

常在性腸内細菌叢の産生する生理活性代謝産物の探索

東京大学医学部附属病院循環器内科

ユビキタス予防医学講座

池田 祐一

1. はじめに

消化管は免疫系、神経系、内分泌系と密接に連携して腸管イントラネットを構築することにより、外界とのインターフェイスとして宿主の恒常性維持に重要な役割を果たしている。消化管内には乳酸菌やビフィズス菌などのプロバイオティクス(善玉腸内細菌)を含む 100 兆個もの莫大な数の細菌が常時存在し(常在性腸内細菌叢)、これらが腸管イントラネットを介して宿主の生理機能に影響を及ぼす。そこで近年、常在性腸内細菌叢の制御を通じて各種疾患を予防しようとする試みに注目が集まっている。実際に、乳酸菌やビフィズス菌などのプロバイオティクスに関連した健康食品市場は現時点において既に約 5500 億円規模に達し、今後さらに増大する傾向にある。しかし、腸内細菌叢が腸管イントラネットにどのようなメカニズムで影響を及ぼしているかについては未だ十分に理解が進んでいない。

常在性腸内細菌叢のメタゲノム解析により腸内細菌ゲノム上には代謝産物を産生する際に必要な酵素群(ヒトが本来有しない酵素群)が多数存在することが判明した。よって腸内細菌は多彩な代謝産物を産生することが予想される。そこで、腸内細菌叢が腸管イントラネットに影響を及ぼすメカニズムの一つとして“腸内細菌叢から産生される代謝産物が外来性ホルモン(シグナル伝達物質)として宿主細胞に作用する”との仮説を想起した。実際に、腸内細菌の主な代謝産物の一つである短鎖脂肪酸は、宿主腸管上皮細胞に存在する短鎖脂肪酸受容体 GPR41 および GPR43 (これらは G タンパク質共役型受容体(GPCR)群に属する分子である)を介して宿主の生体内エネルギー調節に寄与することが報告されている(Samuel BS, et al. PNAS 2008, Kimura I, et al. Nat Commun. 2013)。

GPCR はペプチド、核酸、脂質などの多種多様な物質に対して応答を示す受容体分子群であるため、短鎖脂肪酸以外の低分子代謝産物を認識する GPCR が存在する可能性は高い。そこで、前述の仮説をさらに発展させ“腸内細菌叢の産生する短鎖脂肪酸以外の低分子代謝産物も GPCR のリガンドとして働き宿主の生理機能に影響を及ぼす”との作業仮説を立てた。

本申請研究においては、この作業仮説を検証すべく、腸内細菌叢の産生する低分子代謝産物を、各種 GPCR に対して網羅的かつ系統的にスクリーニングすることにより新規低分子リガンド(腸内細菌叢由来代謝産物)-GPCR ペアの同定を目指す。

2. 方法

① メタボロミクス解析を導入したCandidateアプローチ

慶応大学薬学部長谷耕二研究室との共同研究にて、無菌マウス、SPF マウス、SPF マウスの糞便を移植された無菌マウスからそれぞれ盲腸内容物を採取する。それらをメタボロミクス解析し、常在性腸内細菌叢依存的なメボライト(無菌マウスでは存在しないが、SPF マウス及び SPF マウスの糞便を移植された無菌マウスには存在するもの)を同定する。同定されたメボライトは、申請者が所有する GPCR ライブラリー上でスクリーニングする。

② 各種疾患モデルマウスの糞便、被験者内視鏡検査排液等を出発材料とし、そこから抽出した低分子化学物質画分より新規低分子GPCRリガンドを生化学的に精製する：Unbiasedアプローチ

腸管代謝産物は、腸内細菌叢の生態や構成に影響を与える種々の条件(加齢、食餌、疾病など)に伴い変化する。そこでそれらの条件の異なるマウス及び健康者から広く糞便、内視鏡検査排液等を採取する。採取した試料は、随時アルコールあるいはアセトンなどの共溶媒で抽出し保存する。各抽出液の不溶性画分を遠心分離により除去後、低分子化学物質を含む上清を回収して混合する。回収した抽出液を蒸発乾固して低分子化学物質画分とする。

低分子化学物質画分をより再現性良く効果的にスクリーニングするためには、細かく分画した低分子化学物質画分ライブラリーを作製する必要がある。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、逆相クロマトグラフィー(20 画分)及びイオン交換クロマトグラフィー(20 画分)により二次元に展開した合計 400 画分を調製し、各画分を GPCR ライブラリー上でスクリーニングする。

③ GPCR ライブラリースクリーニング

GPCR ライブラリースクリーニングの際に用いるアッセイ系として、G タンパク質の活性化を介したシグナルを検出できる従来法だけでなく、近年注目されているβ-arrestin を介したシグナルを検出できる系も使用する。本申請研究においては、細胞内に容易に移行することができる低分子物質がリガンド候補となるため、GPCR の活性化を downstream シグナルの変化によって間接的に検出する従来法よりも GPCR の活性化をダイレクトに受容体レベルでモニターできるβ-arrestin アッセイ系が適している。以前は多数の GPCR に対して簡便か

つ迅速にβ-arrestin シグナルを検出する方法は無かったが、申請者はこの問題の抜本的な改善のため、一過性に発現させた種々GPCRに対してもβ-arrestin との複合体形成の定量が可能となるユニバーサルなインディケーター細胞株の開発に成功した (Ikeda Y, Kumagai H, et al. Cell 2013)。この独自で robust なβ-arrestin アッセイ系を本申請研究では使用する。

3. 実験結果及び考察

① メタボロミクス解析を導入したCandidateアプローチ

連携研究者である長谷との共同研究にて、無菌マウス、SPF マウス、SPF マウスの糞便を移植された無菌マウス（糞便移植から3日後、6日後、9日後、16日後、23日後にサンプル採取）の7群からそれぞれ盲腸内容物を採取し、メタボロミクス解析を行った。その結果、常在性腸内細菌叢依存的なメタボライトを54種類同定することに成功した（未発表データ）。今後はこれらのメタボライトを申請者が所有するGPCRライブラリー上でスクリーニングする予定である。

② 各種疾患モデルマウスの糞便、被験者内視鏡検査排液等を出発材料とし、そこから抽出した低分子化学物質画分より新規低分子GPCRリガンドを生化学的に精製する：Unbiasedアプローチ

各種検体採取に向けて準備をすすめている。

③ GPCR ライブラリースクリーニング

申請者らはこれまでの経験から、β-arrestin アッセイ系がペプチド性リガンドを認識するGPCRにおいては非常に感度よく運用できることを知っている。しかしこのアッセイ系が脂質や核酸などの低分子リガンドを認識するGPCRにおいても同様の感度をもって運用され得るかどうかは不明である。そこで既知の低分子リガンドを認識するGPCRを全てクローニングし、約100種類のGPCRからなるGPCRライブラリーを構築した。そして、このGPCRライブラリー上でβ-arrestin アッセイが効率よく運用され得るか検討した。

驚くべきことに約半数の受容体においてリガンド刺激によって検出されるべき活性が予想外に低いことが判明した（図1）。この実験結果を踏まえ新しいアッセイ系の樹立を検討せざるを得なくなった。

Gタンパク質の活性化を下流シグナルの変化でモニターする従来のアッセイ系には以下に述べる問題点がある。

GPCRはGs、Gq/11、Gi/o、G12/13にカップルすることが知られている。Gs、Gi/oにカップルするGPCRは細胞内のcAMPレベルを変化させるのでCRE (cAMP Response Element) -luciferase レポーターによりその活性化状態をモニターできる。Gq/11にカップルするGPCRはカルシウム関連シグナルを活性化するのでNFAT (Nuclear factor of activated T cells) -luciferase レポーターによりその活性化状態をモニターできる。G12/13にカップルするGPCRに関しては、その活性化状態を鋭敏に検出できる優れたレポーターは現時点で存在しない。またオーファンGPCRにおいては、そもそも受容体を活性化するリガンドが存在せず、さらに受容体アミノ酸配列からどのタイプのGタンパク質とカップルするかを推測することも困難であるため、標的受容体がどのシグナル経路を活性化するかを事前には知ることはできない。よって、スクリーニングの際には全てのGタンパク質の下流シグナルを網羅的に検出するためには複数のアッセイ系を併行して実施する必要がある。

この煩雑性を解決すべく、一つのフォーマットで全てのGタンパク質の活性化を検出することができる汎用性の高いアッセイ系の開発が既に数多く試みられている。近年、東北大学のグループによりTransforming growth factor-α (TGFα) shedding assayが報告された。このアッセイ系では、まず標的GPCRとアルカリフォスファターゼ標識された膜型TGFα (AP-TGFα)が細胞膜上に同時に強制発現された細胞を用意する。この細胞において標的GPCRがリガンド刺激されると、細胞膜上に内因性に発現しているTNFα-converting enzyme (TACE)の活性化を介して、AP-TGFαが培養上清中へとsheddingされてくる。リガンド刺激によるGPCRの活性化状態は培養上清へと分泌されたAP-TGFαの量とよく相関するので、培養上清中のアルカリフォスファターゼ活性を測定することによってGPCRの活性化状態を定量することができる。この方法によって検定された116種類に及ぶGPCRのうち104種類においてリガンド活性が検出されたと報告されており、このアッセイ系は非常に優れた汎用性を有すると考えられた。申請者が

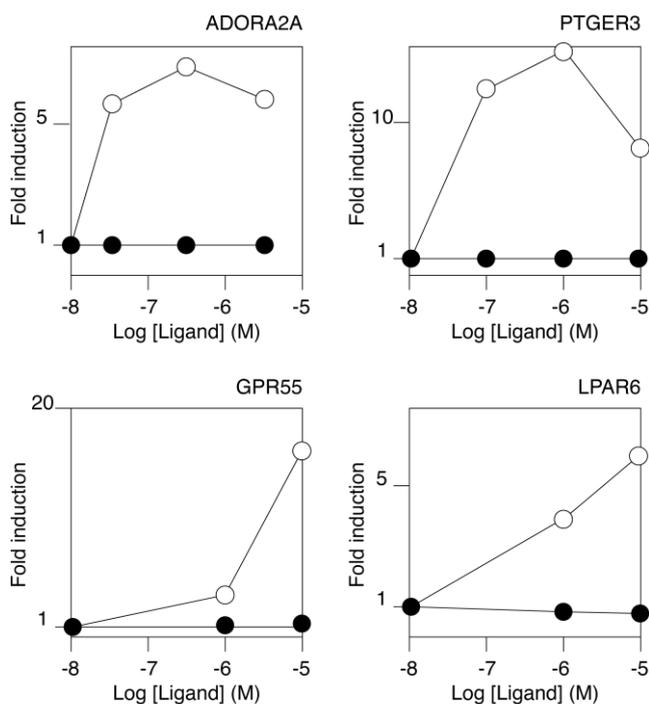


図1: 各種GPCRにおけるβ-arrestinアッセイ(黒丸)と新規開発アッセイ(白丸)との比較

このアッセイ系は非常に優れた汎用性を有すると考えられた。申請者が

知る限り、TGF α shedding assay は現在まで論文発表されている G タンパク質の活性化をモニターするアッセイ系の中で最も優れたものの一つである。

申請者も一つのフォーマットで全ての G タンパク質の活性化を検出することができるアッセイ系の開発を本申請研究内で独自に行った(図1)。申請者が新規に樹立したアッセイ系は 96 well plate を用いてワンステップで施行できる点において前述の TGF α shedding assay より簡便である。また予備実験の結果から汎用性、感度においても TGF α shedding assay より優れていることがわかりつつある。この開発中のアッセイ系を今後さらに発展させ、既に一部の GPCR では運用できている上記 β -arrestin アッセイと併用して GPCR リガンドスクリーニングを継続していく予定である。

4. 発表論文、参考文献

2016 年度

1. Sato H, Suzuki J, Aoyama N, Watanabe R, Kaneko M, Shiheido Y, Yoshida Y, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M, Izumi Y: A periodontal pathogen porphyromonas gingivalis deteriorates isoproterenol-induced myocardial remodeling in mice. *Hypertens Res.* in press, 2016(査読あり)
2. Suzuki J, Sato H, Kaneko M, Yoshida A, Aoyama N, Akimoto S, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Izumi Y, Isobe M, Komuro I: Periodontitis and myocardial hypertrophy. *Hypertens Res.* in press. 2016(査読あり)
3. Kumagai H, Ikeda Y: Pulse-chase covalent labeling technique for monitoring GPCR endocytosis. *Springer Protocols.* in press. (*corresponding author)(査読あり)
4. Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I: Pathophysiological role of chronic inflammation in aging-associated diseases. *Chronic inflammation: Elucidation and Control of the Mechanisms, Springer Japan.* in press.(査読あり)
5. Ono S, Saito I, Ikeda Y, Fujishiro M, Komuro I, Koike K: Current practices in the management of antithrombotic therapy during the periendoscopic period for patients with cardiovascular disease. *Int Heart J.* 57:530-534, 2016(査読あり)
6. Ikeda Y, Kumagai H, Motozawa Y, Suzuki J, Akazawa H, Komuro I: Understanding vascular diseases: Lessons from premature aging syndromes. *Can J Cardiol.* 32:650-658, 2016(査読あり)
7. Suzuki J, Shimamura M, Suda H, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Isobe M, Komuro I, Morishita R: Current therapies and investigational drugs for peripheral arterial disease. *Hypertens Res.* 39:183-191, 2016(査読あり)
8. Fujishiro M, Ikeda Y: Re-bleeding after endoscopic hemostasis for peptic ulcer bleeding: Is enough said or are other factors important? *Dig. Dis. Sci.* 61:1424-1425, 2016(査読あり)
9. Ikeda Y*, Kumagai H, Motozawa Y, Suzuki J: Growth differentiation factor 15 (GDF15) as a reliable biomarker for cardiovascular risk assessment. *Int Heart J.* 57:1-2, 2016. (*corresponding author)(査読あり)
10. Suzuki J, Imai Y, Aoki M, Fujita D, Takeda N, Aoyama N, Wakayama K, Ikeda Y, Kumagai H, Akazawa H, Izumi Y, Isobe M, Komuro I, Hirata Y: Periodontitis may deteriorate sinus of valsalva dilatation in marfan syndrome patients. *Int Heart J.* 57:456-460, 2016(査読あり)
11. Shiheido Y, Maejima Y, Suzuki J, Aoyama N, Kaneko M, Watanabe R, Sakamaki Y, Wakayama K, Ikeda Y, Akazawa H, Ichinose S, Komuro I, Izumi Y, Isobe M: Porphyromonas gingivalis, a periodontal pathogen, enhances myocardial vulnerability, thereby promoting post-infarct cardiac rupture. *J Mol Cell Cardiol.* 99:123-137, 2016(査読あり)
12. Kobayashi N, Suzuki J, Aoyama N, Sato H, Akimoto S, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Izumi Y, Isobe M: Toll-like receptor 4 signaling plays a critical role in Porphyromonas gingivalis accelerated neointimal formation after arterial injury in mice. *Hypertens Res.* 39:717-722, 2016(査読あり)
13. Watanabe R, Suzuki J, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M: Angiotensin II receptor blocker irbesartan attenuates cardiac dysfunction induced by myocardial infarction in the presence of renal failure. *Hypertens Res.* 39:237-244, 2016(査読あり)
14. Zempo H, Suzuki J, Watanabe R, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M: Cacao polyphenols ameliorate autoimmune myocarditis in mice. *Hypertens Res.* 39:203-209, 2016(査読あり)
15. Izumi M, Ikeda Y*, Yamashita H, Asaoka Y, Fujishiro M, Shin M, Abo Y: Safety and effectiveness of endovenous laser ablation combined with ligation for severe saphenous varicose veins in Japanese patients. *Int Heart J.* 57:87-90, 2016 (*corresponding author)(査読あり)