

米ぬか摂取による大腸炎抑制分子機構の解明

慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科

田中 一己

要旨

玄米に含まれる米ぬかには大腸炎を抑制する効果があることが知られているが、その詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。そこで本研究では、米ぬか摂取による大腸炎抑制効果の詳細について、デキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸炎マウスモデルを用いて解析を行った。米ぬか混餌食を摂取したマウスでは対照群と比較して大腸炎が有意に抑制された。マウス便中代謝物質を網羅的に解析したところ、米ぬかそのものからは検出されなかった 5-hydroxyindoleacetate (5-HIAA) が有意に増加していることを明らかにした。5-HIAA を含むトリプトファン代謝物質のいくつかは芳香族炭化水素受容体 (AhR) を介して炎症を抑制することが知られているため、AhR 発現細胞株への添加試験を実施したところ、5-HIAA は他のトリプトファン代謝物質よりも AhR シグナルが強く活性化されることを明らかにした。いくつかのトリプトファン由来 AhR リガンドは腸内細菌によって産生されることが報告されているので、腸内細菌叢解析を実施したところ、Clostrdiales 細菌群が米ぬか摂取によって増加していた。そこで米ぬか摂取マウス便をクロロホルム処理することで芽胞形成性 Clostrdiales 細菌群を取得し無菌マウスに定着させたところ、大腸炎を有意に抑制した。以上のことから、米ぬかは芽胞形成性 Clostrdiales 細菌群の増加と、それに伴ってトリプトファンから産生された 5-HIAA が、宿主の AhR を介して大腸炎を抑制している可能性が示唆された。

クローン病と潰瘍性大腸炎からなる炎症性腸疾患 (IBD) は、消化管に慢性的な炎症を引き起こし、大腸がんのリスクを高めることが報告されている^{1,2}。IBD の発症には、免疫、遺伝、腸内細菌叢、食事などの要因が深く関わっていることが明らかになってきている³。IBD 患者は、食生活の欧米化に伴い、欧米以外の発展途上国でも爆発的に増加している⁴。このように、IBD の発症には、環境要因、特に食生活が大きな役割を果たしていることは明らかである⁵⁻⁷。国際炎症性腸疾患研究機構 (IOIBD) も食生活の重要性を示唆しており、食事介入ガイドランスを発表しているが⁸、ほとんどの食事に十分な科学的証拠がない。大腸炎は公衆衛生上重要な疾患であり、効果的な食事療法の確立が望まれている。

日本食は、大腸炎を抑制するための食事療法として注目されている⁹。例えば、日本食の一部である米 (*Oryza sativa*) の茶色い外層である米ぬか (RB) には、大腸炎抑制効果があることが報告されている^{10,11}。

しかし、RB の大腸炎抑制効果の分子メカニズムは、他の食品と同様に明らかになっていない。先行研究では、RB から分離した γ -オリザノールが NF- κ B 活性を阻害することでマウスの大腸炎を抑制することが報告されている^{12,13}。また、酵素処理した RB の食物繊維は、大腸内の短鎖脂肪酸 (SCFA) を増加させることで炎症を抑制することが報告されている¹⁴。しかし、これらの研究はすべて、RB のよく知られた抗炎症成分に焦点を当てた仮説駆動型研究であった。RB の大腸炎抑制効果の重要な因子を明らかにするためには、RB の成分が複雑であるため、従来の仮説駆動型の研究では限界があり、新しい戦略を適用する必要があると考えられる。

本研究では、メタボロゲノミクス¹⁵を用いたデータ駆動型の戦略を適用した。これは、メタボローム解析とマイクロバイーム解析を統合することで、複雑な腸内エコシステムの理解を促進するものである。本アプローチを適用し、RB の摂取によって増加する腸内細菌による宿主の代謝の補完機能を明らかにした。データ駆動型のアプローチは、他の食品が生体に影響を与えるメカニズムについて新たな知見を提供し、複雑な腸内環境栄養学研究の理解に貢献することが期待される。

実験方法

マウスと餌

本研究で使用した 5 週齢の C57BL/6J マウスは日本クレアから購入した。マウスは SPF 環境で飼育された。大腸炎は 2.0% デキストラン硫酸ナトリウム水溶液 (分子量 36,000-50,000, MP Bio Japan) を飲水投与して誘導した。餌は AIN-93G (オリエンタル酵母) を自由摂取させた。RB はオリザ油化から提供された。

DAI 評価

大腸炎の重症度を評価するために disease activity index (DAI) を評価した。DAI は体重減少率 (0: <1%; 1: 1-5%; 2: 5-10%; 3: 10-15%; 4: >15%)、血便 (0: negative, 1: +, 2: ++, 3:

+++ , 4: ++++), 下痢 (0: normal, 2: soft, 4: diarrhea)のスコアを平均して算出した。

16S rRNA 遺伝子解析

糞便から先行研究に従って DNA を抽出した¹⁶。抽出された DNA は RNA は RNase A 処理で除去し、標準的な phenol/chloroform/isoamyl alcohol 法で精製した。精製された DNA からユニバーサルプライマー-27Fmod (5'-AGRGTGGATYMTGGCTCAG-3')と 338R(5'-TGC-TGCCTCCCGTAGGAGT-3')を使って 16S rRNA 遺伝子の V1-V2 領域を PCR で増幅した¹⁷。PCR 産物を先行研究に従って前処理し、MiSeq を用いて解析した¹⁸。得られた配列は QIIME2 2021.2 を用いて解析した。

メタボローム解析

メタボローム解析をキャピラリー電気泳動質量分析計(CE-MS)を用いて先行研究にしたがって実施した^{18,19}。

実験結果及び考察

まず、米ぬかの大腸炎抑制効果を検証するためにマウスに米ぬかを与えた時の大腸炎重症度を評価した (図 1A)。体重減少率 (図 1B)、大腸炎重症度 (DAI) (図 1C)、大腸の長さの短縮 (図 1D)は米ぬか摂取によって抑制される傾向にあった。

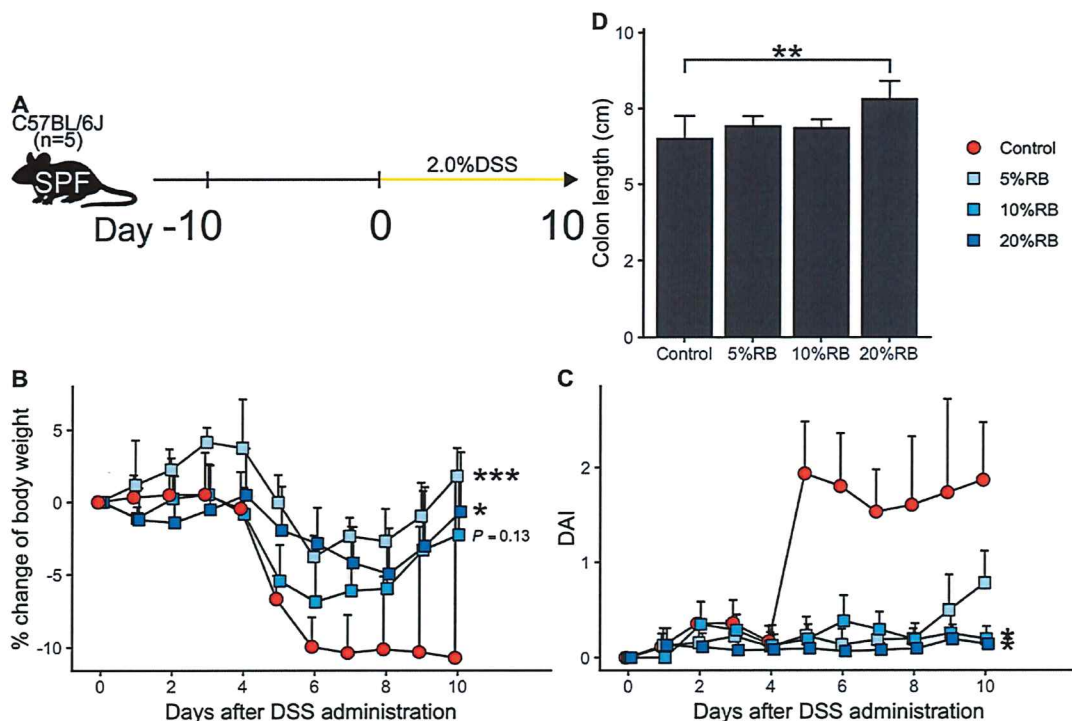


図 1. 米ぬか摂取による大腸炎抑制効果. (A) 試験スケジュール, (B) 体重減少率, (C) 大腸炎重症度 (DAI), (D) 大腸の長さを示している. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Dunnett test).

米ぬかを摂取した時の腸内環境を明らかにするために便中メタボローム解析を実施した。PCA 解析の結果、PC2 で通常食と米ぬか食摂取マウスがわけられ、寄与率の高い代謝物質が明らかになった (図 2A と B)。さらに、エンリッチメント解析を実施した結果、米ぬか摂取マウスではトリプトファン代謝が亢進している可能性が示唆された。トリプトファン代謝に関与する代謝物質のうち、5-hydroxyindoleacetate (5-HIAA) は米ぬか摂取によって著しく増加しており、PCA 解析でも寄与率が高い代謝物質であった (図 2C と D)。トリプトファン代謝物質の一部は宿主の芳香族炭化水素受容体 (AhR) を活性化させることで大腸炎を抑制することが知られている。5-HIAA の AhR 活性化能については報告がないので、AhR を安定発現させた細胞株を用いて試験した。結果として 5-HIAA は高い AhR 活性化能があることが明らかになった (図 3)。

トリプトファン代謝経路の AhR リガンドのいくつかは腸内細菌によって産生されることが報告されているので、米ぬか摂取時の腸内細菌叢解析を実施した (図 4A)。特に米ぬか摂取によって Clostridiales が増加していた (図 4B)。蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション解析でも米ぬか特異的繊維を分解するような形で *Clostridium* Cluster XIV が増殖している様子が見られた。

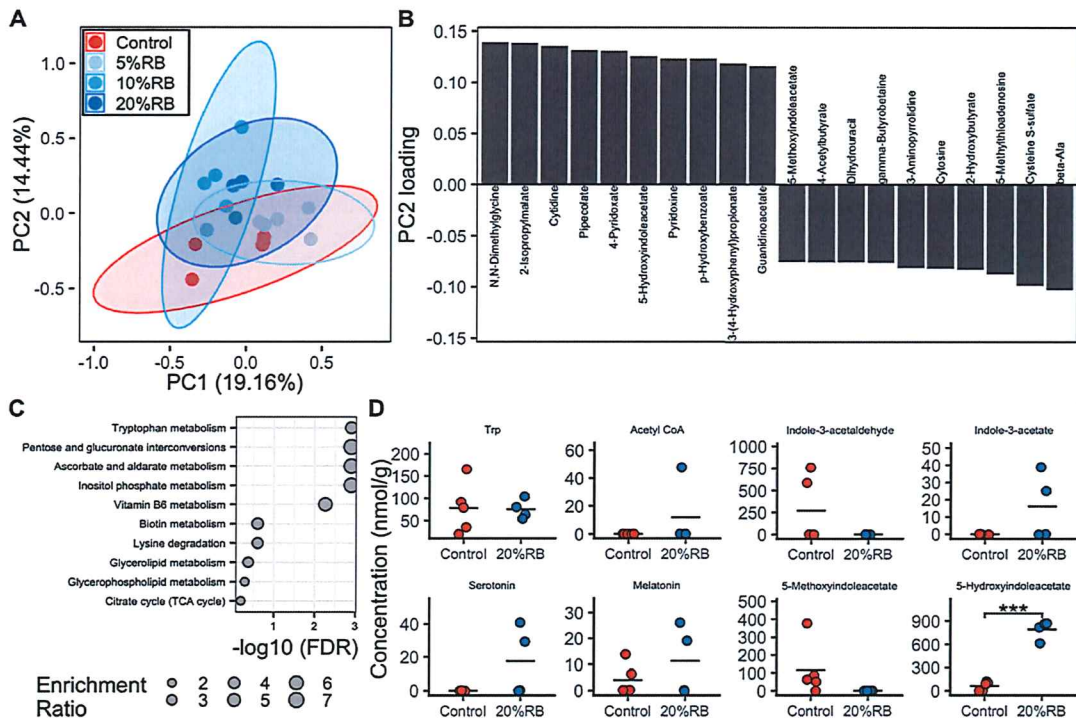


図 2. 便中メタボローム解析結果。マウスの便中メタボローム解析を CE-TOFMS を用いて測定した。PCA 解析結果 (A) と PC2 において寄与率の高い 20 代謝物質 (B) を示している。また、エンリッチメント解析 (C) とトリプトファン代謝関連代謝物質濃度 (D) を示している。*** $P < 0.001$ (Mann-Whitney U test)。

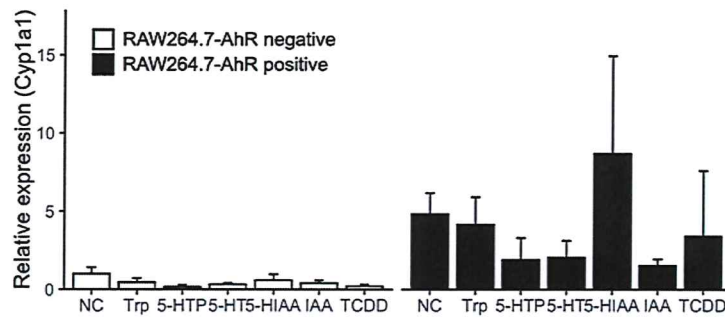


図3. 5-HIAAのAhR活性化能の評価。(A) AhR安定発現RAW264.7細胞にAhRを投与した時のAhR下流遺伝子Cyp1a1の発現量をqPCRで定量した。3回独立して試験するうちの1回目のデータを示している。

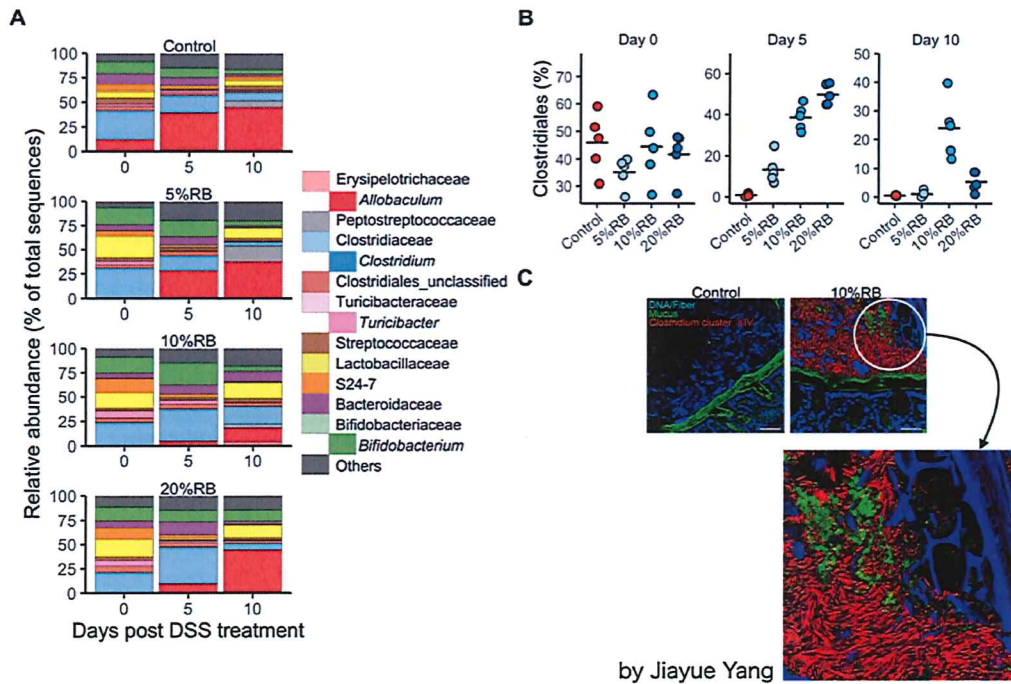


図4. 米ぬか摂取マウス便中細菌叢解析結果。(A) 相対的な腸内細菌叢組成, (B) Clostridialesの相対存在量, (C) マウス大腸の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション画像を示している。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (Dunnnett test)。

米ぬか摂取で Clostridiales が増加していることが分かったので、無菌マウスに Clostridiales 群を投与した時の大腸炎抑制効果の評価した (図 5A)。作成した Clostridiales 群定着マウスの腸内細菌叢を解析した結果, 目的の Clostridiales が9割以上を占めていた。この Clostridiales 群定着マウスは Lactobacillus 群定着マウスや無菌マウスと比較して大腸炎を有意に抑制した (図 5C-E)。さらに, 便中メタボローム解析の結果, Clostridiales 群定着マウスで 5-HIAA

が増加していることが明らかになった (図 5F).

現在, Clostridiales 群から大腸炎抑制細菌を特定するために単離を進めている. 今後は単離した細菌をそれぞれ無菌マウスに投与して大腸炎抑制効果を検証することで大腸炎抑制に重要な腸内細菌の特定を行いたい.

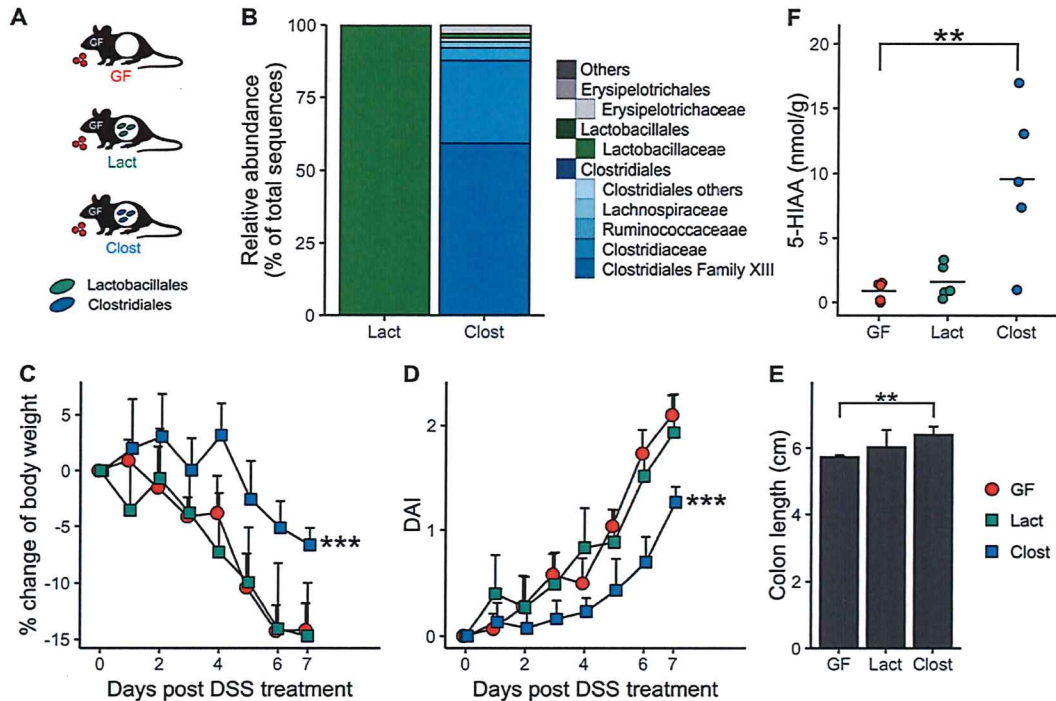


図 5. Clostridiales 定着マウスの大腸炎抑制効果. (A) 試験群, (B) それぞれの群の DSS 投与前の腸内細菌叢組成, (C) 体重減少率, (D) DAI, (E) 大腸の長さ, (F) DSS 投与前の便中 5-HIAA 濃度を示している. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Dunnett test).

謝辞

本研究を遂行するにあたり, 研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団の皆様にご心より感謝申し上げます.

参考文献

1. Kaplan, G. G. The global burden of IBD: From 2015 to 2025. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **12**, 720–727 (2015).
2. Olén, O. *et al.* Colorectal cancer in ulcerative colitis: a Scandinavian population-based cohort study. *Lancet* **395**, 123–131 (2020).
3. Kaplan, G. G. & Ng, S. C. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **152**, 313–321.e2 (2017).
4. Ng, S. C. *et al.* Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* **390**, 2769–2778 (2017).
5. Ananthakrishnan, A. N. *et al.* Environmental triggers in IBD: A review of progress and evidence.

- Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **15**, 39–49 (2018).
6. Schreiner, P. *et al.* Nutrition in Inflammatory Bowel Disease. *Digestion* **101**, 120–135 (2020).
 7. Chiara, M. M., Franco, S., Marco, P., Antonio, G. & Donato, M. G. A. Nutrition, ibd and gut microbiota: A review. *Nutrients* **12**, (2020).
 8. Levine, A. *et al.* Dietary Guidance From the International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Diseases. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **18**, 1381–1392 (2020).
 9. Kanai, T., Matsuoka, K., Naganuma, M., Hayashi, A. & Hisamatsu, T. Diet, microbiota, and inflammatory bowel disease: Lessons from Japanese foods. *Korean Journal of Internal Medicine* **29**, 409–415 (2014).
 10. Islam, J. *et al.* Dietary supplementation of fermented rice bran effectively alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Nutrients* **9**, (2017).
 11. Sirithunyalug, B. *et al.* Development of colorectal-targeted dietary supplement tablets containing natural purple rice bran oil as a colorectal chemopreventive. *Nutrients* **10**, (2018).
 12. Islam, M. S. *et al.* Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. *Br. J. Pharmacol.* **154**, 812–824 (2008).
 13. Reddy, K. V. K., Maheswaraiyah, A. & Naidu, K. A. Rice bran oil and n-3 fatty acid-rich garden cress (*Lepidium sativum*) seed oil attenuate murine model of ulcerative colitis. *International Journal of Colorectal Disease* **29**, 267–269 (2014).
 14. Komiyama, Y. *et al.* New prebiotics from rice bran ameliorate inflammation in murine colitis models through the modulation of intestinal homeostasis and the mucosal immune system. *Scand. J. Gastroenterol.* **46**, 40–52 (2011).
 15. Ishii, C. *et al.* A metabologenomic approach reveals changes in the intestinal environment of mice fed on american diet. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 4079 (2018).
 16. Furusawa, Y. *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**, 446–50 (2013).
 17. Kim, S. W. *et al.* Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. *DNA Res.* **20**, 241–253 (2013).
 18. Murakami, S. *et al.* The Consumption of Bicarbonate-Rich Mineral Water Improves Glycemic Control. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2015**, 824395 (2015).
 19. Mishima, E. *et al.* Alteration of the Intestinal Environment by Lubiprostone Is Associated with Amelioration of Adenine-Induced CKD. *J Am Soc Nephrol* **26**, 1787–1794 (2015).