者に共通する代謝物由来のシグナルが存在することが明らかとなった (表 1)。

次に FOS 摂食により IgA の変動に伴って増減する代謝物を同定するために、代謝物-IgA 間の相関解析を行ったところ、FOS 摂食により IgA 量が増加した個人とそうでない個人がクラスタリングされ (図 6)、IgA 量が増加した ID4 および ID5 で共通する正または負の相関をする代謝物由来のシグナルが示された (表 2)。

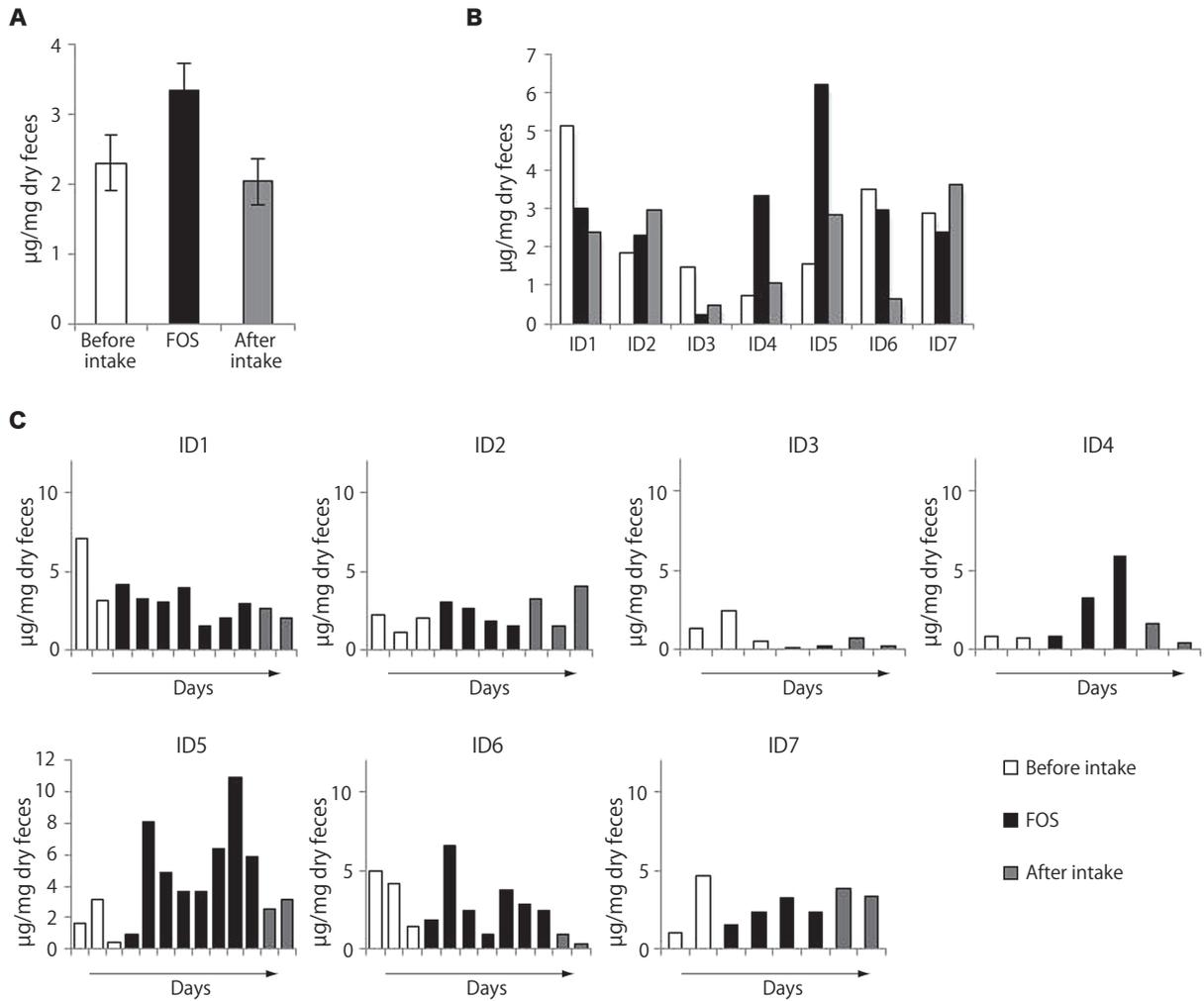


図1 FOS 摂食に伴う IgA 量の変動

A : FOS 摂食に伴う 7 人分の平均 IgA 量の変動
 B : 各個人の FOS 摂食に伴う平均 IgA 量の変動
 C : 各個人の FOS 摂食に伴う IgA 量の変動
 FOS 摂食前、中、後をそれぞれ白、黒、灰色で示す。

さらに IgA-代謝物間相関解析、腸内細菌叢-代謝物間相関解析の二つの結果から、両者で共通する代謝物由来のシグナルが存在することが明らかになった (表 3)。このことから、FOS 摂食に伴う ID4、ID5 の菌叢中の *Bifidobacterium* sp.、*Ruminococcus* sp. など近縁な菌による代謝物の変動が、IgA 量の増加に関与する可能性が示唆された。

考 察

近年、性別や年齢、BMI (Body Mass Index) 値もしくは日々の食事の傾向などにより、代謝産物プロファイルを始めとする種々の生体恒常性プロファイルに個人間の違いがあることが報告されている^{11, 12)}。本試験でも

FOS 摂食に伴う糞便中 IgA 量の変動について調べたが、糞便中 IgA 量が増加した検体は 7 名のうちの 2 名であった。また、腸内細菌叢の解析結果から腸内細菌叢は個人間で大きく異なり、それは FOS 摂食による変動よりも大きいことが明らかとなった。各検体の FOS 摂食に伴う代謝物の変動についても同様に、個人間での代謝物の違いが大きく、主成分分析のみでは FOS 摂食による個人内の変動について言及することができなかった。そこで、個人内での詳細な変動情報を抽出するために、腸内細菌叢解析情報と代謝物解析情報、および IgA 量情報の 3 者間における相関解析を行った。

FOS 摂食により IgA 量が増加した検体では、IgA 量の変動と相関する代謝物や腸内細菌が存在することが明

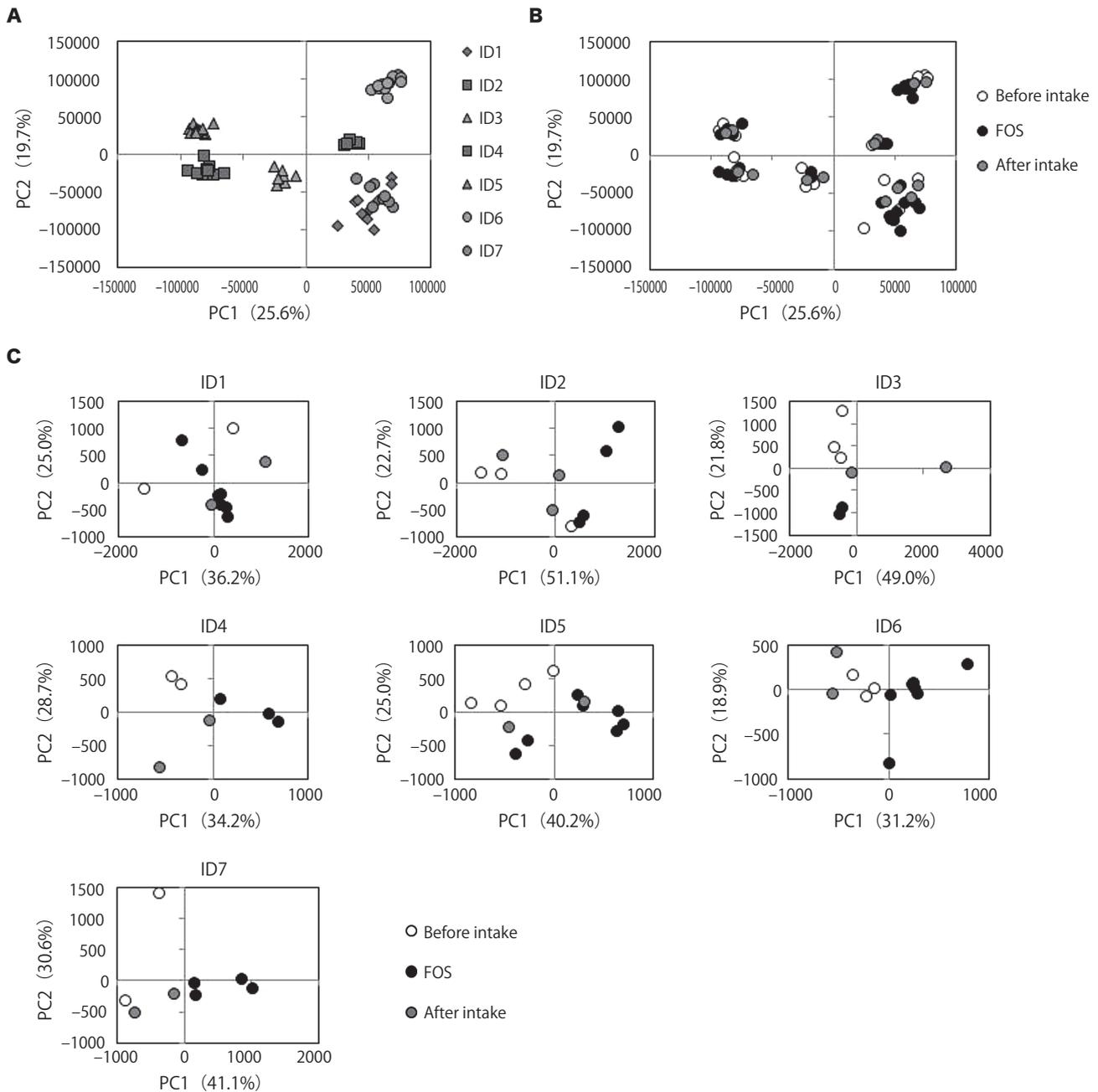


図2 FOS 摂食による腸内細菌叢変動

A, B, C : 腸内細菌叢情報の主成分分析結果

A, B は 7 人分のデータ。A では個人ごとに色分けし、B では FOS 摂食期間で色分けした。C は個人ごとのデータ。

らかとなった。このうち、IgA 量の変動と正の相関や負の相関をする代謝物の存在が明らかとなった。今後はこれらの物質同定を行う予定である。

IgA 量が増加した検体では、上述した代謝物と関連して *Bifidobacterium* sp. や *Ruminococcus* sp. の増加が見られた。ビフィズス菌は腸内において積極的に FOS を利用することが知られており¹³⁾、またビフィズス菌

の一種である *Bifidobacterium longum* が産生したアスパラギン酸やセリンを大腸菌が二次的に代謝することで、別の代謝物を産生することも報告されていることから⁷⁾、FOS の摂食により初めに *Bifidobacterium* sp. が FOS を利用してある種の代謝物を産生し、次に *Ruminococcus* sp. などがさらに代謝することで、粘膜からの IgA 分泌を促すような因子を産生した可能性が

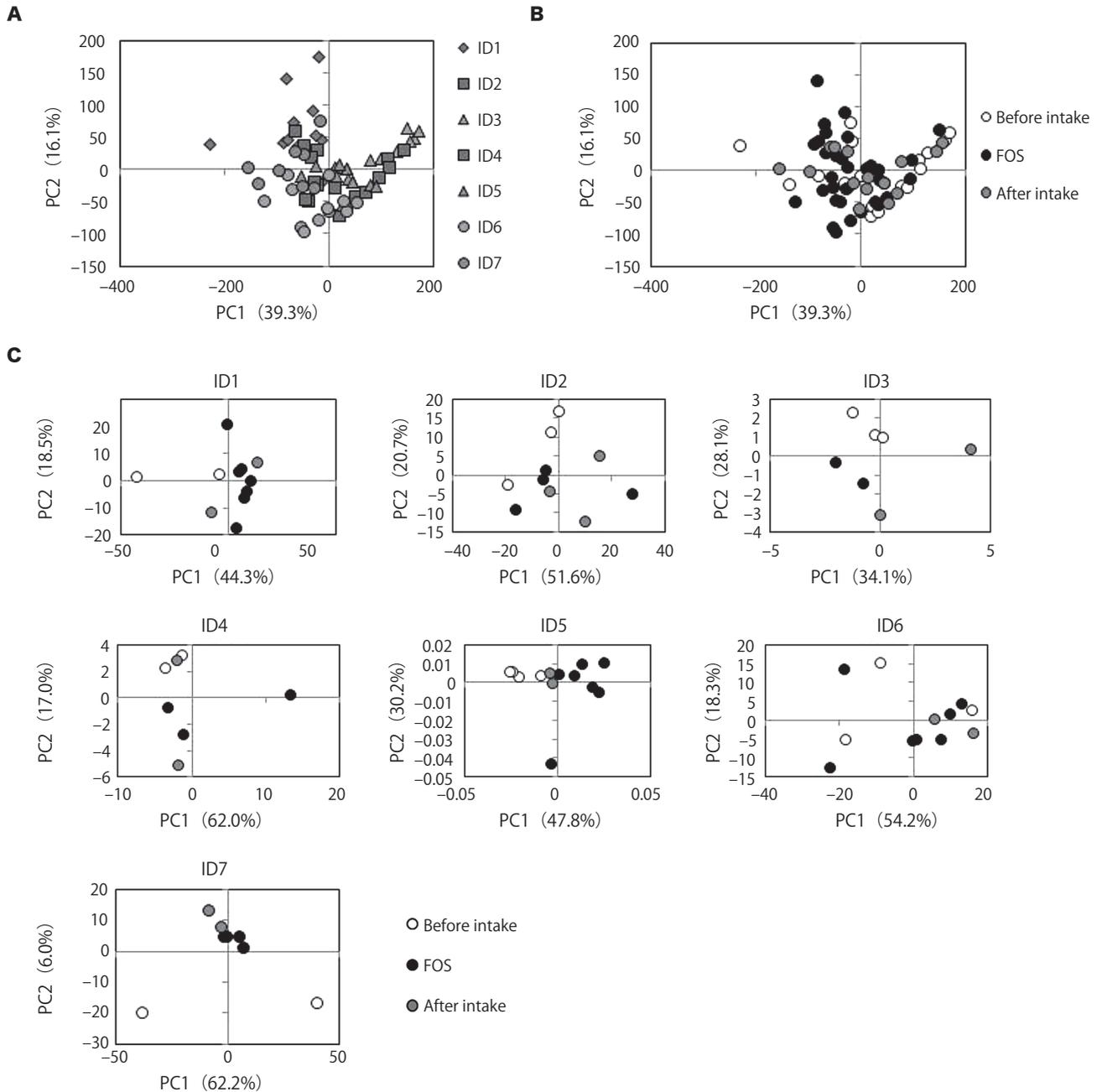


図3 FOS 摂食による代謝物変動

A, B, C: 糞便中代謝物の主成分分析結果

A, B は 7 人分のデータ。A では個人ごとに色分けし、B では FOS 摂食期間で色分けした。C は個人ごとのデータ。

示唆された。このような、いわゆる栄養共生 (cross-feeding) が FOS 摂食により生じている可能性も示唆された。

本研究では IgA -代謝物間、腸内細菌-代謝物間の相関解析から、両者で共通する代謝物が存在することが明らかとなった。近年、各個人で異なる菌群が類似の役割を担い、同様の代謝応答をするといった報告があ

り¹⁴⁾、本研究においても IgA 量が増加していた ID4 と ID5 由来の異なる腸内細菌が共通の代謝物と相関を示したことと関連が見られた。したがって、FOS 摂食による糞便中 IgA 量増加のメカニズムは、腸内細菌叢-代謝物-宿主相互作用を介した効果であると考えられる。

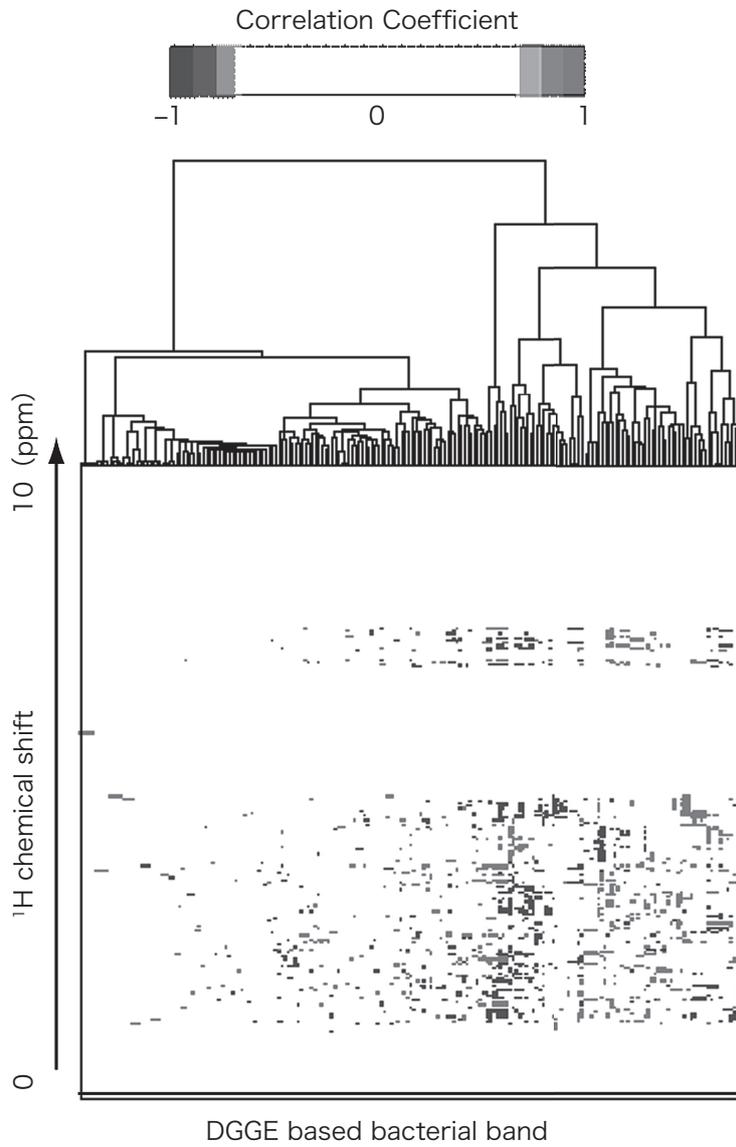


図4 FOS 摂食による腸内細菌叢変動および代謝物変動の相関

縦軸は代謝物のケミカルシフト、横軸は腸内細菌叢情報を表す。
赤は正の相関、青は負の相関を示す。
相関係数に基づいて腸内細菌叢情報の階層クラスタリング解析を行った。

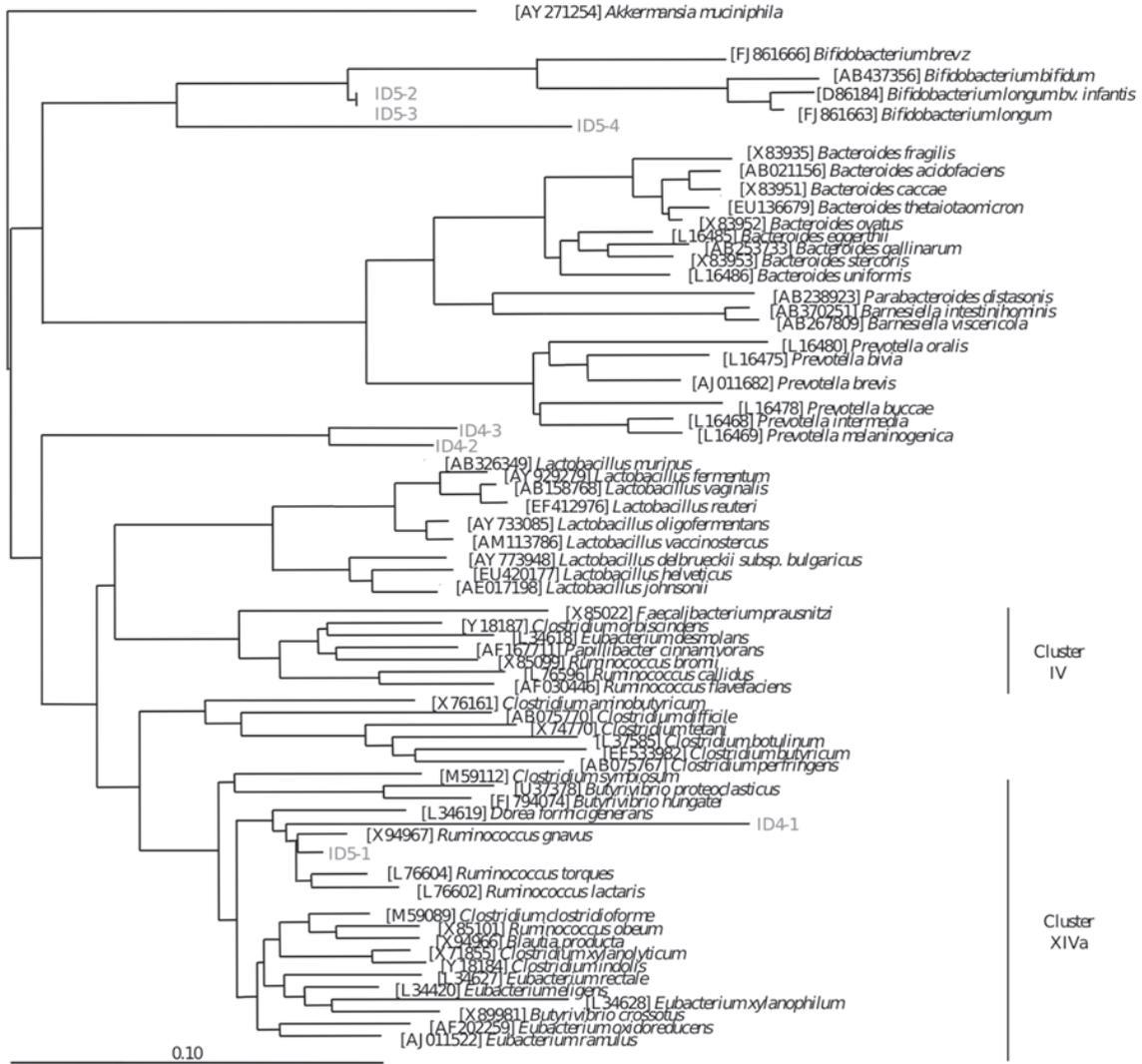


図 5 IgA 量の増加と正の相関を示した腸内細菌の 16S rRNA をコードする DNA に基づく系統樹

赤字が FOS 摂食により IgA 量が増加した ID4 および ID5 由来の腸内細菌。
ID4 では 3 種類、ID5 では 4 種類の異なる 16S rRNA をコードする DNA 配列が得られた。

表 1 ID4 および ID5 の腸内細菌叢 - 代謝物相関解析において相関のあった代謝物由来の ¹H-NMR シグナル

正の相関を示した 代謝物のケミカルシフト (ppm)	負の相関を示した 代謝物のケミカルシフト (ppm)
7.42	7.26
7.18	7.10
6.90	6.82
3.30	4.34
3.26	1.42
3.02	1.18
2.14	1.14
1.74	0.90
1.70	0.86

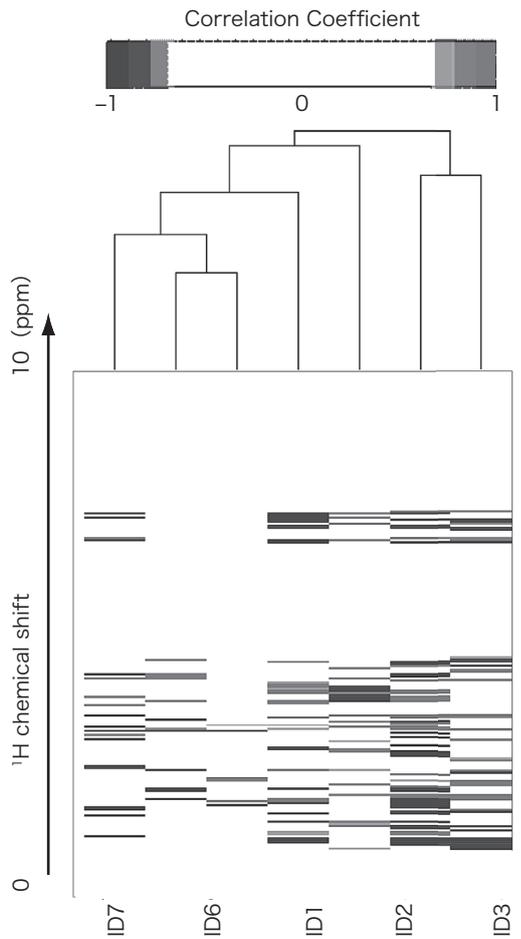


図 6 FOS 摂食による IgA 変動および代謝物変動の相関

縦軸は代謝物情報、横軸は個体 ID 番号。
赤は正の相関、青は負の相関を示す。
相関係数に基づいて各個体の階層クラスタリング解析を行った。

本研究結果から、特にヒトの腸内環境のように個人差が大きい場合の解析を行うには、異なる個人間での比較解析を行うのではなく、同一個人内での小さな変動も抽出できるような相関解析手法を用いることが有用であることが示された。したがって本解析手法は、プロバイオティクスやプレバイオティクスの評価を行うだけでなく、ヒトの腸管関連疾患のような腸内環境の変動を伴った病態の分子メカニズムの解明や、バイオマーカーの探索等にも応用することも可能ではないかと考えている。

要 約

腸内細菌叢の組成は個人ごとに大きな違いがあり、FOS 摂食による個人内での変動よりも個人間での違いの方が大きかった。腸管内代謝物に関しても個人ごとに違いはあったが、個人内での変動よりも個人間での違い

表 2 IgA- 代謝物相関解析において相関のあった代謝物由来の ¹H-NMR シグナル

正の相関を示した代謝物のケミカルシフト (ppm)	負の相関を示した代謝物のケミカルシフト (ppm)
7.42	7.26
6.90	7.14
3.98	7.10
3.62	6.82
3.30	1.42
2.14	1.38
2.02	1.10
1.70	0.90
1.02	0.86
0.98	0.82
	0.78

表 3 ID4 および ID5 において共通して相関のあった代謝物由来の ¹H-NMR シグナル

正の相関を示した代謝物のケミカルシフト (ppm)	負の相関を示した代謝物のケミカルシフト (ppm)
7.42	7.26
6.90	7.10
3.30	6.82
2.14	1.42
1.70	0.90
	0.86

の方が大きかった。個人内の腸内環境の変動を見出すために腸管内代謝物変動と腸内フローラ変動の相関解析を行ったところ、短鎖脂肪酸を含むいくつかの代謝物の変動は、腸内細菌叢の変動と相関しており、それらの菌群は個人ごとに異なった。以上のことから、FOS 摂食によるヒト腸内環境の改善効果の一端は、腸内フローラ代謝物-宿主を介した効果であると考えられたが、腸内環境の変動は各個人で異なる菌群が類似の代謝応答をしている可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人三島海雲記念財団より学術研究奨励金を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Qin, J.J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59-65 (2010) .
- 2) Sonnenburg, J.L. & Fischbach, M.A. Community Health Care: Therapeutic Opportunities in the Human Microbiome. *Sci Transl Med* 3 78ps12 (2011) .
- 3) Hosono, A. et al. Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's patch cells. *Biosci Biotech Bioch* 67, 758-764 (2003) .
- 4) Yanagibashi, T. et al. Bacteroides Induce Higher IgA Production Than Lactobacillus by Increasing Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression in B Cells in Murine Peyer's Patches. *Biosci Biotech Bioch* 73, 372-377 (2009) .
- 5) Peterson, D.A., McNulty, N.P., Guruge, J.L. & Gordon, J.I. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe* 2, 328-339 (2007) .
- 6) Fukuda, S. et al. Evaluation and Characterization of Bacterial Metabolic Dynamics with a Novel Profiling Technique, Real-Time Metabolotyping. *Plos One* 4,e4893 (2009) .
- 7) Nakanishi, Y. et al. Dynamic Omics Approach Identifies Nutrition-Mediated Microbial Interactions. *J Proteome Res* 10, 824-836 (2011) .
- 8) Hase, K. et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH (+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462, 226-230 (2009) .
- 9) Fukuda, S. et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469, 543-547 (2011) .
- 10) Date, Y. et al. New monitoring approach for metabolic dynamics in microbial ecosystems using stable-isotope-labeling technologies. *J Biosci Bioeng* 110, 87-93 (2010) .
- 11) Kochhar, S. et al. Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabonomics. *Anal Biochem* 352, 274-281 (2006) .
- 12) Walsh, M.C., Brennan, L., Malthouse, J.P.G., Roche, H.M. & Gibney, M.J. Effect of acute dietary standardization on the urinary, plasma, and salivary metabolomic profiles of healthy humans. *Am J Clin Nutr* 84, 531-539 (2006) .
- 13) Bounnik, Y. et al. Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. (vol 129, pg 113, 1999) . *J Nutr* 129, 2286-2286 (1999) .
- 14) Turnbaugh, P.J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480-484 (2009) .