

宿主エネルギー代謝における腸内細菌代謝産物の
役割に関する研究

2023

清水 秀憲

目次

略語表

序論	5
第1章 プロバイオティクスが腸内細菌叢に及ぼす影響.....	15
第1節 プロバイオティクス由来の代謝産物がヒト腸内細菌叢に及ぼす影響.....	15
第2節 プロバイオティクス投与による腸内細菌叢の変化および生体への影響.....	20
第3節 考察	26
第4節 小括	27
第2章 短鎖脂肪酸の経口摂取による宿主エネルギー代謝機能制御に与える影響.....	28
第1節 食品由来の短鎖脂肪酸による代謝機能の改善.....	28
第2節 短鎖脂肪酸受容体欠損マウスを用いた宿主エネルギー代謝機能制御メカニズム	43
第3節 肝臓の代謝機能改善における GPR41 の役割.....	49
第4節 考察	54
第5節 小括	57
第3章 PYY 分泌における短鎖脂肪酸受容体 Olfr78 の機能解析	58
第1節 短鎖脂肪酸受容体 Olfr78 の機能解析	58
第2節 腸内細菌由来の短鎖脂肪酸による Olfr78 を介した PYY 分泌.....	67
第3節 考察	73
第4節 小括	76
総括	77
謝辞	80
参考文献	81

略語表

Ace : Acetate

Akk. : *Akkermansia*

Bifido. : *Bifidobacterium*

BLAST : Basic local alignment search tool

BMI : Body mass index

But : n-Butyrate

cAMP : cyclic adenosine monophosphate

cfu : colony forming unit

Chrebp : Carbohydrate-responsive element binding protein

Christ. : *Christensenella*

DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole

DMEM : Dulbecco's modified eagle medium

DNA : Deoxyribonucleic acid

Dox : Doxycycline

EtOH : Ethanol

Fas : Fatty acid synthase

FBS : Fetal bovine serum

FOS : Fructo-oligosaccharides

GAM : Gifu anaerobic medium

GLP-1 : Glucagon-like peptide-1

GPCRs : G protein-coupled receptors

HEK : Human embryonic kidney

HFD : High fat diet

IBMX : 3-Isobutyl-1-methylxanthine

ITT : Insulin tolerance test

JCM : Japan collection of microorganisms

Lacto. : *Lactobacillus*

LFD : Low fiber diet

LPL : Lipoprotein lipase

MRS : de Man, rogosa, and sharpe

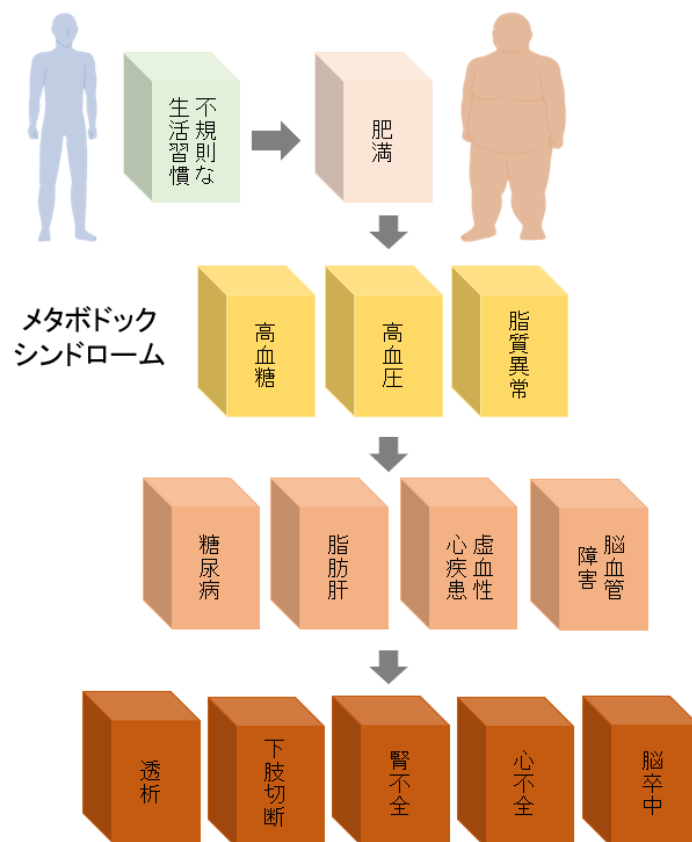
NC : Normal chow
NEFA : Non-esterified fatty acid
OGTT : Oral glucose tolerance test
Olfr : Olfactory receptor
OTU : Operational taxonomic unit
PBS : Phosphate buffered saline
PCR : Polymerase chain reaction
PFA : Paraformaldehyde
PKA : Protein kinase A
Pro : Propionate
PYY : Peptide YY
QIIME : Quantitative insights into microbial ecology
QOL : Quality of life
RNA : Ribonucleic acid
Rumino. : *Ruminococcus*
SCFAs : Short chain fatty acids
siRNA : small interfering RNA
STC-1 : Secretin tumor cell line
TG : Triglyceride
TYG : Trypticase yeast extract glucose
WAT : White adipose tissue
WT : Wild type

序論

肥満

近年、過度な高カロリーの食事摂取、運動不足など生活習慣の乱れにより、日本を含む先進諸国では、肥満者の割合が急激に増加している。2021 年の報告によれば、世界の成人の約 20 億人が肥満者であると言われており、世界的に大きな社会問題となっている¹⁾。日本肥満学会によって制定された肥満診療ガイドライン（2022 年版）によると、肥満とは、脂肪組織に脂肪が過剰に蓄積した状態を指し、体格指数（BMI = 体重 (kg) / 身長(m)²）が 25 以上であると定義されている²⁾。肥満が進行すると、2 型糖尿病や脂肪肝などの代謝性疾患を発症し、さらに虚血性心疾患や脳血管障害が引き起こされ、最終的には心不全や脳卒中、腎不全などの重大な病気を発症することが知られており、この一連の病態連鎖を「メタボリックドミノ」と呼ぶ³⁾。そのため、このメタボリックドミノの最初の段階である肥満を未然に防ぐことが出来れば、様々な病態の予防につながるといえる（Figure 1）。

Figure 1. Metabolic domino derived obesity (quoted reference 3).



肥満症

肥満症とは、肥満に起因ないし関連する健康障害を合併するか、その合併が予測され、医学的に減量を必要とする疾患と定義されている²⁾。肥満症の治療方法は、過剰なエネルギー摂取を抑えるための食事療法とエネルギー消費を高める運動療法を同時に行うことが一般的であるが、これらの内科療法だけでは困難な場合、薬物療法や外科療法を行う。

現在、日本国内で使用可能な肥満症治療薬は、マジンドール（Mazindol）のみである。マジンドールは、摂食中枢である視床下部への直接的な作用、神経終末におけるモノアミン（ノルアドレナリン、ドパミン、セロトニン）の再吸収抑制作用によって抗肥満効果を発揮する⁴⁾。しかし、本薬剤は BMI 35 以上の高度な肥満者に限定されていること、長期投与による依存性や肺高血圧症の発症リスク増加の懸念から 1 回の処方期間（14 日）と投与期間（最大 3 ヶ月）に制限が設けられている。さらに、胃部不快感をはじめとする様々な副作用が認められていることなど課題も多い。海外では、マジンドール以外に有効性・安全性が認められた肥満症治療薬の開発が進んでいるが、日本人に対しても安全かつ効果的な肥満症治療薬であるか判断するには、さらなる検討が必要である（Table 1）⁵⁾。

Table 1. Obesity treatment drugs in Japan and the United States (quoted reference 5).

日本で使用可能な肥満症治療薬（1 種類）

一般名（商品名）	効果	主な副作用
Mazindol （商品名：サノレックス） （販売：富士フィルム化学）	モノアミン（ノルアドレナリン、ドパミン、セロトニン）の再吸収抑制作用	胃部不快感、口渇、便秘、悪心、嘔吐、睡眠障害

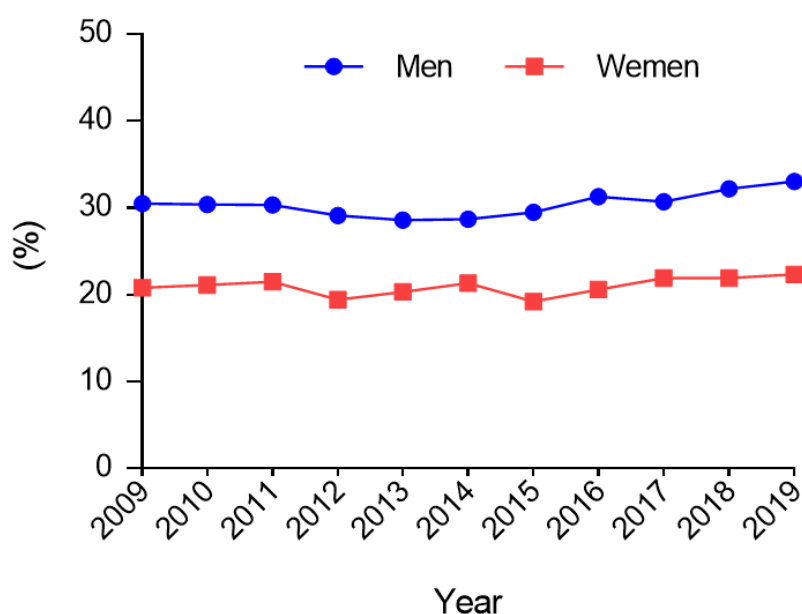
米国で使用可能な肥満症治療薬（4 種類）

一般名（商品名）	効果	主な副作用
Orlistat （商品名：Xenical） （販売：Roche 社）	脂肪リパーゼ阻害作用	脂肪便、下痢
Liraglutide （商品名：Saxenda） （販売：Nov Nordisk 社）	GLP-1 受容体賦活化作用	悪心、嘔吐、下痢
Phentermine と Topiramate の配合剤 （商品名：Qsymia） （販売：Vivus 社）	モノアミン賦活化作用 グルタミン酸受容体拮抗作用	口渇、感覚異常、不眠、めまい
Bupropion と Naltrexone の配合剤 （商品名：Contrave） （販売：Orexigen 社）	モノアミンの再吸収抑制作用 オピオイド受容体拮抗作用	悪心、便秘、頭痛、嘔吐、めまい、不眠、口渇、下痢

2019年に厚生労働省が発表した国民健康栄養調査によると、成人男性の肥満者は約3人に1人、成人女性の肥満者は約5人に1人の割合で過去10年間推移している（Figure 2）⁶⁾。日本人を含むアジア人は、BMI 25以上になると2型糖尿病の発症リスクが高くなることが知られているが⁷⁾、肥満症治療薬であるマジンドールは、BMI 35以上の高度な肥満者に限定されているため、BMI 25から35の範囲内の肥満者は、マジンドールを服用することが出来ない。そのため、食事療法や運動療法を通じて肥満を未然に防ぐことは、肥満由来メタボリックドミノによる様々な病態を予防することにつながる。

肥満由来メタボリックドミノの上流には、インスリン作用不足による慢性の高血糖状態を主徴とする糖尿病、肝臓に中性脂肪が過剰蓄積した状態である脂肪肝が含まれる。糖尿病の治療薬としては、選択的 Sodium glucose cotransporter 2 阻害薬（エンパグリフロジン、イプラグリフロジン）、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）受容体作動薬（リキシセナチド）などが開発されているが、脂肪肝の治療薬はこれまで開発されていない。脂肪肝は、進行すると肝硬変や肝癌を引き起こすこともあるため、肥満だけでなく脂肪肝も早急に解決すべき課題であり、そのメカニズム解明に向けて様々な研究が精力的に展開されている。

Figure 2. The rate of obese Japanese people (quoted reference 6).



腸内細菌

このような中、肥満や肥満由来の代謝性疾患の予防・改善に寄与する新たなターゲットとして、腸内細菌が注目されている。

ヒト腸管内腔には約 1000 種類、100 兆個以上の腸内細菌が互いに共生・拮抗関係を築きながら安定したコミュニティを形成しており、この複雑な微生物群集は、腸内細菌叢と呼ばれている⁸⁾。腸内細菌の多くは偏性嫌気性菌であるため、培養することが非常に難しく、腸内細菌の種類ならびに機能特性について不明な点が多かった。ところが、近年の次世代シーケンサーによる 16S rRNA 系統解析や質量分析計などの解析装置の発展により、腸内細菌叢における単一菌種の同定や変動だけでなく、腸内細菌叢をゲノムレベルで網羅的に解析出来るようになった。その結果、腸内細菌叢の変化により、肥満や肥満由来の代謝性疾患に影響を及ぼしていることが明らかになりつつある。

2006 年、米国ワシントン大学のゴードンらの研究グループは、肥満マウスでは非肥満マウスと比較して *Firmicutes* 門に属する腸内細菌が多く、*Bacteroidetes* 門に属する腸内細菌が少ないことを見出し、また腸内細菌の移植実験を通じて腸内細菌が肥満症に直接影響することを世界で初めて科学的に実証した。一方で、同報告では、実際ヒトにおいても肥満者が食事療法により肥満症を解消することで健常者の腸内細菌叢に近づくことを報告している⁹⁾。その他、ヨーロッパおよび中国にて実施された 2 型糖尿病患者を対象とした大規模コホート研究では、全ての 2 型糖尿病患者の腸内細菌叢において、酪酸産生 *Clostridium* 属の割合が低く、非酪酸産生 *Clostridium* 属の割合が高いことが明らかになっている^{10,11)}。日本の研究でも 2 型糖尿病患者では、健常者に比べて偏性嫌気性菌である *Clostridium coccoides* グループ、*Prevotella* 属の菌数、および腸内細菌の代謝産物の 1 つである有機酸総量（特に酢酸、プロピオン酸）の有意な減少が認められており、腸内細菌叢の 2 型糖尿病への関与が示唆されている¹²⁾。また、腸内細菌と BMI 値との関係性についても報告されている。1,000 以上の糞便サンプルをメタゲノム解析した結果、BMI 値の低い被験者の特徴的な腸内細菌として、*Christensenellaceae* 科に分類される菌種が見いだされ、実際に肥満者の腸内細菌叢を定着させたマウスに *Christensenella minuta* を投与すると体重増加の抑制が認められており¹³⁾、肥満症に関与する腸内細菌の種類についても特定されつつある。すなわち、腸内細菌叢を適切に調節することができれば、肥満や肥満由来の代謝性疾患を改善できる可能性が明らかになりつつある。

近年では、世界各国のヒト腸内細菌叢メタゲノムデータが蓄積されており、人種の違いによって腸内細菌叢の構成が大きく異なることが分かってきている。例えば、日本人の腸内細菌叢の特徴としては、他の諸外国と比較してビフィズス菌が多いこと、肉類などを中心とした動物性食品を日常的に摂取しているアメリカ人の腸内細菌叢では *Bacteroides* 属、野菜や穀物類など植物性食品を日常的に摂取しているアフリカ・南米諸国の先住民の腸内細菌叢では *Prevotella* 属が多いことが知られている^{14, 15)}。このことから、腸内細菌叢に影響を与える主要因子として、食事の種類もしくは遺伝的な要因の関与が考えられる。そこで、腸内細菌叢に影響を及ぼしている主要な因子について特定するため、5種類の系統が異なる野生型マウスを用いて検討した¹⁶⁾。はじめに、食事の種類の違いによる腸内細菌叢への影響について各種マウスを用いて検討した結果、低脂肪高繊維食を摂餌させた場合では、*Bacteroidales* 門に属する腸内細菌種が増加したのに対し、高脂肪高スクロース食を摂餌させた場合では、*Firmicutes* 門や *Verrucomicrobiales* 門に属する腸内細菌種が増加した。一方、遺伝的な要因が腸内細菌叢に影響を及ぼしているのかを検討するため、宿主-腸内細菌叢間で関連性の高い遺伝子 (*MyD88*^{-/-}, *NOD2*^{-/-}, *ob/ob*, *Rag1*^{-/-}) を欠損させたマウスを作成し、野生型マウスと同じ食事を摂餌させた場合では、野生型マウスの腸内細菌叢の変化と同様の挙動を示した。これは、日々の食事の種類が腸内細菌叢の構成に影響を与える主要因子であることを示しており、食事内容を変えることで肥満や肥満由来の代謝性疾患を未然に予防・改善出来る可能性が期待される。

プロバイオティクス

腸内細菌叢は、肥満由来の代謝性疾患と関連しており、食事内容を変えることで肥満や肥満由来の代謝性疾患を未然に予防・改善出来る可能性が明らかになりつつある。さらに、腸内細菌叢を改善する方法の1つとして、近年ではプロバイオティクスが注目されている。

プロバイオティクスとは、「腸内細菌叢のバランスを改善することにより宿主に有益な作用をもたらす生きた微生物」と定義されている¹⁷⁾。日々の食事で摂取する発酵食品（例えば、漬物、キムチ、ピクルス、ヨーグルトなど）には、乳酸菌やビフィズス菌などのプロバイオティクスが含まれている¹⁸⁻²¹⁾。食品中の乳酸菌やビフィズス菌は、腸内有用菌を増加させ、また腸内腐敗菌である一部の *Clostridium* 属や大腸菌を減少させることによって、腸内環境の改善（整腸作用）に寄与することが知られている²²⁾。プロバイオティクスは、整腸作用だけでなく、脂質の吸収を抑制する効果²³⁾、LPL 阻害による脂肪細胞への脂肪蓄積抑制²⁴⁾、交感神経の活性化による脂肪分解の促進²⁵⁾など、肥満改善効果についても多数報告されている。これらプロバイオティクスによる肥満の改善効果は、プロバイオティクス由来の代謝産物が関与している可能性が示唆されているが、未だ明確なメカニズムは明らかにされていない²⁶⁾。

そこで著者は、このプロバイオティクスに着目し、プロバイオティクスとヒト腸内細菌の相互作用による代謝改善メカニズムの解明を目的とし研究を実施した。はじめに、ヒト大便試料を用いて、プロバイオティクス由来の代謝産物がヒト腸内細菌叢に及ぼす影響について検証した (*in vitro*)。次に、プロバイオティクスにより腸内細菌叢が変化することで肥満改善効果が認められるのかを検証するため、マウスへのプロバイオティクス投与実験を実施した (*in vivo*)。その結果、プロバイオティクス投与により肥満の抑制に伴う腸内細菌叢の変化と糞便中の短鎖脂肪酸濃度の増加傾向が認められ、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸が体重増加の抑制に寄与している可能性を見出した（第1章）。

短鎖脂肪酸

短鎖脂肪酸とは、炭素数が 2 から 6 の脂肪酸の総称であり、直鎖脂肪酸（主に酢酸、プロピオン酸、*n*-酪酸など）や分枝鎖脂肪酸（イソ酪酸やイソ吉草酸など）が含まれる。食物繊維などの多糖類は、小腸で分解されずに大腸に到達し、腸内細菌によって資化されることで短鎖脂肪酸を産生する。腸内細菌由来の短鎖脂肪酸は、大腸上皮細胞のエネルギー源として利用され、水分やミネラルの吸収に関わり、腸内環境の恒常性維持に寄与することが知られている^{27,28)}。

近年では、脂肪酸などの栄養素によって活性化される GPCRs が数多く発見されている。その中で、短鎖脂肪酸を認識する受容体としては、GPR41 と GPR43 が知られており²⁹⁾、GPR41 は、交感神経節、脾臓、腎臓、腸管^{30,31)}、GPR43 は、白色脂肪組織、骨髄、腸管に存在している³²⁾。GPR41 と GPR43 は、アゴニストとして作用する短鎖脂肪酸により、共通して Gi/o 経路を活性化し、細胞内 cAMP 濃度の抑制を引き起こす。GPR43 に関しては、Gq 経路も活性化され、細胞内カルシウム濃度の上昇も伴うデュアルカップリング型 GPCRs として知られている (Figure 3)³³⁾。GPR41 に対する短鎖脂肪酸のアゴニスト活性は、プロピオン酸が最も高く、次いで酪酸、酢酸であるのに対して、GPR43 では、酢酸とプロピオン酸が最も高く、酪酸のアゴニスト活性は低いことが知られている^{34,35)}。すなわち、短鎖脂肪酸の示す複雑な生理作用のメカニズムについては、これらの受容体を考慮に入れる必要がある。

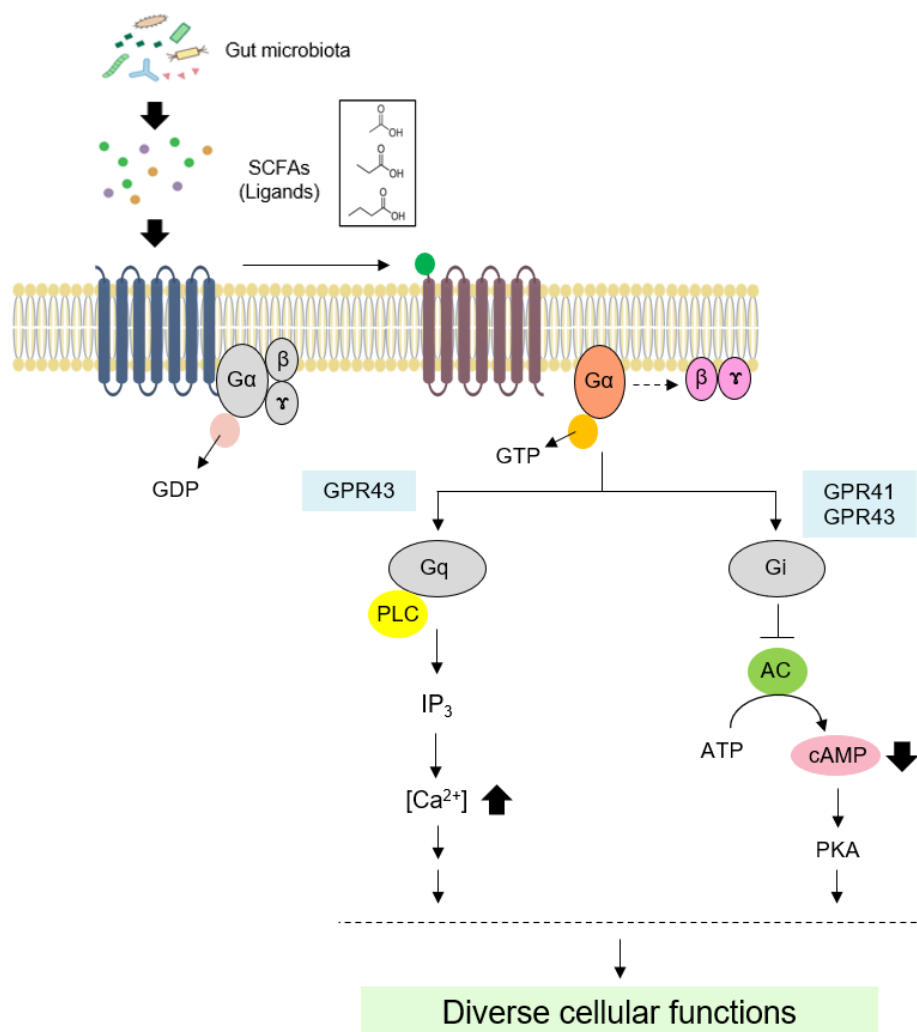
先に述べた腸内細菌由来の短鎖脂肪酸は、腸管から吸収された後、血液を介して各組織に存在する短鎖脂肪酸受容体 GPR41、GPR43 のシグナル伝達分子として作用し、肥満や肥満由来の代謝性疾患の予防・改善に寄与することが知られている³⁶⁻⁴¹⁾。短鎖脂肪酸と肥満の関連性についての論文は、2013 年までは年間 10 報以下であったが、2014 年から増加し、2018 年以降は年間 50 報以上、2021 年には 100 報以上と急増しており、これは、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸と肥満や肥満由来の代謝性疾患の関連性についての関心が高まっていることを示している。

このように、肥満との関連性について注目されている短鎖脂肪酸であるが、短鎖脂肪酸は腸内細菌から産生されるだけでなく、発酵食品（例えば、漬物、酢、醤油、ワインなど）にも多く含まれている⁴²⁻⁴⁷⁾。食品由来の短鎖脂肪酸は、摂取後、主に消化管上部から吸収され、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸と同様に血流を介して各組織に移行し、肥満や肥満由来の代謝性疾患の予防・改善に寄与すると考えられるが、その効果は十分に検討されていない。理由として、私たちの食事内容は日々異なり、食品由来の短鎖脂肪酸の摂取・吸

収は一時的で不連続なものであるため、その効果を定量的に検証することは困難であるということが挙げられる。

そこで著者は、第1章の結果を基に、食品由来の短鎖脂肪酸が、肥満や肥満由来の代謝性疾患の予防・改善に寄与する可能性に期待し、マウスに短鎖脂肪酸を直接摂餌させた場合における代謝機能への影響とそのメカニズムを明らかにすることを目的として研究を実施した。その結果、短鎖脂肪酸は、GPR41を介して治療困難とされる脂肪肝の発症を抑制することを明らかにした（第2章）。

Figure 3. Different G-protein signaling pathways (modified reference 33).



短鎖脂肪酸を認識する新規受容体

短鎖脂肪酸を認識する受容体である GPR41、GPR43 は、共通して消化管下部（回腸から結腸）に局在する腸管 L 細胞に存在している⁴⁸⁾。腸管 L 細胞は、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸の刺激によって、GPR41 や GPR43 を介して食欲抑制ホルモンである GLP-1 やペプチド YY (PYY) を分泌する^{49, 50)}。GLP-1 は、インスリン分泌促進作用も有しており、糖尿病の治療薬（GLP-1 受容体作動薬：リキシセナチド）として利用されているが、PYY に着目した治療薬は未だ開発されていない。PYY は 36 アミノ酸からなり、視床下部弓状核の Neuropeptide Y ニューロンに作用することで、過剰な摂食を抑制する⁵¹⁾。これまでにラットを用いた動物試験により、短鎖脂肪酸によって PYY の分泌促進が認められている⁵²⁾。また、肥満者に腸管 L 細胞まで到達するように修飾したプロピオン酸を投与することで、PYY の分泌促進、体重や脂肪重量が抑制されることが認められており⁵³⁾、短鎖脂肪酸の刺激による PYY 分泌の促進作用は、肥満症の新たな治療方法の 1 つになりうる可能性が期待される。この PYY 分泌について、近年、Gs タンパク質と結合する新規の短鎖脂肪酸受容体 *Olf78* がマウス腸内に発現しており、PYY 分泌に関与している可能性が示唆された。しかし、*Olf78* については未だ不明な部分が多い^{54, 55)}。*Olf78* と PYY 分泌との関連性やそのメカニズムを解明することが出来れば、食欲抑制作用を有する肥満症治療薬の新規開発に貢献できる可能性が期待される。

そこで著者は、この短鎖脂肪酸受容体 *Olf78* に着目し、短鎖脂肪酸による PYY の分泌調節について、培養細胞レベルおよびマウス個体レベルでの研究を実施した。その結果、*Olf78*/Gs/cAMP 経路は、短鎖脂肪酸による PYY の分泌に寄与していることを明らかにした（第 3 章）。

第1章 プロバイオティクスが腸内細菌叢に及ぼす影響

第1節 プロバイオティクス由来の代謝産物がヒト腸内細菌叢に及ぼす影響

諸言

私たちの身体（皮膚、口腔、消化器系などの様々な部位）には、膨大な数の常在細菌が生息しているが、特に大腸には、他の組織と比較して多数の細菌が生息しており、約1,000種類、100兆個以上の腸内細菌が存在している。ヒト腸内細菌は、主に *Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Actinobacteria*、*Proteobacteria* の4つの門レベル⁸⁾、さらに属レベルの解析においては *Bacteroides* 型、*Prevotella* 型、*Ruminococcus* 型の3つのエンテロタイプに分類されている⁵⁶⁾。近年では、腸内細菌叢の改善による肥満抑制効果に注目が集まっている¹⁰⁻¹³⁾。特に、乳酸菌やビフィズス菌などのプロバイオティクスは、整腸作用だけでなく肥満抑制効果も期待されており²²⁻²⁵⁾、これはプロバイオティクス由来の代謝産物が関与している可能性が示唆されているが、未だ明確なメカニズムは明らかにされていない²⁶⁾。

そこで著者は、代表的なプロバイオティクスである乳酸菌、ビフィズス菌とヒト腸内細菌との相互作用による代謝改善メカニズムの解明を目的とし、研究を実施した。序論でも述べた通り、日々の食生活が腸内細菌叢の構成に影響を与える主要因子であることが知られているが¹⁴⁻¹⁶⁾、年齢によっても腸内細菌叢は変化する。例えば、乳幼児ではビフィズス菌が最も優勢な菌種であるが、離乳後は急激に減少し、60歳代以降では更に減少する。また、乳幼児と高齢者では大腸菌等を含む *Proteobacteria* 門の割合が高くなることが知られている⁵⁷⁾。そのため、本節では、腸内細菌叢の組成が異なると予想される健康な30代と60代の2名の大便試料を用いて、プロバイオティクス由来の代謝産物がヒト腸内細菌叢に及ぼす影響について検討した。

第1項 実験材料および方法

1-1. ヒト大便試料

事前に口頭で試験内容について説明し同意を得た、健康な30代、60代被験者（計2名）のヒト大便試料を用いた（理化学研究所倫理審査委員会承認 No. 和光第三 23-10）。

1-2. プロバイオティクス

プロバイオティクスである乳酸菌およびビフィズス菌は、JCM より分譲されたものを用いた。乳酸菌として *Lacto. acidophilus* JCM1132 株、ビフィズス菌として *Bifido. longum* JCM1217 株を用いた。乳酸菌は MRS 培地（Difco）、ビフィズス菌は GAM 培地（日水製薬）にてアネロパック・ケンキシシステム（三菱ガス化学）を用いて嫌氣的条件下、37°C で培養した。

1-3. メンブランフィルターを用いたプロバイオティクスとヒト腸内細菌との共培養

腸内細菌由来代謝産物の影響により培地中の pH が変化することを防ぐため、緩衝作用の高い TYG 培地を使用した⁵⁸⁾。嫌気条件下、TYG 培地層上にプロバイオティクスである乳酸菌およびビフィズス菌を接種し (100~200 cfu)、TYG 培地層上に底部が孔径 0.22 μm の滅菌メンブランフィルターになった内径 70 mm のリング（静宏産業）を乗せた⁵⁸⁾。腸内細菌の菌数が 50~100 cfu となるようヒト大便試料を希釈し、フィルター上層に接種した。アネロパック・ケンキシシステム（三菱ガス化学）を用いて嫌氣的条件下、37°C で培養した（Figure 4）。フィルター上層の出現コロニーを採取し、16S rRNA 遺伝子配列解析にて菌種の推定を行った。プライマーとして 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') を用いた。得られた PCR 産物を Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System（Promega）を用いて精製した。菌種推定は BLAST 検索にて行い、相同性 98% 以上のものを同定菌種とした。

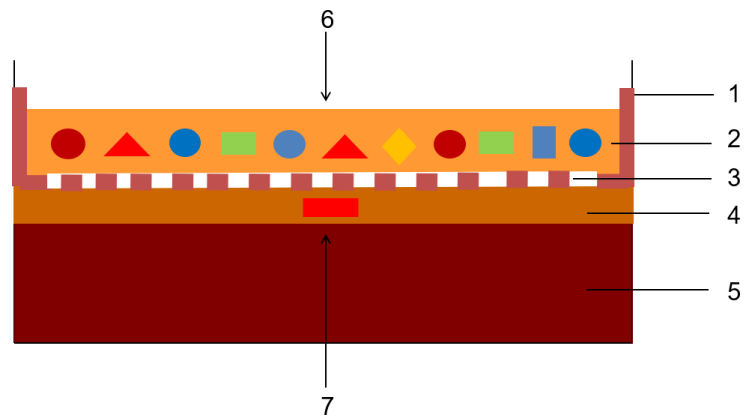
Figure 4. Coculture system for interbacterial interactions between probiotics and gut microbiota.

Gut bacterial colonies on the membrane filter under anaerobic condition (A), Coculture system for interbacterial interactions between probiotics and gut microbiota (B). ¹ Spacer ring, ² Upper layer of soft agar medium, ³ Membrane filter with 0.22 μm pore size, ⁴ Lower layer of soft agar, ⁵ Basal agar, ⁶ Inoculation of fecal sample, ⁷ Inoculation of probiotics.

(A)



(B)



1-4. 統計解析

結果は、全て平均±標準誤差で表した。統計学的解析は、GraphPad Prism (version 7) を使用した。平均値の比較において、one-way ANOVA により Dunnett's test (3 群以上の比較、vs コントロール) を用い、 p 値が 0.05 未満の場合、統計的に有意とした。

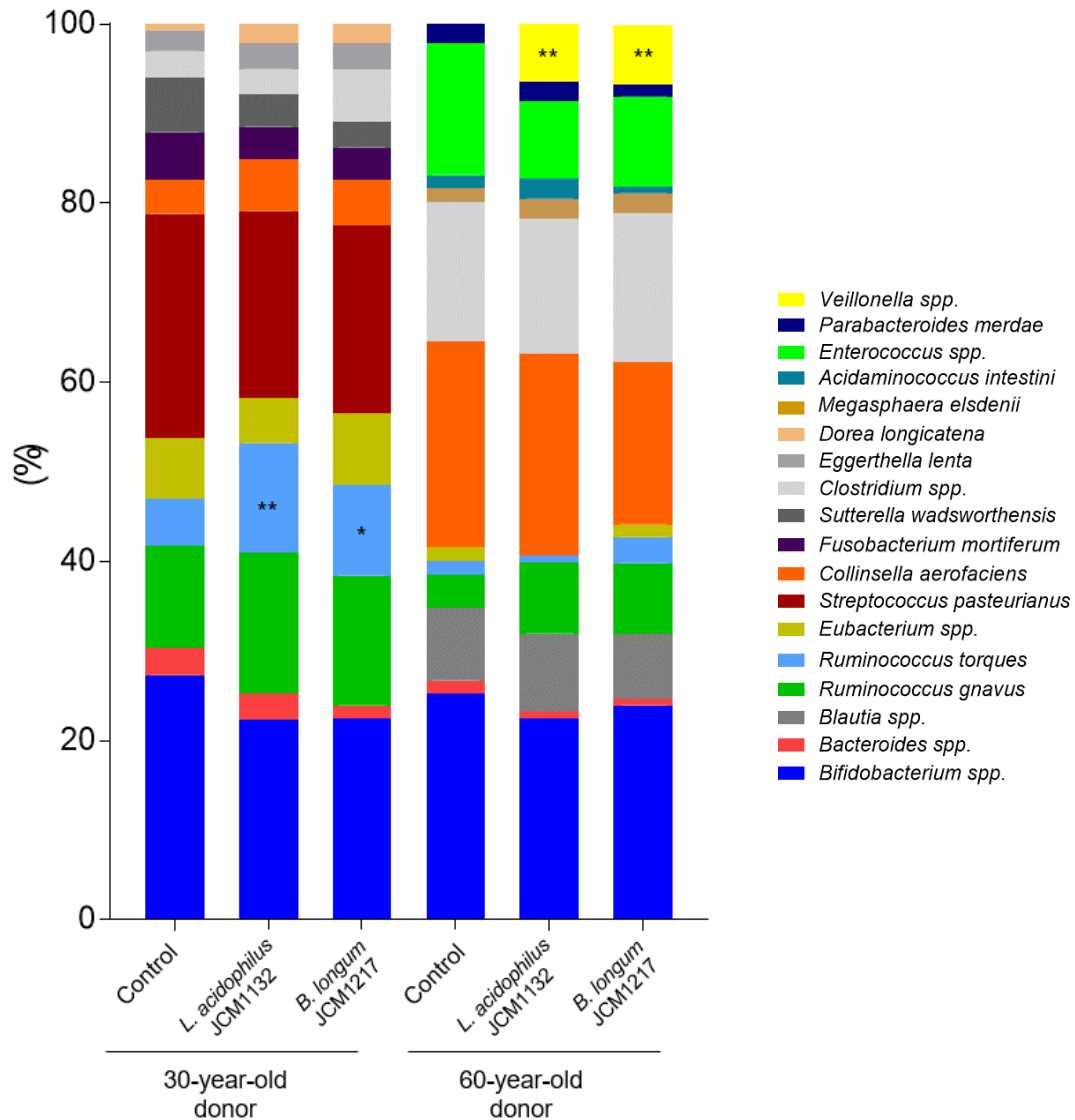
第2項 結果

健康な30代、60代の2名の大便試料を用いて、プロバイオティクスである乳酸菌およびビフィズス菌由来の代謝産物がヒト腸内細菌叢に及ぼす影響について検討した。結果として、30代、60代のヒト腸内細菌種の組成は大きく異なるものの、フィルター下層のプロバイオティクスの有無、またその種類に関係なく、いずれの組み合わせでも共通してビフィズス菌が優先菌種として認められた (Figure 5)。一方で、プロバイオティクスである乳酸菌およびビフィズス菌をフィルター下層に接種し、30代被験者試料を用いた場合では、コントロール（未接種群）と比較して、両プロバイオティクスの接種において *Rumino. torques* の有意な増加が認められた。一方、60代被験者試料を用いた場合では、両プロバイオティクスの接種において、コントロールにて検出限界以下であった *Veillonella spp.* の有意な増加が認められた。*Rumino. torques* および *Veillonella spp.* は代謝産物として、短鎖脂肪酸であるプロピオン酸を産生することが知られている^{59, 60)}。すなわち、プロバイオティクスである乳酸菌およびビフィズス菌由来の代謝産物は、ヒト腸内細菌のうち、短鎖脂肪酸であるプロピオン酸を産生する腸内細菌の増加に寄与している可能性が示唆された。

Figure 5. Effects of coculture with probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* on species composition of human gut microbiota.

Significant differences in species composition following coculture with probiotic strains.

All data are presented as the means \pm SEM ($n = 3$). $**p < 0.01$, $*p < 0.05$ compared with control.



第2節 プロバイオティクス投与による腸内細菌叢の変化および生体への影響

諸言

本章第1節では、プロバイオティクスである乳酸菌およびビフィズス菌由来の代謝産物により、短鎖脂肪酸であるプロピオン酸を産生する腸内細菌 (*Rumino. torques* および *Veillonella* spp.) の増加が認められた。これら *in vitro* 試験により得られた知見を基に、本節ではプロバイオティクス投与により腸内細菌叢が変化することで生体に及ぼす影響について、特にプロバイオティクスによる肥満改善効果を *in vivo* の系で検証することとした。

プロバイオティクスとヒト腸内細菌の相互作用やそれによる生体機能の変化を検証する最適な方法として、ヒトにプロバイオティクスを直接投与するヒト臨床試験が挙げられる。しかしながら、ヒト腸内細菌叢は個人間で大きく異なるだけでなく、さらに個人内でも食事、ストレス、薬剤投与などにより変動するため、腸内細菌叢の変化を観察することは非常に難しい。そのため、プロバイオティクスによる腸内細菌叢の変化および生体への影響について正確に検証するためには、動物実験施設で飼育環境が管理されている動物を用いて研究を実施する必要がある。

そこで本節では、高脂肪食により肥満を誘導した野生型マウスを用いて、プロバイオティクスとして乳酸菌やビフィズス菌を摂餌させた場合における体重や腸内細菌叢の変化について検討した。

第1項 実験材料および方法

2-1. 動物および負荷試験

C57BL/6J 系統マウス（雄性、6 週齢）は、日本エスエルシー株式会社から購入した。このマウスを動物実験施設において、室温 20~23°C、湿度 40~60% の条件下、12 時間の明暗サイクル（明期：午前 8 時—午後 8 時）で 1 週間予備飼育し、健康状態において問題ないことを確認後、試験食として高脂肪食（D12492; リサーチダイエツト社製）を摂餌させた。乳酸菌として *Lacto. acidophilus* JCM1132 株を MRS 培地、ビフィズス菌として *Bifido. longum* JCM1217 株を GAM 培地を用いて培養後、凍結乾燥にて菌体粉末化し、高脂肪食に 10% 配合した（ 1.0×10^9 cfu/g）。負荷試験に使用した飼料成分の組成を下記にて示す（Table 2）。飲水は、ろ過機を通した水道水を自由飲水させた。負荷期間は 4 週間、週 1 回の体重測定による体重変化を比較した（東京農工大学動物実験倫理許可 No. 28-87）。

Table 2. Composition of HFDs for probiotics supplementation.

[#] Synthetic organic compound primarily used as a blue colorant for dietary supplements.

Formula	HFD	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (JCM1132)	<i>Bifidobacterium longum</i> (JCM1217)
Product	%, weight		
Protein	20	20	20
Carbohydrate	20	20	20
Fat	60	60	60
Ingredient	%, weight		
Casein	25.84	23.26	23.26
L-Cystine	0.39	0.35	0.35
Maltodextrin 10	16.15	14.54	14.54
Sucrose	8.89	8.00	8.00
Cellulose, BW200	6.46	5.82	5.82
<i>Lacto. acidophilus</i>	0.00	10.00	0.00
<i>Bifido. longum</i>	0.00	0.00	10.00
Soybean Oil	3.23	2.91	2.91
Lard	31.66	28.49	28.49
Mineral Mix S10026	1.29	1.16	1.16
DiCalcium Phosphate	1.68	1.51	1.51
Calcium Carbonate	0.71	0.64	0.64
Potassium Citrate, 1 H ₂ O	2.13	1.92	1.92
Vitamin Mix V10001	1.29	1.16	1.16
Choline bitartrate	0.26	0.23	0.23
FD&C blue dye [#]	0.006	0.005	0.005

2-2. 腸内細菌叢解析

Fast DNA™ SPIN Kit for Feces (MP Biomedicals) を用いて糞便から DNA を抽出した。16S rRNA 腸内細菌叢解析として、抽出した DNA の 16S rRNA 遺伝子における V4 領域を 515F / 806R プライマーにて PCR 増幅後、Nextera® XT Index kit v2 Set A (Illumina) を用いて両端をタグ付けし、精製を行った後、Illumina MiSeq および MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を用いてアンプリコンのシーケンスを行った。シーケンス後の解析は QIIME 1 (Version 1.9.1) のパイプラインを用いた。菌種推定のリファレンス配列が記載されたデータベースは SILVA (Version 128) を採用し、97% 以上の相同率を示すリード同士を纏めた OTU で腸内細菌叢の組成を決定した。

2-3. Real-time PCR 法による腸内細菌種の定量

2-2 より抽出した糞便 DNA の 16S rRNA 遺伝子領域に対して、以下のプライマーを用いて定量解析した。検出に用いたプライマーの配列を以下に記す (Table 3)。

Table 3. Primer sequences used in this study.

Gene	Forward	Reverse
<i>16S</i>	5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'	5'- ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'
<i>Akkermansia</i>	5'-CAGCACGTGAAGGTGGGGAC-3'	5'- CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT-3'
<i>Bifidobacterium</i>	5'-CTCCTGGAAACGGGTGG-3'	5'-GGTGTTCCTTCCCGATATCTACA-3'
<i>Lactobacillus</i>	5'-TGGAAACAGRTGCTAATACCG-3'	5'-GTCCATTGTGGAAGATTCCC-3'

2-4. 糞便中の短鎖脂肪酸の定量

採取した糞便を電子天秤にて秤量後、秤量した糞便の 10 倍量に相当する MilliQ 水に懸濁し、4°C、8000 × g にて 5 分間遠心後、糞便上清を回収した。糞便上清の 2% 量に相当する 5-スルホサリチル酸を加えて除タンパクした後、糞便上清の 5% 量に相当する塩酸と 2 倍量に相当するジエチルエーテルを加えて、液-液分配抽出を行った。内標準物質は 2-エチル酪酸を用いた。調製サンプル中の短鎖脂肪酸濃度 (酢酸、プロピオン酸および n-酪酸) は GCMS-QP2010 Ultra (島津) を用いて解析し、糞便 1g 中における各種短鎖脂肪酸濃度を算出した。カラムは VF-WAXms column (30 m, 0.25 mmID, 1 µm Thickness, Agilent) を使用した。

2-5. 統計解析

前項 1-4 と同様の方法で解析した。

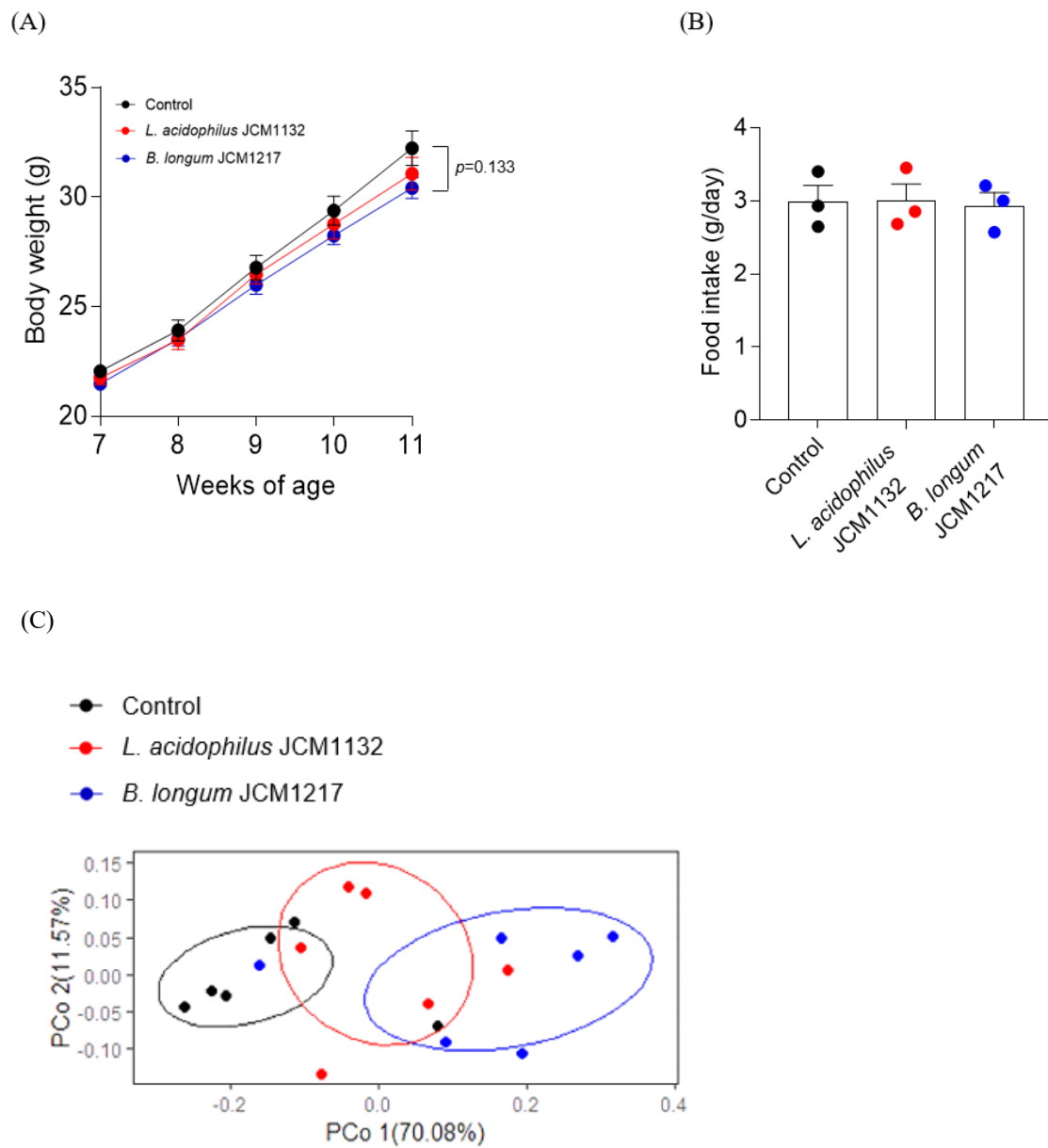
第2項 結果

高脂肪食により肥満を誘導した野生型マウスを用いて、プロバイオティクスである乳酸菌やビフィズス菌の摂餌によるマウスの体重や腸内細菌叢の変化について検討した。その結果、プロバイオティクスの有無、またその種類に関係なく、いずれの組み合わせでもマウスの摂餌量はコントロール（高脂肪食のみ）と類似していたのに対し、プロバイオティクスの摂餌により体重増加の抑制傾向が認められた（Figure 6A, B）。また、プロバイオティクスである乳酸菌やビフィズス菌の摂餌による腸内細菌叢の変化について検討した結果、腸内細菌叢の分布、組成に大きな違いが認められた（Figure 6C, D）。そこで、腸内細菌叢の組成の違いについて定量解析した結果、摂取した乳酸菌やビフィズス菌の有意な増加に加えて、乳酸菌を摂取した場合には *Akkermansia* 属の増加傾向、ビフィズス菌を摂取した場合には *Akkermansia* 属の有意な増加が認められた（Figure 6E）。最後に、糞便中の短鎖脂肪酸濃度について解析した結果、プロバイオティクスの摂餌により、短鎖脂肪酸濃度の増加傾向が認められた（Figure 6F）。

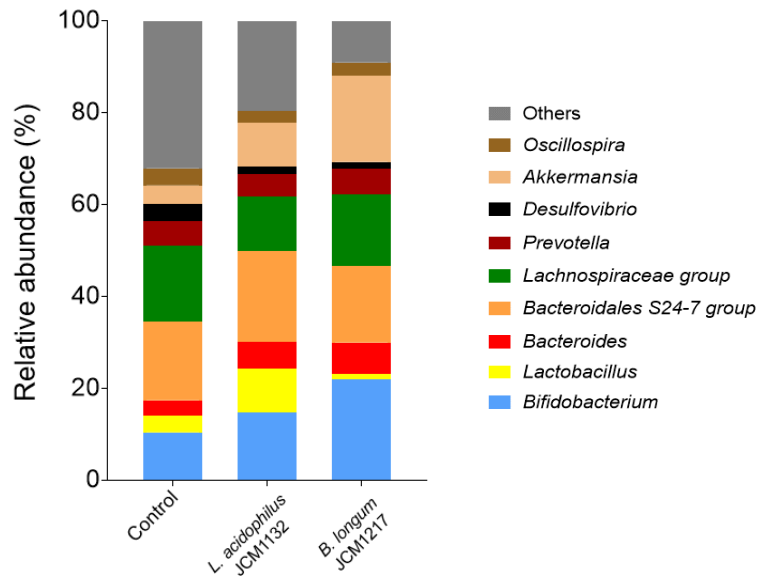
Figure 6. Probiotics supplementation exerts metabolic benefits.

Body weight changes (A), food intake (B), gut microbial composition at the phylum level (C), genus level (D, E), and fecal SCFAs (F) measured after 4 weeks of HFD feeding with 10% *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum*.

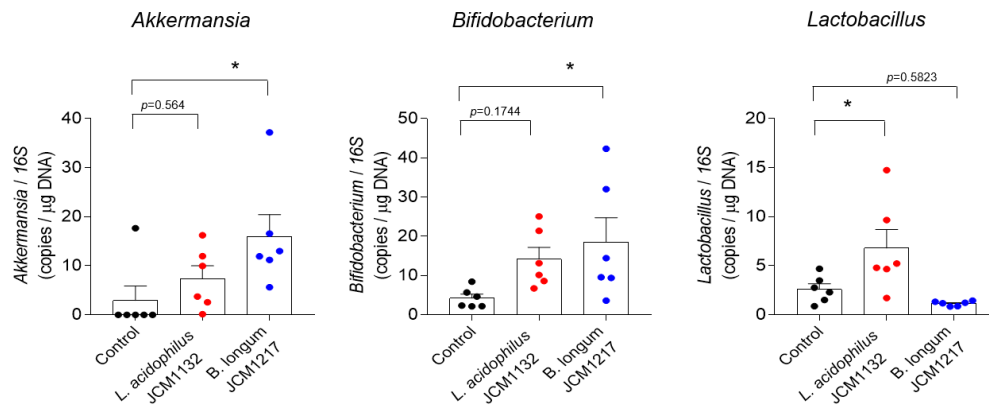
All data are presented as the means \pm SEM ($n = 6$). $**P < 0.05$, compared with control.



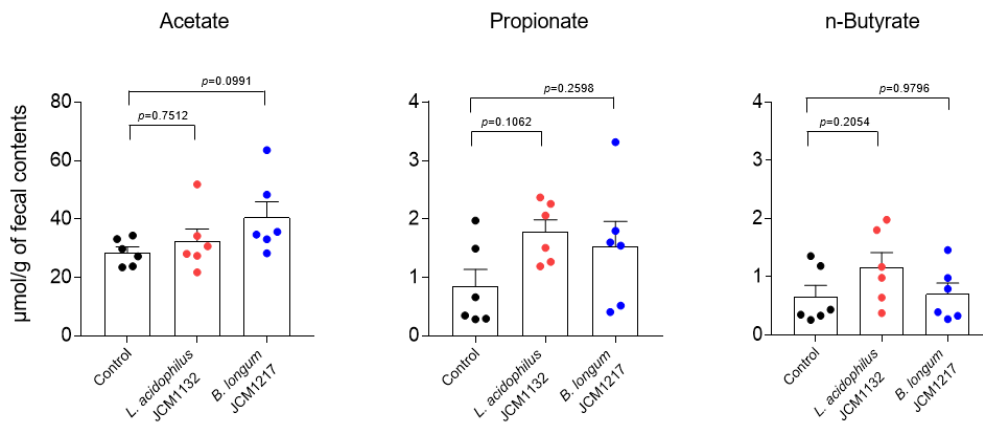
(D)



(E)



(F)



第3節 考察

第1節では、プロバイオティクスである乳酸菌やビフィズス菌由来の代謝産物がヒト腸内細菌叢に及ぼす影響について検討を行なった (*in vitro*)。その結果、各々のプロバイオティクスは、短鎖脂肪酸であるプロピオン酸を産生する腸内細菌 (*Ruminococcus torques*, *Veillonella* spp.) の増加に寄与することを見出した。この結果から、乳酸菌やビフィズス菌を個体に摂食させた際に生じる変化は、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸が関与している可能性が示唆された。

そこで第2節では、プロバイオティクスにより腸内細菌叢が変化することで肥満改善につながる可能性に期待し、高脂肪食により肥満を誘導した野生型マウスを用いて、プロバイオティクスである乳酸菌およびビフィズス菌を摂餌させた場合におけるマウスの体重変化について検討した (*in vivo*)。その結果、コントロール (高脂肪食のみ) と比較して、各々のプロバイオティクス摂餌により、体重増加の抑制傾向が認められた。腸内細菌叢の変化としては、摂餌したプロバイオティクスである乳酸菌、ビフィズス菌に加えて、*Akkermansia* 属の細菌の増加、さらに糞便内では短鎖脂肪酸の増加傾向が認められた。なお、第1節の *in vitro* の結果と第2節の *in vivo* での結果では、プロバイオティクスにより増加する菌種が一致しなかったが、これはヒトとマウスの腸内細菌の組成が大きく異なるためと考えている⁶¹⁾。プロバイオティクスとして摂餌させた乳酸菌である *Lactobacillus acidophilus* は、代謝産物として主に乳酸、ビフィズス菌である *Bifidobacterium longum* は、酢酸と乳酸、少量のギ酸を産生するものの、プロピオン酸、酪酸は、両菌種ともほとんど産生しない^{62, 63)}。一方、各々のプロバイオティクス摂餌により増加した *Akkermansia* 属である *Akkermansia muciniphila* は、短鎖脂肪酸である酢酸とプロピオン酸を産生することが知られている⁶⁴⁾。したがって、各々のプロバイオティクス摂餌により増加したマウス糞便中のプロピオン酸は、摂餌したプロバイオティクス由来の代謝産物ではなく、増加した *Akkermansia* 属由来であると考えられた。一方、ビフィズス菌を経時的に摂餌したマウスでは、糞便中の酢酸がやや増加傾向を示したが、これは、各々のプロバイオティクス摂餌により増加した *Akkermansia* 属に加え、摂餌したビフィズス菌由来の代謝産物である可能性が考えられる。短鎖脂肪酸が体重増加の抑制に寄与する知見と合わせて考えると⁴⁰⁾、マウスにおいて乳酸菌やビフィズス菌の摂餌により体重が減少したことについては、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸が寄与している可能性が示唆された。

第4節 小括

本章では、年齢の異なるヒト大便試料を用いて、プロバイオティクスがヒト腸内細菌叢に及ぼす影響について検討した。さらに、プロバイオティクスにより腸内細菌叢が変化することで肥満改善効果につながる可能性に期待し、プロバイオティクスを摂餌させた場合におけるマウスの体重や腸内細菌叢の変化について検討した。得られた知見を以下に示す。

1. プロバイオティクスである乳酸菌およびビフィズス菌由来の代謝産物は、短鎖脂肪酸であるプロピオン酸を産生する腸内細菌 (*Rumino. torques*, *Veillonella* spp.) の増加に寄与することを見出した (*in vitro*)。
2. 高脂肪食により肥満を誘導した野生型マウスを用いて、プロバイオティクスである乳酸菌およびビフィズス菌を摂餌させた結果、コントロール（高脂肪食のみ）と比較して、体重増加の抑制に伴う腸内細菌叢の変化、糞便中の短鎖脂肪酸濃度の増加傾向が認められた (*in vivo*)。

第2章 短鎖脂肪酸の経口摂取による宿主エネルギー代謝機能制御に与える影響

第1節 食品由来の短鎖脂肪酸による代謝機能の改善

諸言

第1章より、プロバイオティクス由来の代謝産物は、短鎖脂肪酸を産生する腸内細菌の増加に働きかけることで体重増加の抑制に寄与している可能性を見出した。腸内細菌の主要な代謝産物である短鎖脂肪酸は、主に酢酸、プロピオン酸、酪酸である⁶⁵⁾。腸内細菌により産生される短鎖脂肪酸は、腸内環境の改善作用だけでなく、血流を介して宿主の細胞膜上の GPCRs に属する短鎖脂肪酸受容体 GPR41 や GPR43 などに作用し、肥満の予防・改善に寄与することが知られている³⁶⁻⁴¹⁾。

一般的に、プロバイオティクスである乳酸菌およびビフィズス菌は病原性が低いため、ヒト感染症の起因菌となることは極めて稀であるが、免疫機能が低下した状態では、これらプロバイオティクスが菌血症の起因菌となる可能性が示唆されている^{66,67)}。そのため、プロバイオティクス投与により短鎖脂肪酸産生菌を増やし、結果として短鎖脂肪酸濃度を増加させる試みは、免疫機能が低下している場合、菌血症などの副作用が危惧される。

短鎖脂肪酸は、腸内で産生されるだけでなく、漬物、酢、醤油、ワインなどの発酵食品に多く含まれており⁴²⁻⁴⁷⁾、日々の食事と密接に関わっている。すなわち、食品由来の短鎖脂肪酸は、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸と同様に肥満の予防・改善に寄与することが期待できる。ヒトの食事内容は毎日異なるため、食品から直接摂取・吸収される短鎖脂肪酸は一時的かつ不連続であり安定した供給源とはいえないが、生体内に及ぼす効果とそのメカニズムが解明されることによって肥満や肥満由来の代謝性疾患の予防に貢献できる可能性が期待される。

そこで著者は、本章において食品由来の短鎖脂肪酸が肥満や肥満由来の代謝性疾患における宿主エネルギー代謝機能制御に寄与する可能性、またそのメカニズムについて検討を試みた。食品由来の短鎖脂肪酸は、主に消化管上部から吸収され血流を介して各組織に移行しているが⁵³⁾、消化管上部から吸収されなかった一部の短鎖脂肪酸は、消化管下部に移行する可能性が考えられる。消化管下部（回腸から結腸）に局在する腸管 L 細胞は、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸により刺激を受けて GLP-1 や PYY を分泌する^{49,50)}。そのため、消化管上部から吸収されずに腸管 L 細胞に移行した食品由来の短鎖脂肪酸が存在すれば、腸

管 L 細胞は短鎖脂肪酸により刺激を受けて GLP-1 や PYY 分泌する可能性が考えられる。

本節では、高脂肪食により肥満を誘導した野生型マウスを用いて、摂餌した短鎖脂肪酸が消化管上部から吸収されているのか、もしくは消化管上部で吸収されなかった短鎖脂肪酸が消化管下部に移行しているのかを検証するため、血漿中の GLP-1 や PYY 分泌量を指標とし検討した。次に、食品由来の短鎖脂肪酸による代謝機能の影響について検討した。

第1項 実験材料および方法

1-1. 動物および負荷試験

実験動物は、第1章第2節2-1と同様、日本エスエルシー株式会社から購入した6週齢のC57BL/6J系統の雄マウスを用いた。CE-2（日本クレア）を摂餌させ1週間馴化した後、7週齢から試験食の負荷試験を開始した。試験食として高脂肪食（D12492; リサーチダイエツト社製）に5%セルロース、酢酸塩、プロピオン酸塩、酪酸塩を各々含む高脂肪食4種を用いた。負荷試験に使用した飼料成分の組成を下記にて示す（Table 4）。負荷期間は4週間で、週1回の体重測定による体重変化を比較した（東京農工大学動物実験倫理許可 No. 28-87）。

Table 4. Composition of HFDs for SCFAs supplementation.

Synthetic organic compound primarily used as a blue colorant for dietary supplements.

Formula	HFD	Cellulose	Acetate	Propionate	Butyrate
Product	%, weight				
Protein	20	20	20	20	20
Carbohydrate	20	20	20	20	20
Fat	60	60	60	60	60
Ingredient	%, weight				
Casein	25.84	24.55	24.55	24.55	24.55
L-cystine	0.39	0.37	0.37	0.37	0.37
Maltodextrin 10	16.15	15.35	15.35	15.35	15.35
Sucrose	8.89	8.45	8.45	8.45	8.45
Cellulose, BW200	6.46	6.14	6.14	6.14	6.14
Cellulose	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00
Acetate	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00
Propionate	0.00	0.00	0.00	5.00	0.00
Butyrate	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00
Soybean oil	3.23	3.07	3.07	3.07	3.07
Lard	31.66	30.08	30.08	30.08	30.08
Mineral mix S10026	1.29	1.23	1.23	1.23	1.23
Dicalcium phosphate	1.68	1.60	1.60	1.60	1.60
Calcium carbonate	0.71	0.68	0.68	0.68	0.68
Potassium citrate, 1 H ₂ O	2.13	2.03	2.03	2.03	2.03
Vitamin mix V10001	1.29	1.23	1.23	1.23	1.23
Choline bitartrate	0.26	0.25	0.25	0.25	0.25
FD&C blue dye #	0.0064	0.0061	0.0061	0.0061	0.0061

1-2. 剖検および組織採取

4 週間の負荷試験終了後に剖検ならびに各組織を採取した。解剖は約 5 時間の絶食の後に行った。絶食中はマウスを空ケージに移し、糞便を採取した。採取した糞便サンプルはすぐに氷上に置き、全て回収後、 -80°C で凍結保存した。解剖直前に、尻静脈より微量の血液を採取し、LFS クイックセンサー（ジョンソン・エンド・ジョンソン）を用いて血糖値を測定した。その後、イソフルラン吸入によりマウスに麻酔し、血液および白色脂肪組織（精巣周囲脂肪組織、腎周囲脂肪組織、皮下脂肪組織）、肝臓、盲腸を採取した。下大静脈より採血し、得られた血液サンプルは、 4°C 、 $8500 \times g$ で 5 分間遠心し、血漿のみを回収して -80°C で凍結保存した。採取した組織サンプルは重量測定後、アルミホイルに包んで -80°C で凍結保存した。

1-3. 腸内細菌叢解析

Fast DNATM SPIN Kit for Feces（MP Biomedicals）を用いて糞便から DNA を抽出し、第 1 章第 2 節 2-2 と同様の方法で解析した。

1-4. 盲腸・血漿中の短鎖脂肪酸の定量

採取した盲腸を電子天秤にて秤量後、秤量した盲腸の 10 倍量に相当する MilliQ 水に懸濁し、 4°C 、 $8000 \times g$ で 5 分間遠心後、盲腸上清を回収し、第 1 章第 2 節 2-3 と同様の方法で解析した。血漿中の短鎖脂肪酸は、血漿の 2% 量に相当する 5-スルホサリチル酸を加えて除タンパクした後、血漿の 5% に相当する塩酸と 2 倍量に相当するジエチルエーテルを加えて、液-液分配抽出した。

1-5. 血漿中の GLP-1 濃度測定

活性型 GLP-1 の分解を防ぐために、下大静脈より採血した血液サンプル $198 \mu\text{L}$ を Dipeptidyl peptidase-4 阻害薬（メルク） $2 \mu\text{L}$ が入った 1.5 mL チューブに加えてよく混合し、 4°C 、 $8000 \times g$ で 5 分間遠心して血漿を回収した。この血漿サンプル中の GLP-1 濃度を Active GLP-1 キット（ミリポア）を用いて測定した。

1-6. 血漿中の PYY 濃度測定

1-2 で回収した血漿中の PYY 濃度を、マウス/ラット PYY ELISA キット(富士フイルム和光純薬)を用いて測定した。

1-7. ヘマトキシリン・エオシン染色

肝臓の一部を切り取り、OCT コンバウンド(サクラファインテックジャパン)に包埋して -80°C で凍結した後、クライオスタット(CM1850, LEICA) で薄切して組織切片を作製した。組織切片上に 4% パラホルムアルデヒド液 (パラホルムアルデヒド 4g に対し、10 倍希釈したリン酸緩衝液 10 mL と 1N NaOH 0.1 mL を加え、蒸留水にて 100 mL に調製) を 1 mL 滴下後、10 分間静置し組織を固定した。PBS (10 分間、3 回) で洗浄後、ヘマトキシリンで 20 分間染色した。水で洗浄した後、エオシンで 5 分間染色した。再度、水で洗浄した後、70% エタノール (EtOH, 10 分間) および 100% EtOH (10 分間、2 回) により脱水し、キシレン(10 分間、2 回)により透徹した。風乾させた後、マウントクイック(大道産業)を滴下し、カバーガラスをのせて封入した。封入剤が乾燥した後、蛍光顕微鏡(BZ-X700, KEYENCE)で肝臓組織を観察した。

1-8. 血漿中の脂質の定量

血漿中の Total cholesterol、NEFA、TG 濃度は、それぞれラボアッセイTM cholesterol、NEFA、TG (いずれも富士フイルム和光純薬)を用いて測定した。

1-9. 肝臓中の TG の定量

肝臓を約 75 mg 切り取り、TG 抽出バッファー (0.45M 酢酸：メタノール：クロロホルム=1 : 2.5 : 1.25) 4 mL 中でホモジナイズし、低温室 (4°C) で一晩転倒混和した。翌日、MilliQ 水を 1 mL 加えてよく攪拌したのち、4°C、1500 × g で 10 分間遠心し、下層を回収した。回収した溶液を 60°C インキュベーター内で蒸発乾固させ、250 µL のイソプロピルアルコールに再懸濁した。調製した懸濁液中の TG 濃度をラボアッセイTM TG (富士フイルム和光純薬)を用いて測定し、肝臓 1 g に含まれる TG 量を求めた。

1-10. 血漿中のインスリン濃度測定

1-2 で回収した血漿中のインスリン濃度を、レビス・インスリン・マウス (RTU) (富士フイルムワコーシバヤギ) を用いて測定した。

1-11. 遺伝子発現解析

RNeasy Mini Kit (QIAGEN) 及び RNA isoPlus (タカラバイオ) を用いて、マウスの肝臓、白色脂肪組織 (精巣周囲脂肪組織) から RNA を抽出し、Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) によって逆転写した。得られた cDNA は、TB Green Premix Ex Taq (タカラバイオ) および Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて定量解析した。検出に用いたプライマーの配列を以下に記す (Table 5)。

Table 5. Primer sequences used in this study.

Gene	Forward	Reverse
<i>18S</i>	5'-ACGCTGAGCCAGTCAGTGTA-3'	5'-CTTAGAGGGACAAGTGGCG-3'
<i>Fas</i>	5'-GCTGCGGAAACTTCAGGAAAT-3'	5'-AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT-3'
<i>Acc</i>	5'-AAGGCTATGTGAAGGATG-3'	5'-CTGTCTGAAGAGGTTAGG-3'
<i>Chrebp</i>	5'-CTGGGGACCTAAACAGGAGC-3'	5'-GAAGCCACCCTATAGCTCCC-3'
<i>Cpt1a</i>	5'-GCATAAACGCAGAGCATTCC-3'	5'-GATGTTGGGGTTCTTGTCTCC-3'
<i>Cpt2</i>	5'-CTCATCCGCTTTGTTTCCTTC-3'	5'-AGTTCATCACGACTGGGTTTG-3'
<i>Ppara</i>	5'-CCTGAACATCGAGTGTCGAA-3'	5'-GGCCTTGACCTTGTTTCATGT-3'
<i>Pepck</i>	5'-CCACAGCTGGTGCAGAACA-3'	5'-GAAGGGTCGATGGCAAA-3'
<i>G6Pase</i>	5'-CCATGCAAAGGACTAGGAACAA-3'	5'-TACCAGGGCCGATGTCAAC-3'
<i>Lpl</i>	5'-CTGCTGGCGTAGCAGGAAGT-3'	5'-GCTGGAAAGTGCCTCCATTG-3'
<i>Scd-1</i>	5'-GTCAGGAGGGCAGGTTTC-3'	5'-GAGCGTGGACTTCGGTTC-3'
<i>Pgc1a</i>	5'-GAGAATGAGGCAAACCTTGCTAGCG-3'	5'-TGCATGGTTCTGAGTGCTAAGACC-3'
<i>Pparg</i>	5'-TCAGCTCTGTGGACCTCTCC-3'	5'-ACCCTTGCATCCTTCACAAG-3'

1-12. 統計解析

結果は、全て平均±標準誤差で表した。統計学的解析は、GraphPad Prism (version 7) を使用した。平均値の比較において、one-way ANOVA による Dunnett's test (3 群以上の比較、vs HFD) を用い、*p* 値が 0.05 未満の場合、統計的に有意とした。

第2項 結果

2-1. 食品由来短鎖脂肪酸の消化吸収

試験食として、高脂肪食あるいは5%酢酸塩、プロピオン酸塩、酪酸塩を各々含む高脂肪食をマウスに摂餌させ、摂取した各種短鎖脂肪酸が吸収されている消化管の部位について検討した。

はじめに、血漿および盲腸内の短鎖脂肪酸濃度について、コントロール（高脂肪食のみ・高脂肪食にセルロース混餌）と比較した。その結果、血漿中では、各々摂取した短鎖脂肪酸濃度において有意な増加が認められたのに対し、盲腸内ではコントロールと差が認められなかった（Figure 7A, B）。次に、血漿中のGLP-1、PYY濃度について解析した結果、短鎖脂肪酸の摂餌による影響はほとんど認められなかった（Figure 7C, D）。また、糞便中の腸内細菌叢においても短鎖脂肪酸の摂餌による影響はほとんど認められなかった（Figure 7E, F）。

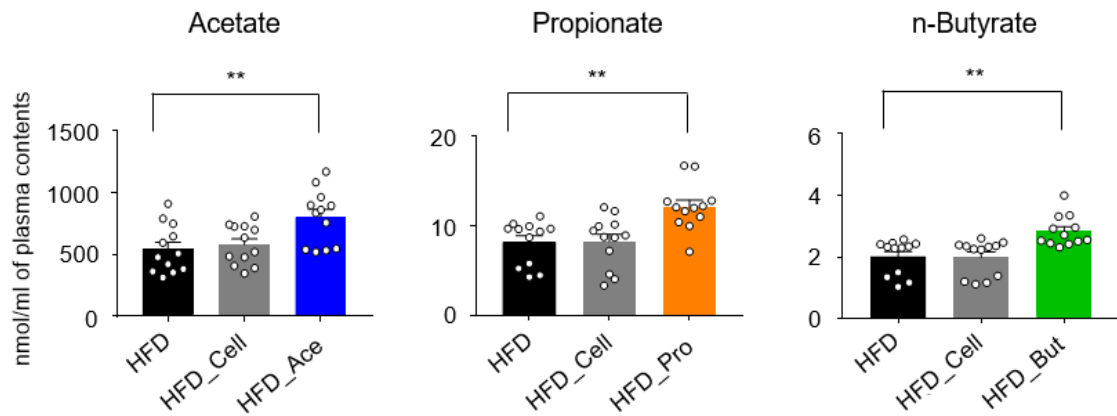
以上の結果より、摂取した各種の短鎖脂肪酸は、回腸から結腸に局在する腸管L細胞にはほとんど到達せず、主に消化管上部から吸収され、血流を介して各組織に移行している可能性が示唆された。

Figure 7. SCFAs supplementation increases plasma SCFA levels.

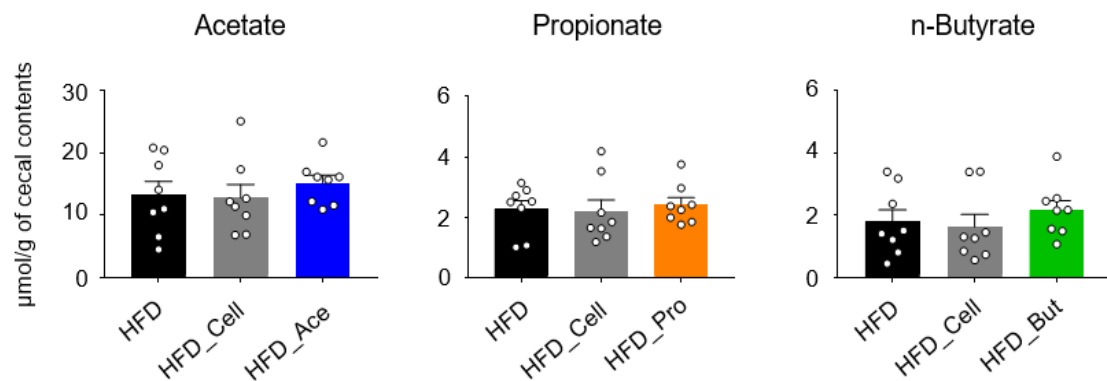
Plasma SCFAs (A), cecal SCFAs (B), plasma GLP-1 (C), and PYY levels (D), composition as PC2 plot (E) and relative abundance (F) of gut microbiota (phylum level), measured after 4 weeks of HFD feeding with 5% cellulose, acetate, propionate, or n-butyrate.

All data are presented as the means \pm SEM ($n = 8-12$). $**P < 0.01$, compared with HFD.

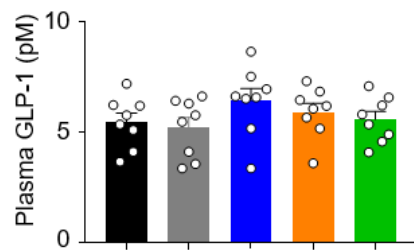
(A)



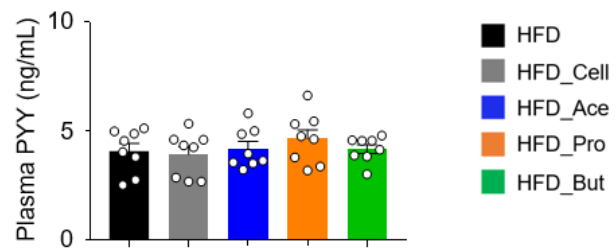
(B)



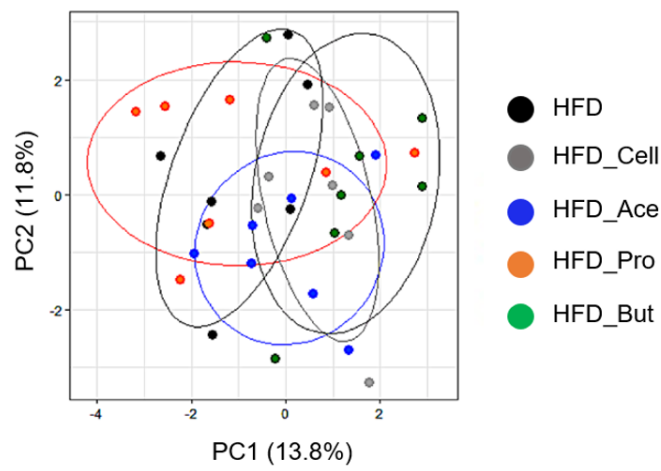
(C)



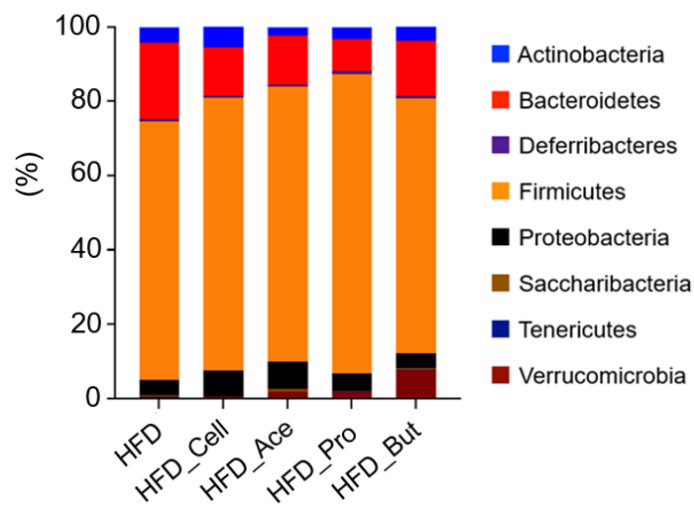
(D)



(E)



(F)



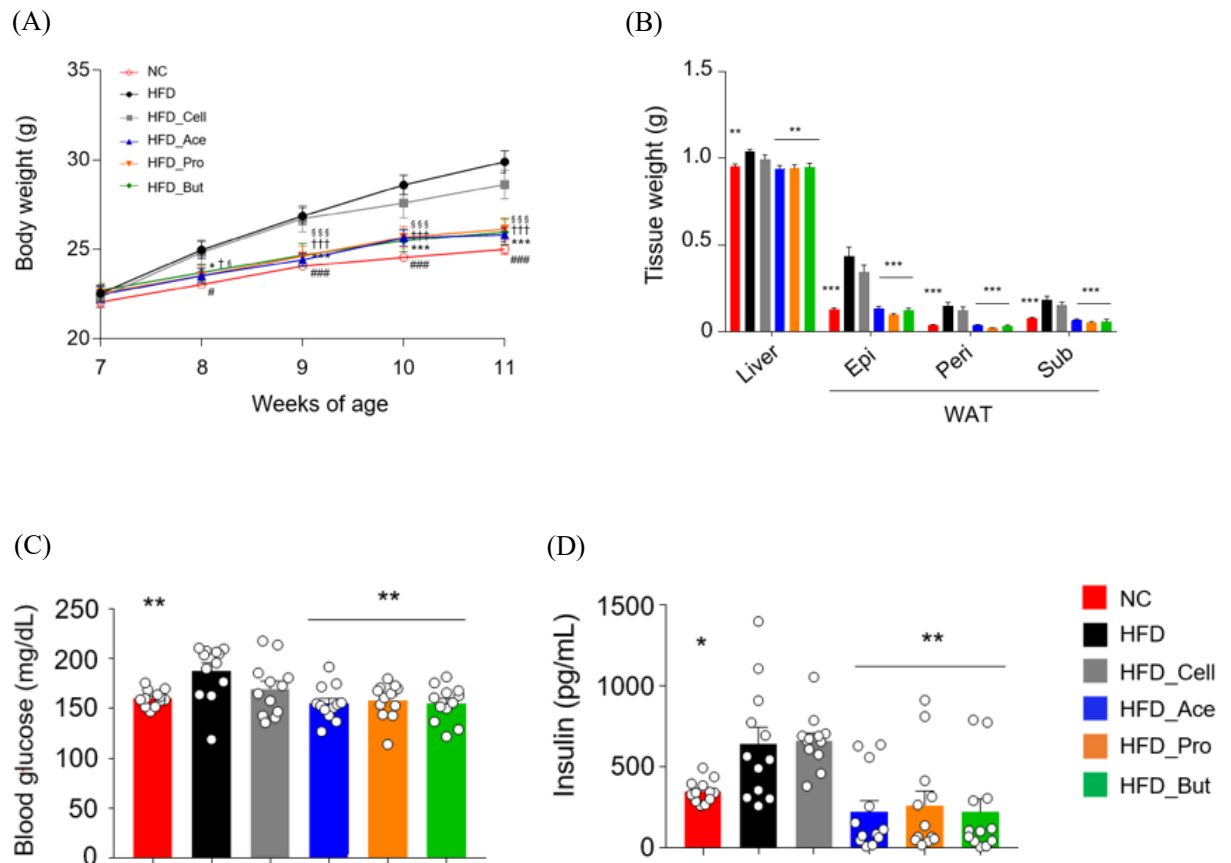
2-2. 食事由来短鎖脂肪酸における宿主エネルギー代謝機能制御

2-1 と同様、試験食として、高脂肪食および 5% セルロース、酢酸塩、プロピオン酸塩、酪酸塩を各々含む高脂肪食を 4 週間摂餌した結果、コントロール（高脂肪食のみ・高脂肪食にセルロース混餌）と比較して、短鎖脂肪酸の摂餌により体重増加の抑制、肝臓や白色脂肪組織（精巣周囲脂肪組織、腎周囲脂肪組織、皮下脂肪組織）の重量において有意な減少が認められた（Figure 8A, B）。糖代謝の評価項目として、血糖値、血漿インスリン濃度、経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）およびインスリン負荷試験（ITT）を実施した結果、短鎖脂肪酸の摂餌により糖代謝の改善効果が認められた（Figure 8C-F）。しかしながら、脂質代謝の評価項目である血漿中の TG、NEFA および Total cholesterol 濃度においては、短鎖脂肪酸の摂餌による影響はほとんど認められなかった（Figure 8G）。

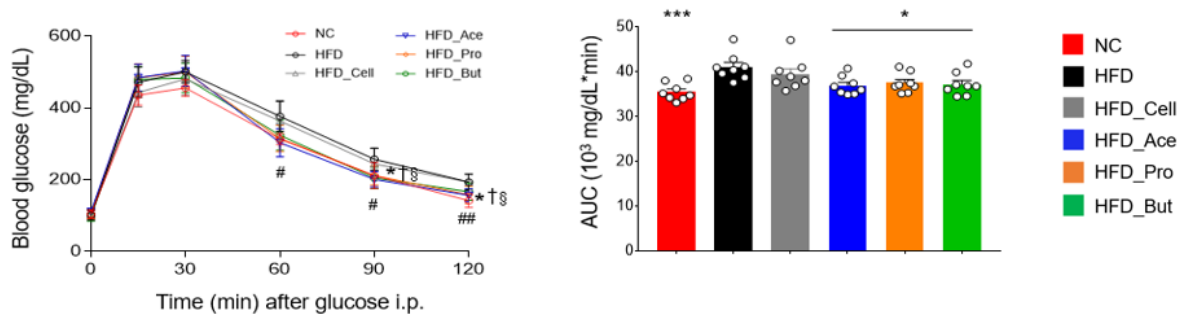
Figure 8. SCFAs supplementation exerts metabolic benefits.

Body weight changes (A), liver and WAT weights (B), blood glucose (C), plasma insulin (D), GTT (E), ITT (F), plasma TGs, NEFAs, and total cholesterol concentrations (G) measured after 4 weeks of NC or HFD feeding supplemented with 5% acetate, propionate, and n-butyrate. All data are presented as the means \pm SEM ($n = 8-12$). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, and * $P < 0.05$, compared with HFD. ### $P < 0.001$, ## $P < 0.01$, and # $P < 0.05$ (HFD vs. NC), *** $P < 0.001$ and * $P < 0.05$ (HFD vs. Ace), ††† $P < 0.001$ and † $P < 0.05$ (HFD vs. Pro), §§§ $P < 0.001$ and § $P < 0.05$ (HFD vs. But) (A, E, F).

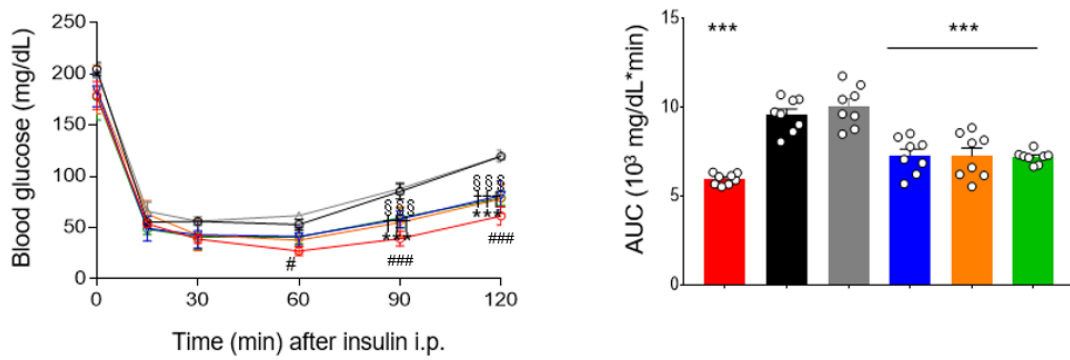
Epi : Epididymal, Peri : Perirenal, Sub : Subcutaneous, WAT : White adipose tissue.



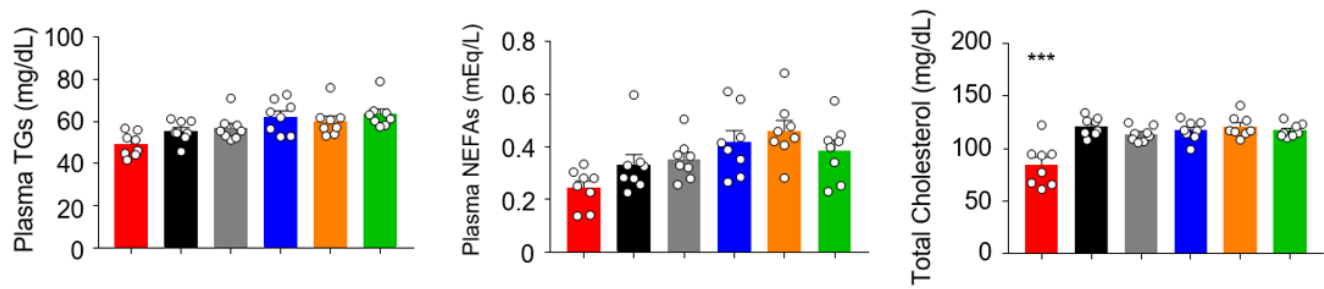
(E)



(F)



(G)



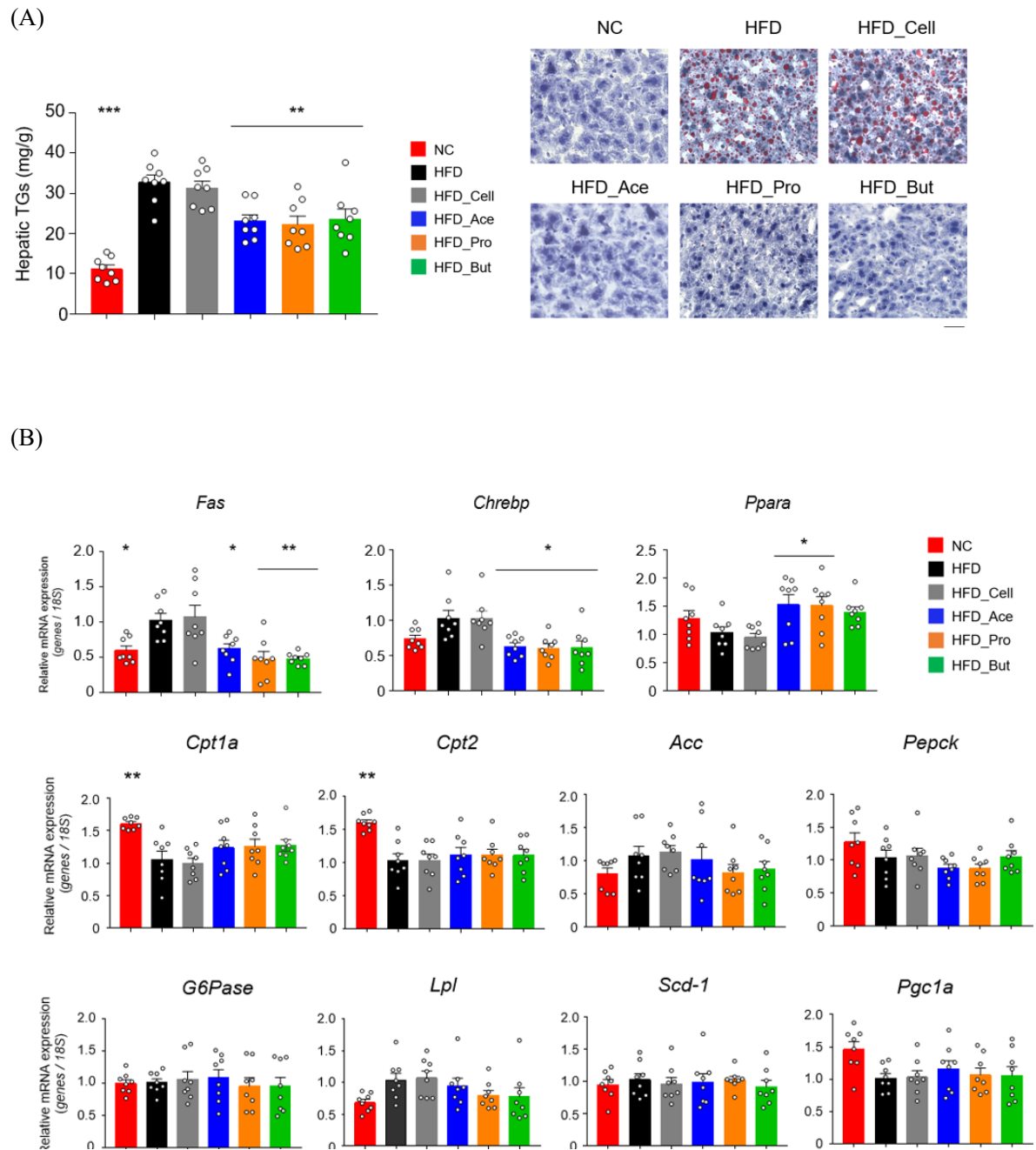
2-3. 食事由来短鎖脂肪酸による肝臓の脂肪蓄積抑制

2-2 より、短鎖脂肪酸を摂餌した場合では、コントロール（高脂肪食のみ・高脂肪食にセルロース混餌）と比較して、肝臓重量の有意な減少が認められた（Figure 8B）。肥満時には、脂肪肝として肝臓に Triglyceride (TG) が蓄積し肝重量が増加することが報告されている⁶⁸⁾。この肥満による脂肪肝は、肝硬変や肝癌へと進行する可能性があるにも関わらず未だ治療薬が開発されていない疾患であり、医学・薬学分野において非常に重要な研究標的の1つといえる。短鎖脂肪酸の摂餌により脂肪肝が改善した可能性に期待し、肝臓中のTG量を測定したところ、TG量の有意な減少が認められた（Figure 9A）。また中性脂肪を赤く染色する oil red O 染色を用い組織切片レベルで観察したところ、やはり高脂肪食により蓄積した中性脂肪が短鎖脂肪酸の摂餌により減少することが明らかとなった。そこで、肝臓中のエネルギー代謝に関わる因子の mRNA 発現量を網羅的に定量解析したところ、短鎖脂肪酸の摂餌により脂肪酸の合成に関わる酵素である Fatty acid synthase (*Fas*)、糖質から脂肪酸への変換に関わる転写因子 Carbohydrate-responsive element binding protein

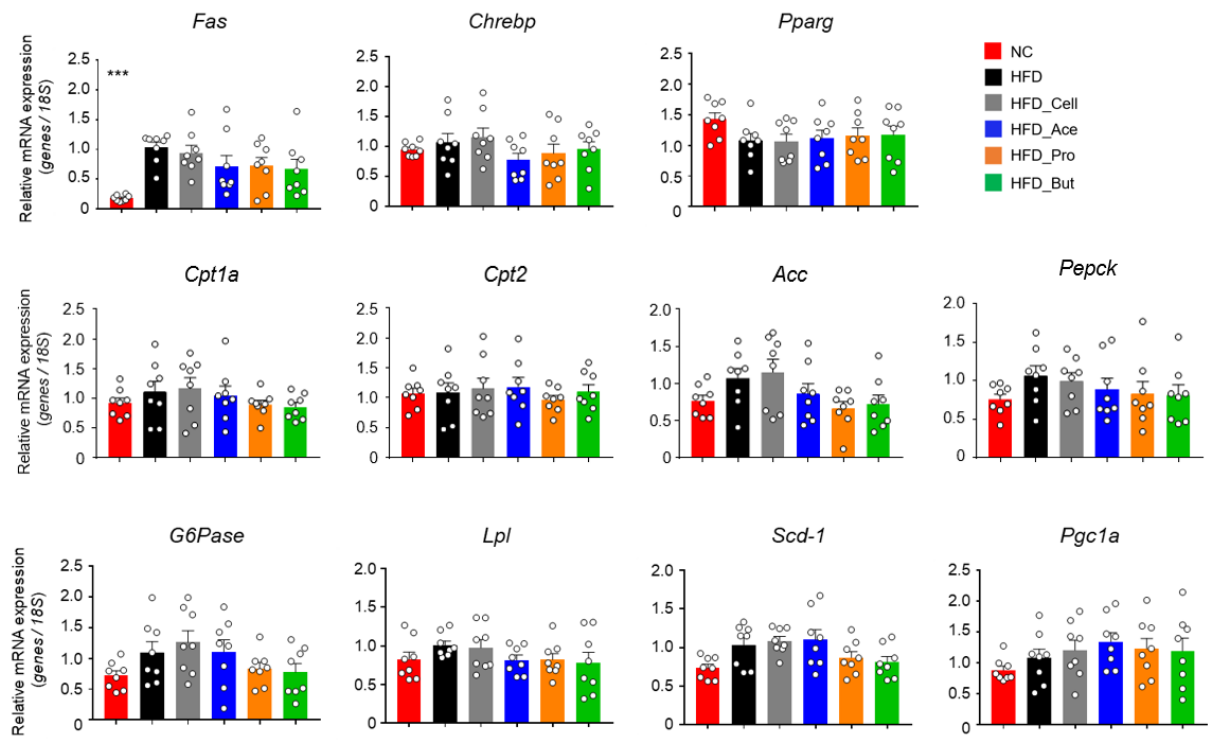
(*Chrebp*) の有意な減少、加えてプロピオン酸、酢酸の摂餌においては脂肪酸からアセチル CoA への分解 (β 酸化) に関わる転写因子 *Ppara* の有意な増加が認められた（Figure 9B）。白色脂肪組織（精巣周囲脂肪組織）においても同様にエネルギー代謝に関わる遺伝子発現解析を行った結果、短鎖脂肪酸の摂餌により白色脂肪組織では脂肪酸の合成に関わる *Fas* および *Chrebp* の減少傾向が認められたが、統計学的に有意な差は認められなかった（Figure 9C）。

Figure 9. SCFAs intake improves hepatic metabolic condition.

Hepatic triglyceride content and histology of hepatocytes based on hematoxylin- oil red O staining with the scale bar, 50 μ m (A), and mRNA expression levels of liver (B) and WAT (Epi) (C) energy metabolism-related genes measured after 4 weeks of NC or HFD feeding supplemented with 5% SCFAs. All data are presented as the means \pm SEM ($n = 8$). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, and * $P < 0.05$, compared with HFD. Epi : Epididymal, WAT : White adipose tissue.



(C)



第 2 節 短鎖脂肪酸受容体欠損マウスを用いた宿主エネルギー代謝機能制御メカニズム

諸言

本章第 1 節では、継続的に摂餌した短鎖脂肪酸は、主に消化管上部から吸収され、血流を介して各組織に移行すること (Figure 7)、短鎖脂肪酸によって各組織が長期的に刺激された結果、体重増加の抑制、肝臓や白色脂肪組織 (精巣周囲脂肪組織、腎周囲脂肪組織、皮下脂肪組織) 重量の減少、糖代謝の改善効果が認められた (Figure 8)。この作用の中で、肝臓に着目し短鎖脂肪酸による変化を解析したところ、肝臓中の TG 量は、短鎖脂肪酸の摂餌により有意な減少が認められ、肝臓中のエネルギー代謝に関わる因子の mRNA 発現量を網羅的に定量解析した結果、脂肪酸合成に関わる *Fas*、*Chrebp* の有意な減少、脂肪酸の β 酸化に関わる *Ppara* の有意な増加が認められた (Figure 9)。

本節では、この短鎖脂肪酸による肝脂質代謝変化のメカニズム解明の一端として、短鎖脂肪酸受容体の役割について検討した。短鎖脂肪酸を認識する受容体としては、GPR41 と GPR43 が知られている²⁹⁾。GPR41 は、交感神経節、脾臓、腎臓、腸管^{30,31)}、GPR43 は、白色脂肪組織、骨髄、腸管に発現しているが³²⁾、GPR41 は交感神経節、GPR43 は白色脂肪組織において特に顕著に発現している。血中の短鎖脂肪酸濃度の増加による GPR41 を介した交感神経の活性化は、ノルアドレナリン分泌を促進し、体温や酸素消費量を指標とした体全体のエネルギー消費量を高めること、GPR43 を介して白色脂肪組織特異的にインスリンシグナルを抑制することで白色脂肪細胞への過剰なエネルギーの蓄積抑制により、宿主の肥満抑制に寄与することが知られている^{31, 32)}。そこで、短鎖脂肪酸の受容体である GPR41、GPR43 全身欠損マウスを各々用いて、継続的な短鎖脂肪酸の摂餌による肝脂質代謝調節における GPR41、GPR43 の役割について検討した。

第1項 実験材料および方法

2-1. 動物および負荷試験

短鎖脂肪酸受容体 *GPR41* 全身欠損した雄マウス³¹⁾、*GPR43* 全身欠損した雄マウス³²⁾ は、東京農工大学の木村研究室にて作製されたものを使用した（東京農工大学動物実験倫理許可 No. 28-87）。

2-2. 剖検および組織採取

前項 1-2 と同様の方法で各組織を採取した。

2-3. 肝臓中の TG の定量

前項 1-9 と同様の方法で測定した。

2-4. 遺伝子発現解析

前項 1-11 と同様の方法で測定した。

2-5. 統計解析

前項 1-12 と同様の方法で解析した。

第2項 結果

はじめに、短鎖脂肪酸を摂餌する前の野生型マウス、*GPR41*、*GPR43* 全身欠損マウスの初期体重、組織重量（肝臓および白色脂肪組織）、肝臓中のエネルギー代謝に関わる因子の mRNA 発現量（*Fas*, *Chrebp*, *Ppara*）において差が無いことを確認した（Figure 10A）。

野生型マウスと同様、*GPR41*、*GPR43* 全身欠損マウスに対して、各種短鎖脂肪酸を含む高脂肪食を4週間摂餌させた。その結果、野生型マウス、*GPR41*、*GPR43* 全身欠損マウスの摂餌量は、ほぼ同じであることを確認した（Figure 10B）。

GPR41 全身欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、高脂肪食（コントロール）の摂餌による体重の増加が認められなかった（Figure 10C）。一方、*GPR43* 全身欠損マウスでは、短鎖脂肪酸の摂餌により高脂肪食で生じる体重増加の有意な減少が認められた

（Figure 10D）。また、肝臓に着目すると、短鎖脂肪酸の摂餌により野生型マウスで認められた肝臓重量および TG 量の減少、エネルギー代謝に関わる因子の mRNA 発現量の変化は *GPR43* 全身欠損マウスでは維持されていたのに対し、*GPR41* 全身欠損マウスでは短鎖脂肪酸の摂餌による影響が消失した（Figure 10C, D）。興味深いことに、白色脂肪組織（精巣周囲脂肪組織、腎周囲脂肪組織、皮下脂肪組織）の重量については、*GPR41*、*GPR43* 全身欠損マウス共通して、短鎖脂肪酸の摂餌による有意な減少が維持されていた（Figure 10C, D）。

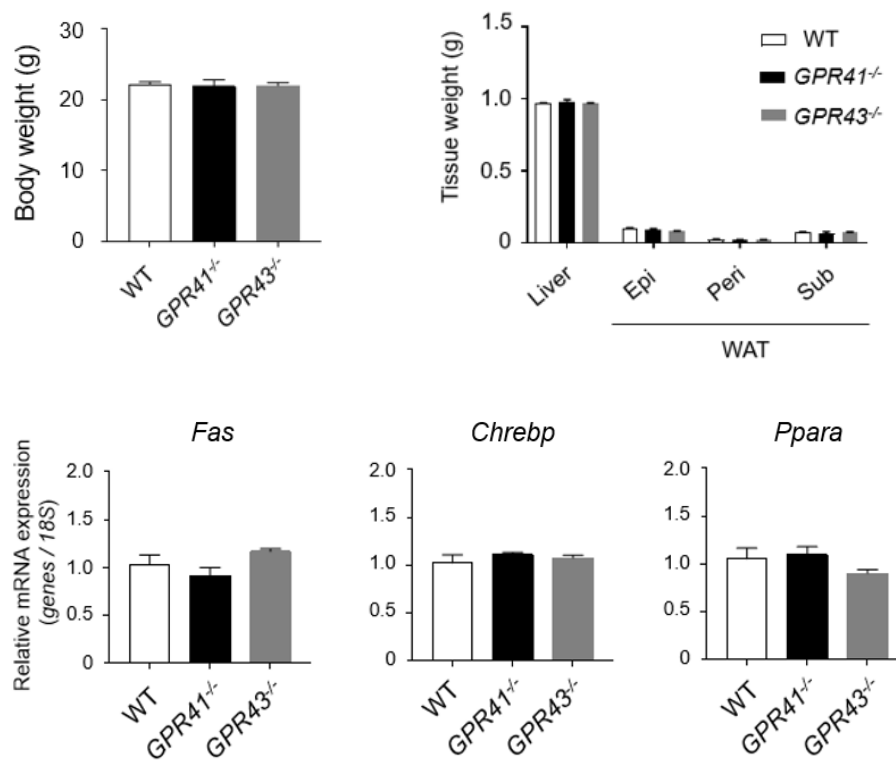
以上の結果より、*GPR41* は白色脂肪組織に対する短鎖脂肪酸の作用には必要ではないものの、肝臓における作用については必須な役割を果たす可能性が示唆された。

Figure 10. *GPR41* deficiency abolishes dietary SCFAs intake-induced metabolic benefits.

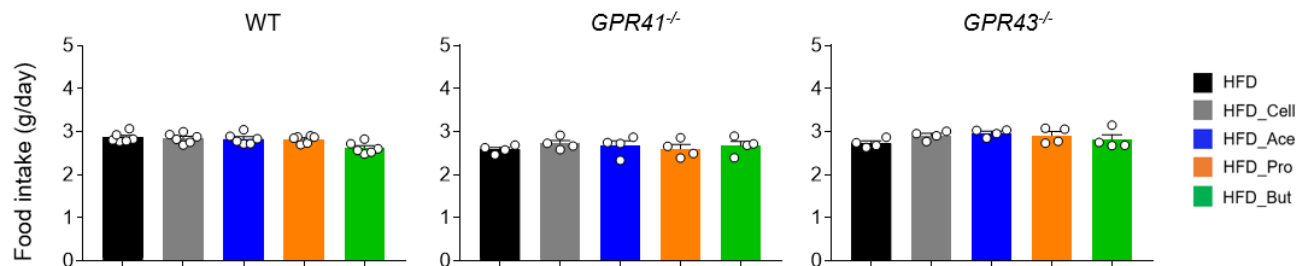
Initial metabolic parameters in *GPR41*^{-/-} and *GPR43*^{-/-} mice (A), influence of HFD with 5% SCFAs food intake (B) in *GPR41*^{-/-} mice (C) and *GPR43*^{-/-} mice (D) (*n* = 7-12) after 4 weeks. All data are presented as the means ± SEM. ***P* < 0.01 (HFD vs. Ace), ††*P* < 0.01 (HFD vs. Pro), §§*P* < 0.01 (HFD vs. But). ****P* < 0.001, ***P* < 0.01, and **P* < 0.05, compared with HFD.

Epi : Epididymal, Peri : Perirenal, Sub : Subcutaneous, WAT : White adipose tissue.

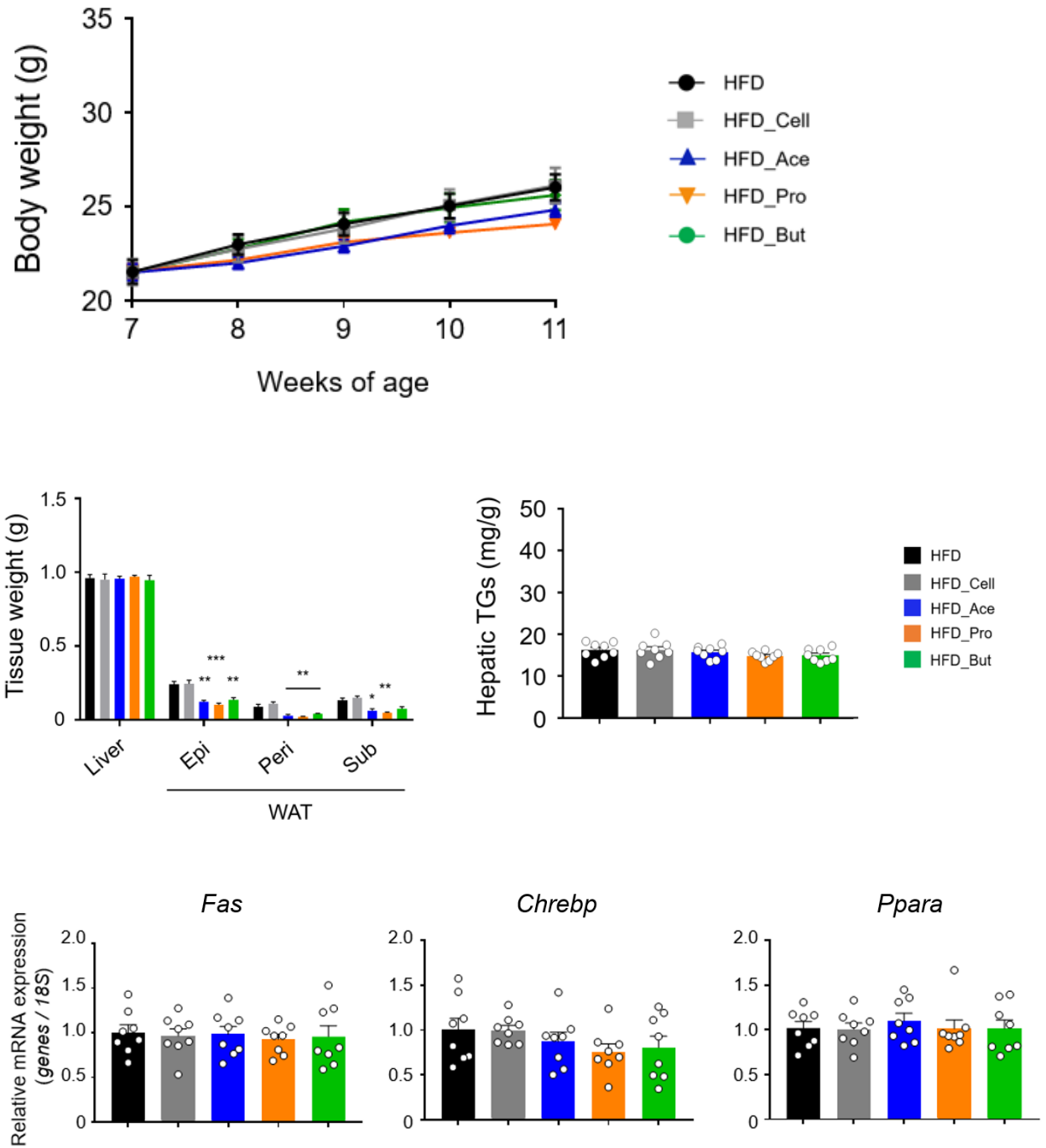
(A)



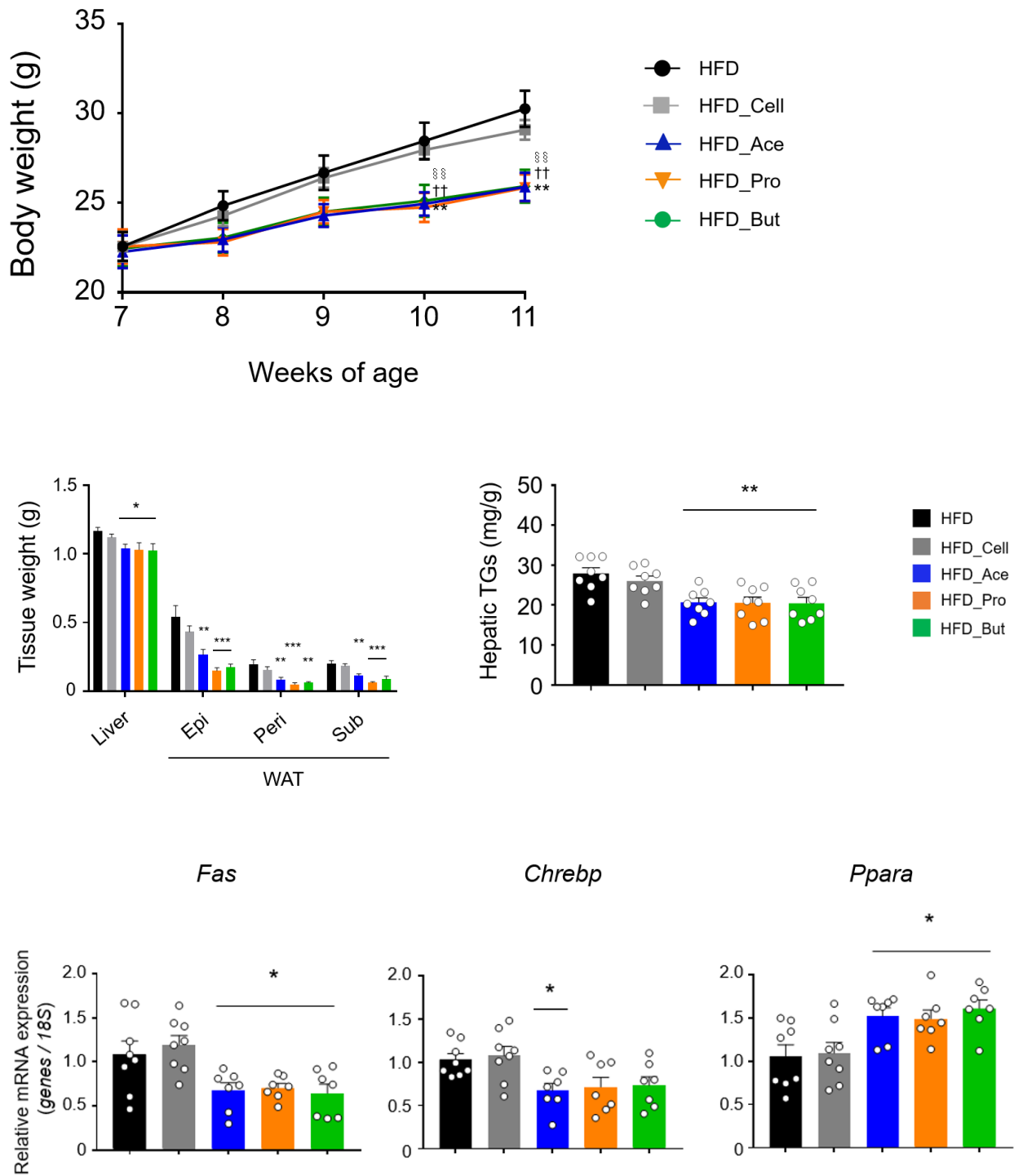
(B)



(C)



(D)



第3節 肝臓の代謝機能改善における GPR41 の役割

諸言

本章第2節では、短鎖脂肪酸を含む高脂肪食摂餌による影響のメカニズムについて、*GPR41* 全身欠損マウスと *GPR43* 全身欠損マウスを用いて野生型マウスと比較した。*GPR43* 全身欠損マウスを用いた場合では、野生型マウスと同様に短鎖脂肪酸の摂餌による代謝機能の改善効果が認められたのに対し、*GPR41* 全身欠損マウスを用いた場合では、短鎖脂肪酸の摂餌により白色脂肪組織（精巣周囲脂肪組織、腎周囲脂肪組織、皮下脂肪組織）の重量は有意に減少したが、肝脂質代謝における作用は消失した。このことから、短鎖脂肪酸の継続的な摂餌により生じる肝脂質代謝の変化には、*GPR41* が関与している可能性が示唆された。*GPR41* は、交感神経節、脾臓、腎臓、腸管に発現している^{30,31)}。この *GPR41* を介した肝脂質代謝変化については、各組織に存在する *GPR41* が継続的に刺激されたことで宿主エネルギー代謝機能が改善し、副次的に肝臓の脂肪蓄積が抑制された可能性も考えられる。

そこで本節では、副次的な作用が起こりにくい実験系として、体重を揃えた野生型マウスおよび *GPR41* 全身欠損マウスを用いて、第2節と異なり短鎖脂肪酸の腹腔内投与後24時間という短期間での解析を行い、肝臓中のエネルギー代謝に関わる因子の mRNA 発現量 (*Fas*, *Chrebp*, *Ppara*) について比較した。

第 1 項 実験材料および方法

3-1. 動物および遺伝子発現解析

実験動物は、前項 1-1 と同様、日本エスエルシー株式会社から購入した 6 週齢の C57BL/6J 系統の雄マウスを用いた。*GPR41* 全身欠損マウスは、前項 2-1 と同様、6 週齢の雄マウスを用いた。CE-2（日本クレア）を摂餌させ 1 週間馴化した後、7 週齢の各々マウスに対し、試験食として高脂肪食を 24 時間摂餌させた。短鎖脂肪酸のうち *GPR41* に対するアゴニスト活性強度が最も高いプロピオン酸 (1 g/kg body weight)³¹⁾、コントロールとして等量 PBS を野生型マウスおよび *GPR41* 全身欠損マウスに腹腔内投与した。24 時間後、肝臓中のエネルギー代謝に関わる mRNA 発現量 (*Fas*, *Chrebp*, *Ppara*) について比較した（東京農工大学動物実験倫理許可 No. 28-87）。

3-2. 剖検および組織採取

前項 1-2 と同じ方法で各組織を採取した。

3-3. 血漿中の TG の定量

前項 1-8 と同じ方法で測定した。

3-4. 肝臓中の TG の定量

前項 1-9 と同じ方法で測定した。

3-5. 統計解析

結果は、全て平均±標準誤差で表した。統計学的解析は、GraphPad Prism（version 7）を使用した。平均値の比較において、one-way ANOVA により Tukey-Kramer 法（3 群以上の比較）を用い、*p* 値が 0.05 未満の場合、統計的に有意とした。

第2項 結果

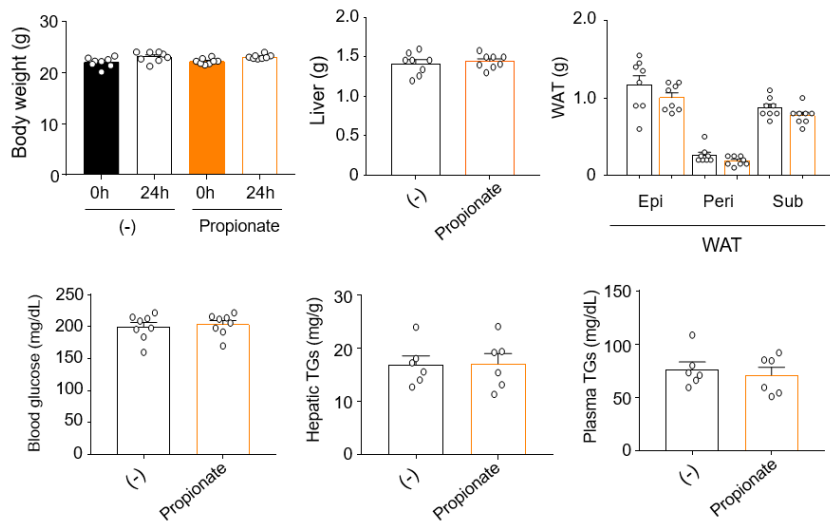
はじめに、短鎖脂肪酸であるプロピオン酸、コントロールである PBS を投与した場合、野生型マウス、*GPR41* 全身欠損マウスに関わらず、投与前と投与 24 時間後で体重、組織重量、血糖値、肝臓および血漿中の TG 量に差がないことを確認した (Figure 11)。

一方、肝臓中のエネルギー代謝に関わる因子の遺伝子発現量について比較したところ、野生型マウスでは、継続的に短鎖脂肪酸を摂餌させた場合と同様、肝臓中の脂肪酸合成に関わる *Fas*、*Chrebp* の有意な減少、脂肪酸の β 酸化に関わる *Ppara* の有意な増加が認められたのに対し、*GPR41* 全身欠損マウスでは差が認められなかった (Figure 12)。

Figure 11. Effects of acute propionate administration to WT and *GPR41*^{-/-} mice.

Body weight changes, the weights of liver and WAT, blood glucose, hepatic TG content, and plasma TG levels in WT mice (A) and *GPR41*^{-/-} mice (B) at 24 h after intraperitoneal PBS (for control group, (-)) or propionate administration (1 g/kg body weight) under HFD feeding. All data are presented as the means \pm SEM ($n = 5-8$).

(A)



(B)

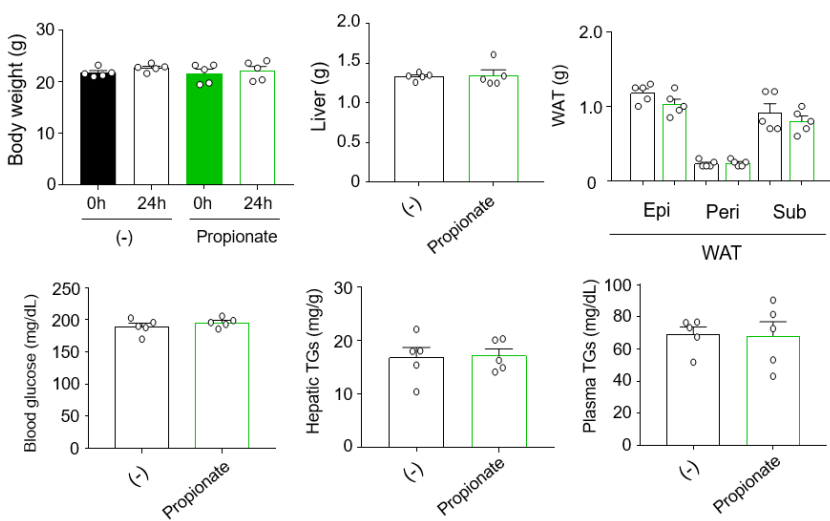
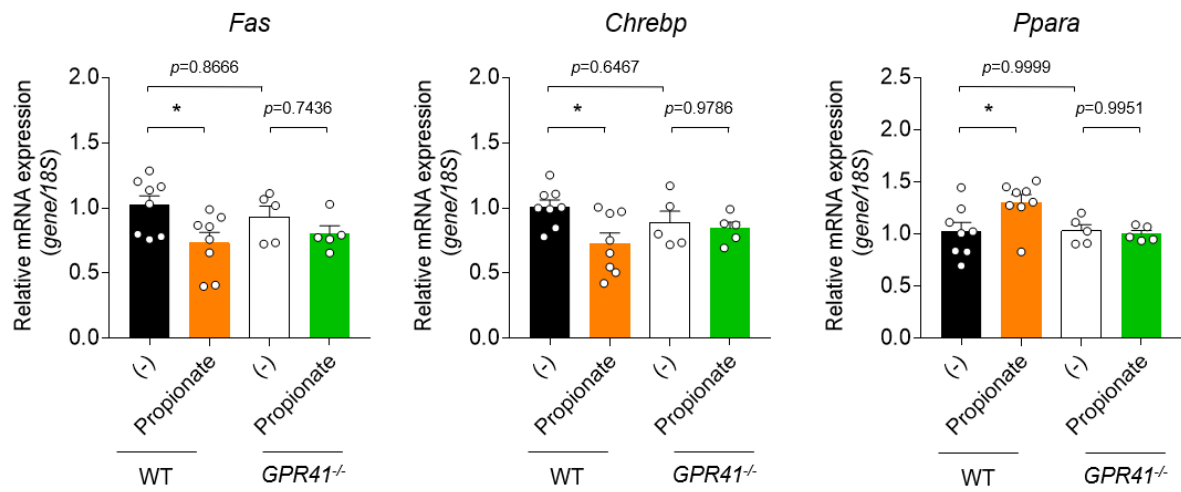


Figure 12. *GPR41*^{-/-} mice abolishes acute propionate injection-induced expression changes in hepatic lipid metabolism-related genes.

mRNA expression levels of hepatic lipid metabolism-related genes in WT and *GPR41*^{-/-} mice at 24 h after intraperitoneal PBS (for control group, (-)) or propionate administration (1 g/kg body weight) under HFD feeding.

All data are presented as the means \pm SEM ($n = 5-8$). * $P < 0.05$.



第4節 考察

第1章では、プロバイオティクス由来の代謝産物が、短鎖脂肪酸を産生する腸内細菌の増加を介して体重増加の抑制に寄与している可能性を見出した。すなわち、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸が体重増加を抑制している可能性が期待された。短鎖脂肪酸は、腸内で産生されるだけでなく、発酵食品などに多く含まれていることから⁴²⁻⁴⁷⁾、食品由来の短鎖脂肪酸は、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸と同様に肥満の予防・改善に寄与する可能性が期待できる。本章では、食品として摂取される短鎖脂肪酸が肥満や肥満由来の代謝性疾患の予防・改善に寄与する可能性に期待し、研究を実施した。

肥満や肥満由来の代謝性疾患に対する短鎖脂肪酸の効果について検証するために、高脂肪食により肥満を誘導した野生型マウスを用いて検討した。その結果、短鎖脂肪酸の摂餌により体重増加の抑制、肝臓や白色脂肪組織（精巣周囲脂肪組織、腎周囲脂肪組織、皮下脂肪組織）の重量が有意に減少し、さらに糖代謝の改善効果も認められた。一方、今回の短鎖脂肪酸の摂餌では、血漿中の TG、NEFA および Total cholesterol 濃度にほとんど変化がなかった。既報では、16 週間の短鎖脂肪酸の摂餌により、血漿中の TG、NEFA および Total cholesterol 濃度が減少すると報告されている⁴⁰⁾。今回の摂取期間は 4 週間と短いため、おそらく短鎖脂肪酸の摂餌期間の差が結果に影響を及ぼしたものと考えられる。

続いて、短鎖脂肪酸が宿主のエネルギー代謝を制御するメカニズムについて検討するために、短鎖脂肪酸受容体である *GPR41* および *GPR43* 全身欠損マウスを用いて検討した。その結果、*GPR43* 全身欠損マウスでは、短鎖脂肪酸の摂餌により白色脂肪組織の重量、肝臓 TG 量の有意な減少、肝脂質代謝関連因子の発現抑制が維持されていたのに対し、*GPR41* 全身欠損マウスでは、白色脂肪組織の重量は有意に減少したが、肝臓 TG 量の有意な減少、肝脂質代謝機能の改善効果は認められなかった。短鎖脂肪酸の摂餌による肝臓の脂質代謝改善作用は、脂肪肝が発生するような肥満状態時に限定的であり、高脂肪食負荷でも肥満を誘導できず、肝臓に脂肪が蓄積していない *GPR41* 全身欠損マウスでは、短鎖脂肪酸が作用しなかった可能性も考えられる。そこで、体重を揃えた非肥満時の野生型マウスおよび *GPR41* 全身欠損マウスに対し、*GPR41* に対するアゴニスト活性が最も高いプロピオン酸を投与することで、非肥満時においても短鎖脂肪酸が *GPR41* を介して肝臓に作用しているのか検討した。その結果、野生型マウスでは、プロピオン酸塩を含む高脂肪食を 4 週間摂餌させた時の肝臓の脂質代謝に関わる遺伝子の発現変化が類似していたのに対し、*GPR41* 全身欠損マウスではその変化が消失した。以上の結果より、まず *GPR41* を介

して短鎖脂肪酸により短時間に肝脂質代謝の変化が生じ、継続的に GPR41 が刺激されることで肝臓 TG 量の抑制につながっている可能性が示唆された。

GPR41 は交感神経節において顕著に発現しており、肝臓における発現量はそれほど高くない^{30,31)}。これは、肝脂質代謝機能の改善における GPR41 の役割を考察する上で大変興味深い。すなわち、短鎖脂肪酸は肝臓に直接作用せず、交感神経節などの他臓器、器官による間接的な作用によって肝臓に影響を与えている可能性が考えられる。*GPR41* が高発現している交感神経節は、短鎖脂肪酸によって活性化されることが分かっており、*GPR41* 全身欠損マウスではこの活性化が消失していることから³¹⁾、短鎖脂肪酸は GPR41 を介して交感神経を活性化することで、肝臓中の TG 量が減少した可能性が考えられる。しかしながら、高脂肪食により肥満を誘導した野生型マウスに対して、6-hydroxydopamine (6-OHDA) を腹腔内投与することで、全身の交感神経を切除した場合に肝臓中の TG 量は減少することが報告されている⁶⁹⁾。そのため、短鎖脂肪酸が GPR41 を介して肝臓中の TG 量の蓄積抑制に寄与しているのかを検証するためには、交感神経特異的な *GPR41* 欠損マウスを作製し解析を進めることが必要である。一方、白色脂肪組織についても、交感神経の活性化により、脂肪分解の促進によって脂肪組織重量が抑制される⁷⁰⁾。しかしながら、本研究では *GPR41* 全身欠損マウスにおいても、短鎖脂肪酸の摂餌により白色脂肪組織重量の減少が維持されていたことから、交感神経の活性化以外のメカニズムがある可能性が示唆された。*GPR43* 全身欠損マウスにおいても、同様の結果が得られたことから、GPR41 と GPR43 が相補的に作用する標的臓器の存在、GPR41 と GPR43 以外の他の短鎖脂肪酸受容体の寄与などの可能性が考えられる。短鎖脂肪酸が白色脂肪組織の脂肪蓄積抑制に寄与するメカニズムについては、*GPR41* と *GPR43* の両方を欠損させたマウスを用いた解析などを含め、さらなる検討が必要である。

野生型マウスと *GPR41* および *GPR43* 全身欠損マウスに対して、短鎖脂肪酸を含む高脂肪食を継続的に摂餌させた結果、各々マウスにおける摂餌量の差はほとんど認められなかった。GPR41 と GPR43 は、共通して消化管下部（回腸から結腸）に局在する腸管 L 細胞に存在し、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸の刺激により食欲抑制ホルモンである GLP-1、PYY を分泌する^{49,50)}。本研究では、野生型マウスに対して短鎖脂肪酸の直接摂餌させた場合、コントロール（高脂肪食のみ・高脂肪食にセルロース混餌）と比較して、血漿中の GLP-1 や PYY 濃度において差が認められなかった。盲腸中の短鎖脂肪酸濃度は、コントロールと差が認められなかったのに対し、血漿中の短鎖脂肪酸濃度は、コントロールと比較して有意な増加が認められたことから、摂餌した短鎖脂肪酸は、消化管下部にはほとんど到達せず、

主に消化管上部から吸収され血中を介して各組織に移行している可能性が示唆された。そのため、短鎖脂肪酸を多く含む食品を直接摂取することに加え、腸内で短鎖脂肪酸を効率的に増やすことが出来れば、食欲抑制作用を有する GLP-1 や PYY 分泌の促進につながり、肥満や肥満由来の代謝性疾患の予防につながることが期待される。

第5節 小括

本章では、食品由来の短鎖脂肪酸が肥満や肥満由来の代謝性疾患における宿主エネルギー代謝機能制御に寄与する可能性、またそのメカニズムについて検討を試みた。さらに、短鎖脂肪酸によるエネルギー代謝機能制御における短鎖脂肪酸受容体 GPR41、GPR43 の役割について検討した。得られた知見を以下に示す。

1. 摂餌した各種短鎖脂肪酸は、主に消化管上部から吸収された後に血流を介して各組織に移行し、体重増加の抑制、肝臓や白色脂肪組織（精巣周囲脂肪組織、腎周囲脂肪組織、皮下脂肪組織）重量の減少、糖代謝の改善に寄与することを明らかにした。
2. *GPR43* 全身欠損マウスは、野生型マウスと同様、継続的な短鎖脂肪酸の摂餌により体重増加の抑制、肝臓中の組織重量、脂肪蓄積量の有意な抑制、さらにエネルギー代謝に関連する遺伝子発現（*Fas*, *Chrebp*, *Ppara*）において有意な増減が認められた。一方、*GPR41* 全身欠損マウスではこれらの効果が消失した。
3. 体重を揃えた野生型マウスと *GPR41* 全身欠損マウスに対し、短鎖脂肪酸の腹腔内投与後 24 時間という短期間での解析を行った結果、野生型マウスでは短鎖脂肪酸を継続的に摂餌させた場合と同様、肝臓中のエネルギー代謝に関わる因子の mRNA 発現量（*Fas*, *Chrebp*, *Ppara*）において有意な差が認められたのに対し、*GPR41* 全身欠損マウスではこれらの効果が消失した。

第3章 PYY 分泌における短鎖脂肪酸受容体 Olfr78 の機能解析

第1節 短鎖脂肪酸受容体 Olfr78 の機能解析

諸言

第2章より、食品由来の短鎖脂肪酸は、主に消化管上部から吸収され、血流を介して肝臓中の脂肪蓄積抑制に寄与すること、この肝臓の代謝機能改善には GPR41 が関与している可能性を見出した。短鎖脂肪酸を認識する受容体である GPR41 と GPR43 は、共通して腸管 L 細胞に存在し、同細胞は短鎖脂肪酸による刺激を受けて食欲抑制ホルモンである GLP-1、PYY を分泌する^{49,50)}。序論で述べた通り、GLP-1 は糖尿病の治療薬（GLP-1 受容体作動薬：リキシセナチド）として既に開発されているが、PYY に着目した治療薬は未だ開発されていない。短鎖脂肪酸の刺激による PYY 分泌の促進作用により、体重や脂肪重量の抑制が動物やヒト試験によって認められていることから^{52,53)}、PYY は、肥満症の新たな治療方法の1つになりうる可能性が期待される。この PYY 分泌について、近年、Gs タンパク質と結合する新規の短鎖脂肪酸受容体 *Olfr78* がマウス腸内に発現しており、PYY 分泌に関与している可能性が示唆された。しかし、*Olfr78* については未だ不明な部分が多い^{54,55)}。*Olfr78* の機能特性、*Olfr78* と PYY 分泌との関連性やそのメカニズムを解明することが出来れば、食欲抑制作用を有する肥満症治療薬の新規開発に貢献できる可能性が期待される。

そこで本節では、新たに同定された短鎖脂肪酸受容体 *Olfr78* に着目し、*Olfr78* を介した PYY 分泌の可能性、およびそのメカニズム解明を目的とし研究を実施した。はじめに、マウスの各組織における *Olfr78* の発現解析、各種脂肪酸を用いた *Olfr78* に対するアゴニスト活性について比較検討した。次に、*Olfr78* を介して PYY が分泌されるメカニズムの解明を目的とし、各種培養細胞レベルでの研究を実施した。

第1項 実験材料および方法

1-1. 動物および負荷実験

実験動物は、第1章第2節2-1および第2章第1節1-1と同様、日本エスエルシー株式会社から購入した6週齢のC57BL/6Jの雄マウスを用いた。全ての実験動物は、室温20~23°C、湿度40~60%の条件下、12時間の明暗サイクル（明期：午前8時—午後8時）で飼育した（東京農工大学動物実験倫理許可 No. 28-87）。

1-2. 剖検および組織採取

1-1の6週齢C57BL/6Jの雄マウスに対し、CE-2（日本クレア）を摂餌させ1週間馴化後、剖検ならびに分析に必要な組織の採取を行った。採取した組織サンプルは重量測定後、アルミホイルに包んで-80°Cで凍結保存した。

1-3. 遺伝子発現解析

マウスから各組織を採取後、RNeasy Mini Kit（QIAGEN）およびRNA isoPlus（タカラバイオ）を用いてRNA抽出した。第2章第1節1-11と同様の方法でcDNA合成後、定量解析した。検出に用いたプライマーの配列を以下に記す（Table 6）。

Table 6. Primer sequences used in this study.

Gene	Forward	Reverse
<i>18S</i>	5'-ACGCTGAGCCAGTCAGTGTA-3'	5'-CTTAGAGGGACAAGTGGCG-3'
<i>Olfir78</i>	5'-TGGATCCCATTGTGCATGTTCTA-3'	5'-AGATGATGGGATTGATCACAGGAG-3'

1-4. *Olfir78* 過剰発現細胞

Olfir78 による細胞増殖などへの影響を排除するために、ドキシサイクリン（Doxycycline）添加により *Olfir78* 発現を誘導できる系を作製した。具体的には、FLAG-*Olfir78* 配列を含む pcDNA5/FRT/TO および pOG44 ベクター混合物を Flp-In T-REx HEK293 細胞に導入して作製した⁷¹⁾。本細胞は、10% Fetal bovine serum（FBS, フナコシ）、ブラストサイジン（フナコシ）、ハイグロマイシン（Invitrogen）を添加した DMEM（Sigma）を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

1-5. cAMP 解析

1-4 の細胞を用いて、24 well プレート (1×10^5 cells/well)、5% CO₂、37 °C、24 時間前培養し、Dox 誘導 (10 µg/mL) を 24 時間行った後、ホスホジエステラーゼ阻害薬として IBMX (500 µM; Sigma) を添加し、様々なカルボン酸化合物を用いて 10 分間刺激した。上清を回収後、Cyclic AMP ELISA Kit (Cayman Chemical) を用いて付属のプロトコールに従って測定した⁷¹⁾。

1-6. 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色は、anti-FLAG antibody (Sigma) および DAPI (Roche) を用いた。4% パラホルムアルデヒド液 (パラホルムアルデヒド 4g に対し、10 倍希釈したリン酸緩衝液 10 mL と 1N NaOH 0.1 mL を加え、蒸留水にて 100 mL に調製) にて固定し、PBS で洗浄後、0.1 % Triton X-100 (Sigma) で透過処理を行い、一次抗体 (Sigma)、蛍光標識二次抗体 (Sigma) と反応させ、蛍光顕微鏡 (BZ-X700, KEYENCE) にて観察した。

1-7. STC-1 細胞を用いた PYY 濃度測定

マウス腸内分泌細胞株である STC-1 細胞は、15% ウマ血清 (Gibco)、5% FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加した DMEM 培地 (Sigma) を用いて 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。PYY 濃度測定は、24 well プレート (3×10^5 cells/well) で 48 時間培養した後、様々なカルボン酸化合物を用いて 60 分間刺激し、上清を回収して、第 2 章 1 節 1-6 と同様の方法で測定した。siRNA ノックダウンは、Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen) を付属のプロトコールに従って使用した。siRNA の配列として、Control: 5'-UGGUUACAUGUCGACUAA-3'、Olf78: 5'-GGAAACACGUGACCCUUA-3' を用いた。阻害剤を用いる場合は、種々カルボン酸化合物の刺激を行う 30 分前に添加した⁷¹⁾。

1-8. 統計分析

結果は、全て平均±標準誤差で表した。統計学的解析は、GraphPad Prism (version 7) を使用した。平均値の比較において、one-way ANOVA により Tukey-Kramer 法 (3 群以上の比較) を用い、*p* 値が 0.05 未満の場合、統計的に有意とした。

第2項 結果

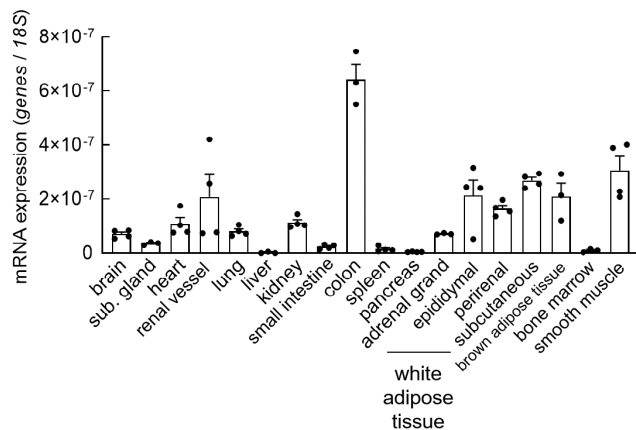
2-1. マウス組織中における *Olfir78* の遺伝子発現解析

7週齢の C57BL/6J の雄マウスを用いて、各組織における *Olfir78* の遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、主に腎血管、大腸、白色および褐色脂肪組織、平滑筋において *Olfir78* の発現が認められた (Figure 13A)。大腸において *Olfir78* の顕著な発現が認められたことから、大腸の各部位について詳細に解析した結果、直腸において特に顕著な発現が認められた。加えて、マウス由来の腸内分泌細胞株である STC-1 細胞においても *Olfir78* 発現が認められた (Figure 13B)。

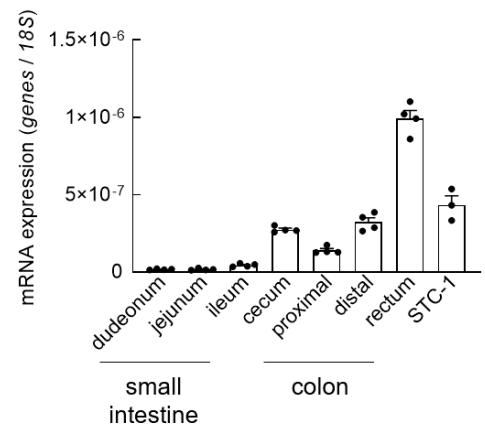
Figure 13. *Olfir78* mRNA abundantly expresses in the intestine.

Olfir78 mRNA expresses in mouse tissues (A), *Olfir78* mRNA expresses in mouse intestine and STC-1 cells (B). Internal control: *18S* rRNA expression. Results are presented as means \pm SEM ($n = 3-4$).

(A)



(B)



2-2. Olfr78 に対するアゴニスト活性評価

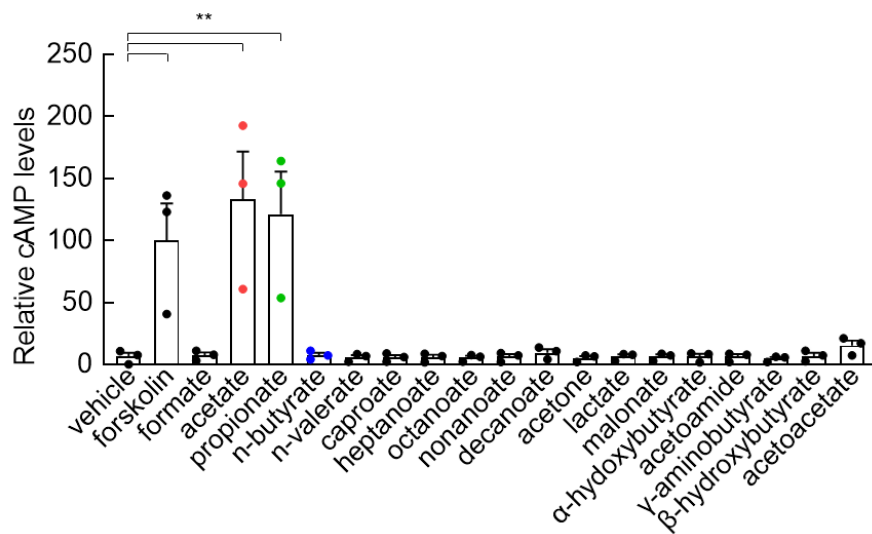
Olfr78 は、アゴニスト活性により Gs タンパク質を介して細胞内 cAMP 濃度を増加させることが知られている³³⁾。そこで、*Olfr78* 発現誘導した細胞を用いて、様々なカルボン酸化合物のアゴニスト活性を比較した。その結果、短鎖脂肪酸である酢酸およびプロピオン酸のアゴニスト活性が最も高く、濃度依存的に細胞内 cAMP 濃度の増加が認められたが、酪酸にはほとんど反応しなかった (Figure 14A-C)。一方、*Olfr78* を発現誘導していない場合では、酢酸やプロピオン酸を添加しても cAMP 濃度の増加は認められなかった (Figure 14D)。

Figure 14. Acetate and propionate are potential endogenous agonists for Olfr78.

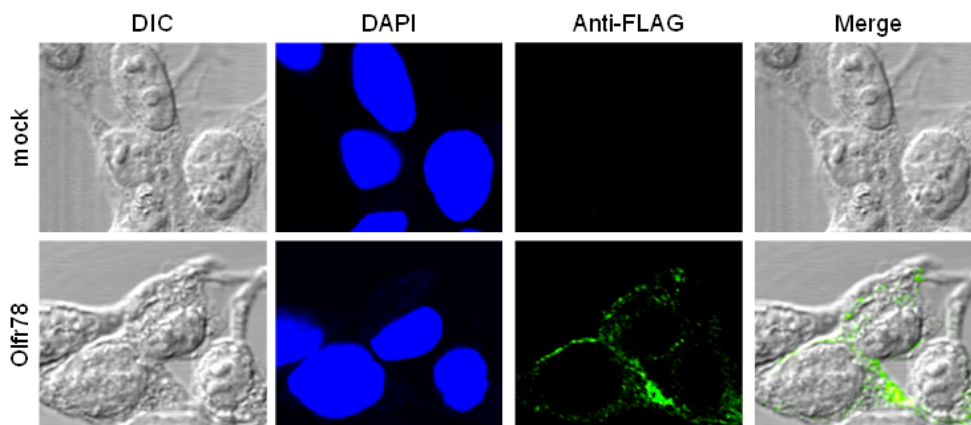
cAMP levels in response to monocarboxylic acids treatment (10 mM each) (A), immunofluorescence staining of acetate treated with or without doxycycline (Scale bar : 10 μ m) (B), treatment with acetate, propionate, and n-butyrate in dose-dependent manner treated with doxycycline (C), cAMP levels in response to acetate, propionate, and n-butyrate without doxycycline (10 mM each) (D) in Flp-In Olfr78 T-REx HEK293 cells.

All data are presented as the means \pm SEM ($n = 3-6$). ** $P < 0.01$.

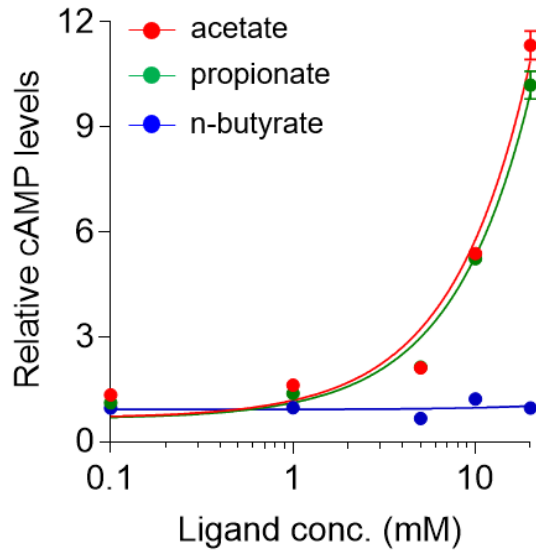
(A)



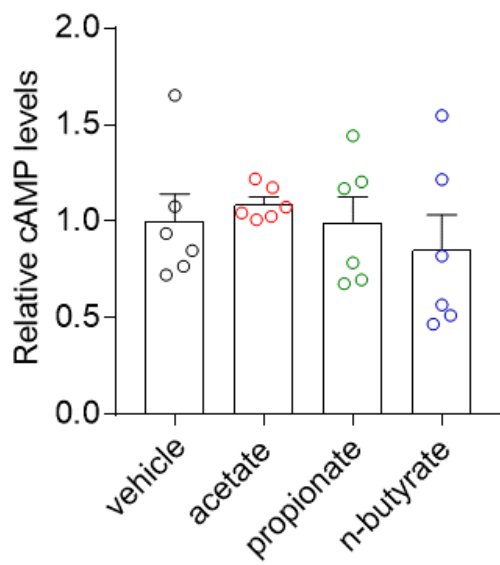
(B)



(C)



(D)



2-3. STC-1 細胞を用いた PYY 分泌のメカニズム

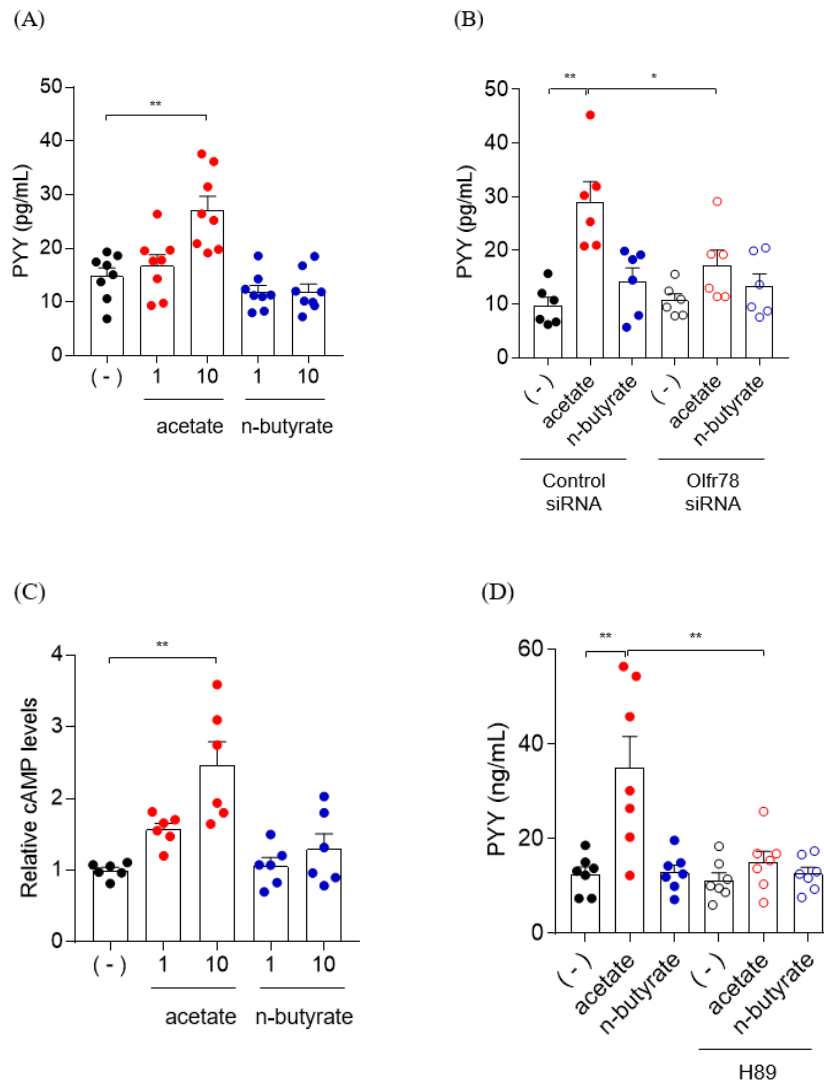
Olfir78 はマウス腸内に発現しており、PYY 分泌に関与している可能性が報告されている⁵⁵⁾。2-1 では、マウス由来の腸内分泌細胞株である STC-1 細胞において *Olfir78* の発現が認められた (Figure 13B)。そこで、*Olfir78* の発現が認められた STC-1 細胞を用いて、短鎖脂肪酸の刺激により *Olfir78* を介して PYY が分泌されているのか検討した。

短鎖脂肪酸の中で、*Olfir78* アゴニスト活性が比較的高い酢酸、対照としてアゴニスト活性の低い酪酸を STC-1 細胞に処置した。その結果、酢酸を添加した時にのみ PYY の分泌が認められ、また *Olfir78* に対する siRNA で処理した場合では、酢酸の効果が消失した (Figure 15A, B)。このことから、酢酸による刺激により *Olfir78* を介して PYY が分泌されている可能性が示唆された。*Olfir78* はアゴニスト刺激を受けることで細胞内 cAMP 濃度が増加し PKA が活性化される³³⁾。そこで、*Olfir78* のアゴニスト刺激により PYY が分泌されるシグナル経路として、PKA の関与について検討した。その結果、STC-1 細胞に酢酸を添加した場合では、濃度依存的に細胞内 cAMP 濃度および PYY 分泌の有意な増加が認められたのに対し、PKA 阻害剤 (H-89) を添加した場合では、これらの増加が消失した (Figure 15C, D)。

以上の結果より、STC-1 細胞では、短鎖脂肪酸（特に酢酸）によるアゴニスト刺激によって、*Olfir78* を介した cAMP 濃度の増加、PKA の活性化が起こり、結果として PYY が分泌されている可能性を見出した。

Figure 15. Acetate promotes PYY secretion in STC-1 cells.

PYY levels in response to 1 mM or 10 mM acetate and n-butyrate (A), PYY levels in response to 10 mM acetate and n-butyrate with control or *Olfcr78* siRNA in STC-1 cells (B), relative cAMP levels in response to 1 mM or 10 mM acetate and n-butyrate in STC-1 cells (C), PYY levels in response to 10 mM acetate and n-butyrate with or without H-89 (PKA inhibitor) in STC-1 cells (D). All data are presented as the means \pm SEM ($n = 6-8$). ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.



第2節 腸内細菌由来の短鎖脂肪酸による Olf78 を介した PYY 分泌

本章第1節では、マウスの各組織における遺伝子発現を網羅的に解析した結果、大腸（特に直腸）において *Olf78* の顕著な発現が認められた。次に、様々なカルボン酸化合物を用いて *Olf78* に対するアゴニスト活性について比較した結果、短鎖脂肪酸である酢酸およびプロピオン酸のアゴニスト活性が最も高く、また、腸内分泌細胞株である STC-1 細胞を用いた *in vitro* の系では、酢酸により *Olf78* を刺激することで、Gs/cAMP/PKA 経路を介して PYY の分泌が促進されることを見出した。

本節では、*in vitro* 試験により得られた知見を基に、短鎖脂肪酸が *Olf78* を介して PYY 分泌に寄与しているのかを *in vivo* の系で検証することとした。第2章第1節の結果より、食品由来の短鎖脂肪酸は、主に消化管上部から吸収されてしまうため、短鎖脂肪酸の摂餌では、消化管下部（回腸から結腸）に局在する腸管 L 細胞からの PYY の分泌について定量的に比較解析することは難しい（Figure 7）。消化管下部に存在する腸内細菌の多くは、オリゴ糖などの難消化性多糖類を資化することで、代謝産物として短鎖脂肪酸を産生する。そこで、難消化性フルクトオリゴ糖（Fructo-oligosaccharides; FOS）を含む試験食をマウスに摂餌させ、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸が PYY の分泌に関与しているかどうかを検討した。実験動物は、野生型マウス、無菌マウス、および *Olf78* 全身欠損マウスを用いて PYY 分泌量を比較した。

第 1 項 実験材料および方法

2-1. 動物および負荷実験

実験動物は、第 1 章第 2 節 2-1 および第 2 章第 1 節 1-1 と同様、日本エスエルシー株式会社から購入した 6 週齢の C57BL/6J 系統および ICR の雄マウスを用いた。短鎖脂肪酸受容体 *Olfir78* 全身欠損マウスは、日本チャールス・リバー株式会社から購入した。日本エスエルシー株式会社から購入した C57BL/6J 系統マウスと 10 世代以上の戻し交配を行い、C57BL/6J 系統 *Olfir78* 全身欠損マウスを作成した⁷²⁾。無菌マウスの作製は、日本クレア株式会社に委託した。無菌実験は、無菌環境を構築した小型ビニールアイソレータ内で行った (50kGy 照射 CL-2 負荷)。全ての実験動物は、室温 20~23°C、湿度 40~60% の条件下、12 時間の明暗サイクル (明期：午前 8 時—午後 8 時) で飼育した (東京農工大学動物実験倫理許可 No. 28-87)。

2-2. 剖検および組織採取

2-1 の各種マウスを 24 時間絶食後、コントロールとして低繊維食 (LFD) のみ (AIN-76A; リサーチダイエット社製)、低繊維食に 10% セルロース、難消化性フルクトオリゴ糖 (FOS, Wako) を含む試験食を 1 時間摂餌させた。飼料成分の組成を次ページにて示す (Table 7)。剖検により血漿と盲腸を採取した。盲腸は重量測定後、アルミホイルに包んで -80°C で凍結保存した。

Table 7. Composition of AIN-76A for FOS supplementation.

	LFD	Cellulose	FOS
Product	%, weight		
Protein	20	18	18
Carbohydrate	66	59.4	59.4
Fat	5	4.5	4.5
Cellulose	0	9.1	0
FOS	0	0	9.1
Ingredient	%, weight		
Casein	20.00	18.00	18.00
DL-Methionine	0.30	0.27	0.27
Corn Starch	15.00	13.50	13.50
Sucrose	50.00	45.00	45.00
Cellulose, BW200	5.00	4.50	4.50
Cellulose (additional)	0.00	10.00	0.00
FOS	0.00	0.00	10.00
Corn Oil	5.00	4.50	4.50
Mineral Mix S10001	3.50	3.15	3.15
Vitamin Mix V10001	1.00	0.90	0.90
Choline Bitartrate	0.20	0.18	0.18

2-3 盲腸中の短鎖脂肪酸の定量

第2章第1節1-4と同様の方法で解析した。

2-4. 血漿中の PYY 濃度測定

第2章第1節1-6と同様の方法で測定した。

2-5. 統計分析

結果は、全て平均±標準誤差で表した。統計学的解析は、GraphPad Prism（version 7）を使用した。平均値の比較において、one-way ANOVAによりTukey-Kramer法（3群以上の比較）を用い、 p 値が0.05未満の場合、統計的に有意とした。

第2項 結果

腸内細菌由来の短鎖脂肪酸が PYY の分泌に関与しているかどうかを検討するために、野生型マウスと無菌マウスを用いて比較した。無菌マウスは、難消化性の食物繊維を分解することが出来ないため、盲腸内に食物繊維が貯留し、盲腸が著しく肥大する。そのため、難消化性フルクトオリゴ糖 (FOS) を含む試験食を無菌マウスに摂餌させた場合、ほとんどの FOS が盲腸内に貯留する可能性が考えられる。そこで本研究では、*Olfir78* の発現が認められた盲腸中の短鎖脂肪酸濃度を比較した。野生型マウスに 10% FOS を含む試験食を摂餌させた場合では、コントロール (試験食のみ) および腸内細菌に資化されにくい 10% セルロースを含む試験食を摂餌させた場合と比較して、盲腸中の酢酸およびプロピオン酸の有意な増加が認められた (Figure 16A)。一方、酪酸については差が認められなかった。また、無菌マウスでは、いずれの摂餌群においても短鎖脂肪酸がほぼ検出できなかったことから、FOS により増加した短鎖脂肪酸は、腸内細菌の資化により生じたものと考えられた。次に、血漿中の PYY 分泌量について比較した結果、FOS の摂取時において、野生型マウスでは PYY 分泌量の有意な増加が認められたのに対し、無菌マウスでは PYY 分泌量の増加は起こらなかった (Figure 16B)。このことから、腸内細菌由来の代謝産物の 1 つである短鎖脂肪酸 (特に酢酸、プロピオン酸) が、PYY 分泌に寄与している可能性が示唆された。

次に、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸が 腸管内 *Olfir78* を介して PYY 分泌に関与しているのか検討するため、野生型マウスと *Olfir78* 全身欠損マウスを用いて比較した。FOS を含む試験食を摂餌させた場合では、野生型マウスの盲腸中の酢酸およびプロピオン酸の産生量と *Olfir78* 全身欠損マウスの産生量に差は認められなかった (Figure 17A, B)。一方、血漿中の PYY においては、野生型マウス、*Olfir78* 全身欠損マウスともに FOS の摂取により上昇したものの、野生型マウスに比較して *Olfir78* 全身欠損マウスでは有意に低い濃度となった (Figure 17C)。

以上の結果より、FOS などの食物繊維を腸内細菌が利用することで産生される短鎖脂肪酸 (特に酢酸、プロピオン酸) は、腸管内の *Olfir78* を刺激することで PYY の分泌に関与している可能性が示唆された。

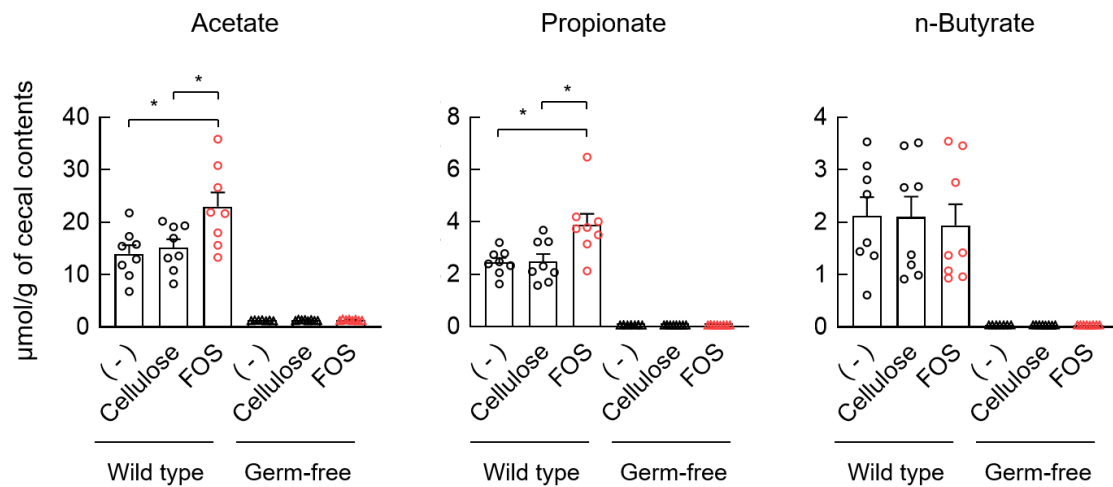
Figure 16. Gut microbial SCFAs increase plasma PYY levels.

Cecal SCFAs levels (A) and plasma PYY levels (B) in wild type and germ-free mice fed AIN-76A diet containing 10% cellulose or FOS.

All data are presented as the means \pm SEM ($n = 8$). $**P < 0.01$, $*P < 0.05$.

FOS : Fructo-oligosaccharides.

(A)



(B)

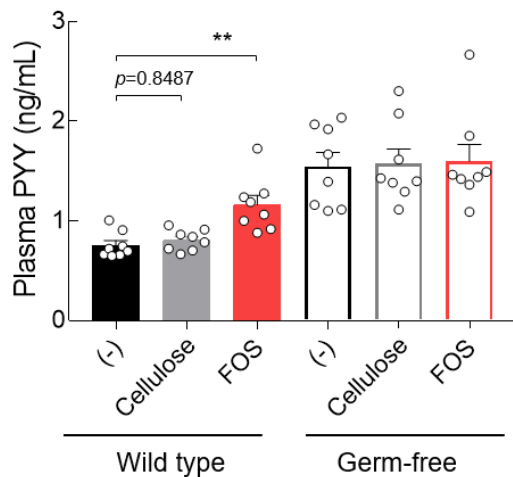


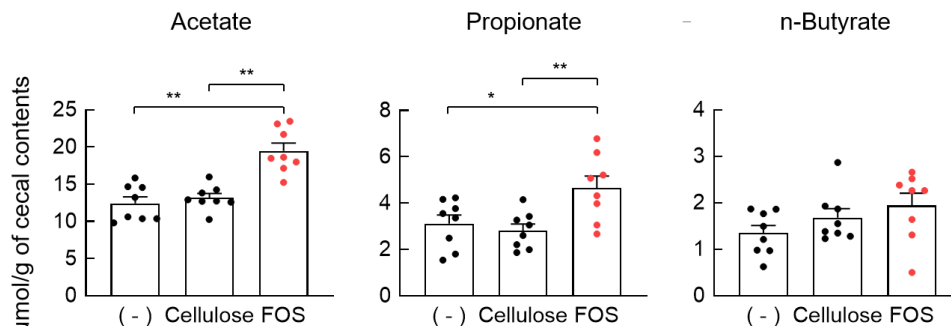
Figure 17. Gut microbial SCFAs increase plasma PYY levels via *Olfcr78*.

Cecal SCFAs levels in wild type mice (A) and *Olfcr78*^{-/-} mice (B), plasma PYY levels in wild type and *Olfcr78*^{-/-} mice (C) fed AIN-76A diet containing 10% cellulose or FOS.

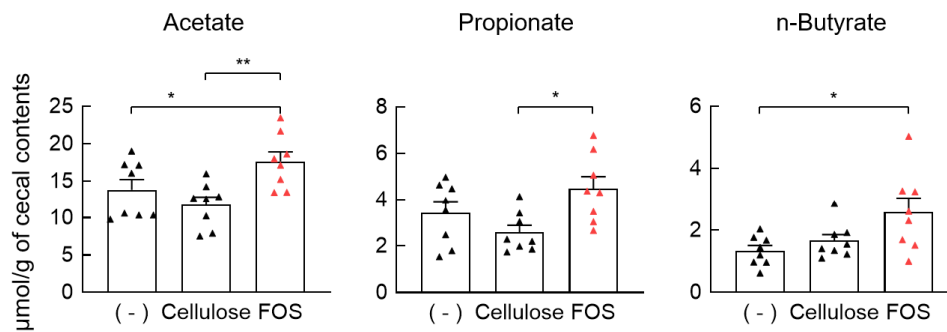
All data are presented as the means \pm SEM ($n = 8$). ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

FOS : Fructo-oligosaccharides.

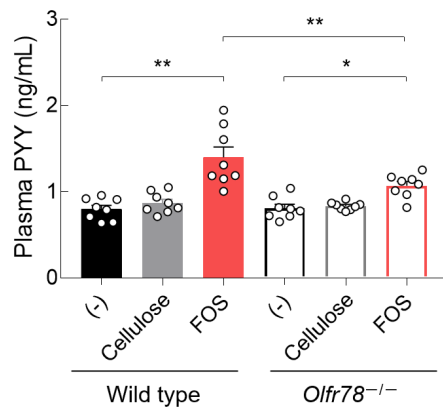
(A)



(B)



(C)



第3節 考察

本章では、肥満の予防や改善に重要な標的の1つとして期待されている食欲抑制ホルモン PYY に着目し、新たに同定された短鎖脂肪酸受容体 Olfr78 を介した PYY 分泌の可能性、およびそのメカニズム解明を目的とし研究を実施した。

第1節では、マウス組織を用いて *Olfr78* の発現部位を網羅的に解析した。その結果、*Olfr78* は小腸（十二指腸、空腸、回腸）ではほとんど発現せず、大腸（特に直腸）に強く発現することがわかった。PYY の分泌細胞として知られる 腸管 L 細胞は、大腸に加えて回腸を含む小腸下部にも存在することが報告されている⁴⁸⁾。今回明らかにした *Olfr78* の発現分布は L 細胞の分布と一部異なる結果となったが、腸内細菌が多く存在する大腸において *Olfr78* の発現が高くなることは非常に興味深い結果であり、腸内細菌と *Olfr78* との関わりが示唆された。

次に *Olfr78* に対するアゴニスト活性について、様々なカルボン酸化合物を用いて比較検討した。その結果、短鎖脂肪酸である酢酸およびプロピオン酸のアゴニスト活性が最も高く、酪酸にはアゴニスト活性がほとんどないことが明らかとなった。また、短鎖脂肪酸による GPR41 や GPR43 の EC₅₀ は μM レベルであるのに対し^{73, 74)}、*Olfr78* の EC₅₀ は mM レベルであり、非常に高濃度の短鎖脂肪酸にしか反応しないことが明らかとなった。摂食の有無によって腸内における短鎖脂肪酸の総濃度は 20~140 mM に変化することから⁷⁴⁾、*Olfr78* は腸管上皮における PYY 分泌に重要な役割を果たす可能性が考えられた。そこで、*Olfr78* の発現が認められたマウス STC-1 細胞を用いて、短鎖脂肪酸による PYY 分泌と、その分泌における *Olfr78* の役割について検討した。その結果、酢酸で刺激したマウス STC-1 細胞は、*Olfr78*/Gs/cAMP/PKA 経路の活性化を介して PYY を分泌する可能性が示唆された。

これまでにマウスなどの齧歯類を用いた動物実験においては、各種短鎖脂肪酸の刺激により GPR41、GPR43 を介した PYY 分泌の増加が認められている。例えば、野生型マウスにプロピオン酸を結腸内投与した場合では、PYY 濃度の増加が認められたのに対して、*GPR43* 全身欠損マウスでは、これらの作用が減弱したこと⁷⁵⁾。また、多糖類を利用して短鎖脂肪酸を産生する腸内細菌 2 種 (*Bacteroides thetaiotaomicron*, *Methanobrevibacter smithii*) を定着させたノトバイオームマウス（野生型および *GPR41* 全身欠損マウス）を作製し、各々のマウスに多糖類を含む試験食を 4 週間摂餌させた結果、*GPR41* 全身欠損マウスは、野生型マウスと比較して、PYY の分泌量が少なかったことが報告されている³⁰⁾。このように、*Olfr78* と同様に短鎖脂肪酸をリガンドとする GPR41 や GPR43 も PYY 分泌に寄与していることが考えられるが、今回検討したマウス STC-1 細胞では、GPR41 に対して弱いアゴ

ニスト活性を持つ酢酸を添加した場合、PYY の分泌が認められなかった。また、Olf78 に加えて GPR43 にもアゴニスト活性を持つ酢酸を添加した場合、Olf78 siRNA 処置により PYY の分泌はほぼ消失した。これらの結果は、これまでの既報の研究結果と異なり、マウス STC-1 細胞では GPR41 や GPR43 は PYY の分泌にほとんど寄与していないことを示唆している。このことから、Olf78 を介した PYY の分泌メカニズムは、マウス STC-1 細胞に特異的な現象であり、生体における PYY の分泌を正しく反映できていない可能性が考えられる。

そこで第 2 節では、マウスに難消化性フルクトオリゴ糖 (FOS) を含む試験食を摂餌させ、腸内細菌によって FOS が資化され短鎖脂肪酸が産生されることで、生体内での Olf78 の生理的な役割について検討した (*in vivo*)。腸内細菌由来の短鎖脂肪酸が PYY の分泌に関与しているかどうかを検討するために、野生型マウスと無菌マウスを用いて比較した。無菌マウスは、難消化性の食物繊維を分解することが出来ないため、FOS を含む試験食を無菌マウスに摂餌させた場合、ほとんどの FOS が盲腸内に貯留する。そこで本研究では、Olf78 の発現が認められた盲腸中の短鎖脂肪酸濃度を比較した。野生型マウスでは、FOS 摂餌後に盲腸内の酢酸とプロピオン酸濃度の上昇、血漿中の PYY 濃度の増加が認められたのに対し、無菌マウスでは、FOS 摂餌による盲腸内の酢酸およびプロピオン酸濃度と血漿中の PYY 濃度の増加が認められなかった。この結果から、FOS を摂餌したことで、腸内細菌が産生した酢酸とプロピオン酸が腸管 L 細胞を刺激し、PYY の分泌が促進された可能性が示唆された。興味深いことに、試験食のみを摂餌した無菌マウスと野生型マウスの血漿中の PYY 濃度を比較した結果、無菌マウスの方が野生型マウスよりも血漿中の PYY 濃度が高かった。考えられる理由として、無菌マウスは野生型マウスと比較して、腸管 L 細胞の数が多いことが挙げられる⁷⁶⁾。同細胞は短鎖脂肪酸だけでなく、糖類や脂肪酸、アミノ酸などの刺激によっても PYY を分泌することが知られている⁷⁷⁾。したがって、無菌マウスは、腸管 L 細胞の数が野生型マウスよりも多いため、試験食中に含まれる糖類や脂肪酸、アミノ酸などの成分が腸管 L 細胞を刺激し、血漿中の PYY 分泌濃度が高くなった可能性が考えられる。

また FOS による PYY の分泌は、Olf78 全身欠損マウスでは有意に抑制されていたことから、短鎖脂肪酸による PYY の分泌において Olf78 が重要な役割を果たすことが明らかとなった。Olf78 全身欠損マウスが FOS を摂餌した場合でも、野生型マウスよりは増加が少ないが、血漿中の PYY 濃度が有意に増加し、Olf78 非依存的な PYY 分泌経路が存在することが示唆された。上述した GPR41 や GPR43 全身欠損マウスの先行研究の知見と合わせて

考えると^{30, 75)}、生体では Olf78 のみならず GPR41 と GPR43 も PYY 分泌に寄与する可能性が示唆された。今後は、食後の PYY 分泌における Olf78、GPR41 および GPR43 の役割の違いなどを明らかにするために、これらのダブル、トリプルノックアウトマウスの解析が必要であると考ええる。

本研究では、血漿中の PYY 分泌濃度を指標として、短鎖脂肪酸受容体 Olf78 の役割について明らかにした。しかしながら、PYY 分泌を通じた食欲抑制作用、体重増加抑制における短鎖脂肪酸受容体 Olf78 の役割については、今後の検討課題とした。肥満症治療への応用を目指し、高脂肪食により肥満を誘導した野生型マウスを用いて FOS の長期的な摂餌による体重変化や PYY 分泌を介した食欲抑制作用についても検討する必要がある。今後、短鎖脂肪酸受容体 Olf78 の意義について更なる理解を深めることで、Olf78 を介した PYY 分泌による食欲抑制メカニズムがより明らかとなり、肥満症治療薬の新規開発につながることを期待する。

第4節 小括

本章では、短鎖脂肪酸受容体として新たに同定された Olfr78 の機能解析を主体とし、マウス組織における *Olfr78* の発現と様々なカルボン酸化合物を用いた Olfr78 に対するアゴニスト活性について比較検討した。さらに、Olfr78 を介して PYY が分泌されるメカニズムの解明を目的とし、各種細胞およびマウスを用いて検討した。得られた知見を以下に示す。

1. マウス組織を用いて *Olfr78* の発現を網羅的に解析した結果、特に腸管である直腸において顕著な発現が認められた。次に、様々なカルボン酸化合物を用いて Olfr78 に対するアゴニスト活性を比較した結果、短鎖脂肪酸である酢酸およびプロピオン酸のアゴニスト活性が最も高く、濃度依存的に細胞内 cAMP 濃度の増加が認められた。
2. 各種細胞、無菌マウスおよび *olfr78* 全身欠損マウスを用いて検討した結果、短鎖脂肪酸（特に酢酸、プロピオン酸）は、Olfr78/Gs/cAMP/PKA 経路を介して PYY の分泌を促進していることを明らかにした。

総括

肥満が社会問題となっている今日、日本国内において、有効性・安全性が認められている特異的な肥満症治療薬の開発は喫緊の課題である。また、序論で述べた通り、肥満由来のメタボリックドミノ上流に存在する脂肪肝は、症状が進行することで肝硬変や肝癌を招く重要な疾患であると認識されつつも、特異的な薬物治療薬は未だ開発されていない。

このような中、近年、腸内細菌叢を改善することで肥満や脂肪肝などの代謝性疾患を未然に予防・改善出来る可能性が明らかになりつつある。乳酸菌やビフィズス菌などのプロバイオティクスは、腸内細菌叢を改善する方法の1つであり、これらプロバイオティクスの摂取により、腸内細菌叢が変化することで肥満改善効果につながるものと考えられていたが、その明確なメカニズムまでは明らかにされていなかった。そこで本研究では、腸内細菌の代謝産物の変化に着目し、肥満や脂肪肝などの代謝性疾患の予防・改善出来る可能性とそのメカニズム解明を目的とし、研究を実施した。

第1章では、代表的なプロバイオティクスであるビフィズス菌、乳酸菌と腸内細菌の相互作用による代謝機能改善メカニズムの解明を目的とし、ヒトおよびマウスの大便秘料や肥満モデルマウスを用いて研究を実施した。ヒト大便秘料を用いた培養実験では、ビフィズス菌、乳酸菌の添加により、短鎖脂肪酸であるプロピオン酸を産生する腸内細菌の増加が認められた。また、高脂肪食により肥満を誘導した野生型マウスにおいて、これらプロバイオティクスを摂餌させたマウスでは、短鎖脂肪酸である酢酸、プロピオン酸を産生する腸内細菌の増加が認められた。これらマウスでは、体重増加の抑制傾向が認められたことから、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸の作用が期待された。短鎖脂肪酸は、腸内細菌から産生されるだけでなく、発酵食品などにも含まれており、私たちは日々の食事から短鎖脂肪酸を摂取している。そこで第2章では、第1章の結果を基に、高脂肪食により肥満を誘導した野生型マウスに短鎖脂肪酸を摂餌させ、代謝機能への影響について検討した。その結果、短鎖脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸）は、摂取後、主に消化管上部で吸収され、血流を介して体重増加の抑制、糖代謝機能の改善、肝臓および白色脂肪組織（精巣周囲脂肪組織、腎周囲脂肪組織、皮下脂肪組織）における脂肪蓄積抑制に寄与すること、肝臓の代謝機能改善には、短鎖脂肪酸受容体の中でも GPR41 が関与している可能性を見出した。さらに第3章では、短鎖脂肪酸受容体として新たに同定された Olfr78 に着目し、Olfr78 を介した食欲抑制ホルモン PYY の分泌調節について検討した。その結果、マウス組織内では、大腸（特に直腸）において *Olfr78* の発現が最も高いこと、Olfr78 に対するアゴニスト活性は、酢酸およびプロピオン酸が最も高く、酪酸にはほとんど活性がないことを明らか

にした。さらに各種細胞、無菌マウスおよび *Olfir78* 全身欠損マウスを用いて検討した結果、短鎖脂肪酸（特に酢酸、プロピオン酸）が、*Olfir78*/Gs/cAMP/PKA 経路を介して、PYY の分泌促進に寄与している可能性を見出した。

本研究では、マウスを用いた研究成果を基に食品由来と腸内細菌由来の短鎖脂肪酸の代謝改善作用の分子基盤を明らかにすることが出来た。短鎖脂肪酸の中で最も臨床応用に向けた研究が進んでいるものがプロピオン酸である。マウスやラットを用いた動物試験において、プロピオン酸の直接的な摂餌により体重増加が抑制され、PYY の分泌が促進されたこと⁴⁰⁾、腸管 L 細胞まで到達するように修飾したプロピオン酸をヒト肥満者に投与した場合に、PYY の分泌促進に加えて体重や脂肪重量が有意に減少したことが報告されていることから⁵³⁾、プロピオン酸は肥満症改善の有力な標的因子になると期待されている。本研究により、プロピオン酸は治療方法が確立していない脂肪肝に対しても有効である可能性が示唆された。プロピオン酸は GPR41、GPR43 に加えて *Olfir78* にも高い結合親和性を有しており、様々な代謝性疾患の治療に応用可能であると期待できる。今回検討した 3 種の短鎖脂肪酸受容体は、腸管以外にも全身に存在しており、各々の部位において代謝調節以外の作用があることが明らかになりつつある。そのため、プロピオン酸を治療に応用する場合は、全身に存在する短鎖脂肪酸受容体を活性化する可能性から全身の受容体を介した副作用についても考慮する必要がある。食品由来、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸が消化管から吸収されて血中に移行した際の全身作用、腸内細菌由来短鎖脂肪酸による大腸下部での局所的な作用の比較などを含め、プロピオン酸の医療応用は慎重に行われるべきであろう。

本研究では、酢酸もプロピオン酸と同様にマウスの体重増加と脂肪肝の発症を抑制することが示唆された。既報においても酢酸を肥満誘導マウスに直接摂餌させた場合、プロピオン酸とほぼ同等の体重増加の抑制が認められており⁴⁰⁾、酢酸の医療応用への可能性が期待できる。しかしながら、ヒト臨床研究では酢酸の摂取による体重抑制効果は認められなかったと報告されており⁷⁸⁾、単純な酢酸の経口摂取では、酢酸が腸管 L 細胞まで到達せず、ヒトの代謝調節に明確な効果が認められない可能性が考えられる。マウスでの検討結果では、食物繊維の 1 種であるイヌリンを摂餌させることで腸内細菌由来の酢酸が肝臓のインスリン抵抗性を改善し、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）を抑制できることが報告されている⁷⁹⁾。そのため、プロピオン酸と同様に腸管 L 細胞まで到達できるような酢酸の摂取方法を開発することで、ヒトにおける肥満症や脂肪肝の予防・改善への応用が期待できる。

最後に、酪酸は、GPR41 や GPR43 に対するアゴニスト活性がプロピオン酸よりも低いことが知られており^{34,35)}、本研究では、Olf78 に対するアゴニスト活性がほとんど認められないことが明らかとなった。しかしながら、酪酸を肥満誘導マウスに直接摂餌させた場合、酢酸やプロピオン酸とほぼ同等の体重増加の抑制および代謝機能の改善効果が認められた。既報でも、酪酸を含む高脂肪食をマウスに摂餌させた場合に体重増加の抑制が認められており⁴⁰⁾、今回の実験結果なども合わせて考えると、GPR41 や GPR43、Olf78 以外の他の短鎖脂肪酸受容体に対して、酪酸が作用している可能性が考えられる。例えば、近年、短鎖脂肪酸をリガンドとする新たな GPCRs として GPR109A が同定されており、この GPR109A に対するリガンド活性は、短鎖脂肪酸の中で酪酸が最も高い⁸⁰⁾。GPR109A は、酪酸によるリガンド刺激により小腸での免疫寛容誘導能を強化することで、腸粘膜環境の維持、経口免疫寛容による抗食物アレルギー作用を示すことが知られている⁸⁰⁾。その他、炎症やアレルギーなどを抑える制御性 T 細胞の増殖に寄与するなど⁸¹⁾、酪酸は免疫系を調節する因子として非常に重要であることが明らかになりつつある。酪酸における代謝調節作用についてはこれまでほとんど報告がなく、今後は代謝における酪酸の役割について GPR109A に注目しつつ検証が進むことが期待される。

今回の研究では、様々な短鎖脂肪酸が代謝に及ぼす影響とそのメカニズムの一端を明らかにすることが出来た。これらの知見は、肥満や脂肪肝などの代謝性疾患を予防・改善するために、腸内細菌由来の短鎖脂肪酸量を調節する機能性表示食品や特定保健用食品の開発だけでなく、短鎖脂肪酸の受容体をターゲットとした新たな創薬開発にも役立てられる可能性がある。今後更なる検討を重ねることで、肥満や脂肪肝などの代謝性疾患を改善する短鎖脂肪酸のメカニズムがより明らかとなり、科学的に確かなエビデンスを有する予防・治療戦略が医学・薬学分野で新たに確立されることを期待する。

謝辞

本研究論文審査にあたり、有益な御助言とご指導を賜りました神戸薬科大学 微生物化学研究室 小西守周教授、臨床薬学研究室 江本憲昭教授、衛生化学研究室 長谷川潤教授、生化学研究室 灘中里美准教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました一般財団法人辨野腸内フローラ研究所 辨野義己理事長（理化学研究所名誉研究員）並びに京都大学大学院生命科学研究科 木村郁夫教授に謹んで感謝の意を表します。さらに、多くの有益な御助言と御協力を賜りました京都大学 大植隆司助教、東京農工大学 宮本潤基准教授に衷心より御礼申し上げます。また、本研究の遂行にあたり多大なる御指導と御協力を賜りました Noster 株式会社の諸氏に心より感謝申し上げます。最後に、様々な面で研究生生活を支えてくれた家族に深く感謝致します。

参考文献

- 1) Robert JH. Obesity and obesity-induced inflammatory disease contribute to atherosclerosis: a review of the pathophysiology and treatment of obesity. *Am J Cardiovasc Dis.* **2021**, 11, 504-529.
- 2) 小川渉. 肥満症の概念と診断・治療. 肥満症診療ガイドライン. **2022**, 1-7.
- 3) 伊藤裕. メタボリックドミノとCKD. 日内会誌. **2011**, 100, 191-198.
- 4) 食抑制剤マジンドール錠. サイレックス錠添付文書. **2022**.
- 5) 渡部正教. 肥満症治療薬の最先端. 実験医学. **2021**, 39, 203-207.
- 6) 厚生労働省ホームページ. 国民健康・栄養調査. **2019**.
- 7) Hsu WC, Araneta MRG, Kanaya AM, *et al.* BMI cut points to identify at-risk Asian Americans for type 2 diabetes screening. *Diabetes Care.* **2015**, 38, 150-158.
- 8) Sender R, Fuchs S, & Milo R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell.* **2016**, 164, 337-340.
- 9) Peter JT, Ruth EL, Michael AM, *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* **2006**, 444, 1027-1031.
- 10) Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, *et al.* Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature.* **2013**, 498, 99-103.
- 11) Qin J, Li Y, Cai Z, *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* **2012**, 490, 55-60.
- 12) Sato J, Kanazawa A, Ikeda F, *et al.* Gut dysbiosis and detection of "live gut bacteria" in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* **2014**, 37, 2343-2350.
- 13) Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, *et al.* Human genetics shape the gut microbiome. *Cell.* **2014**, 159, 789-799.
- 14) Nishijima S, Suda W, Oshima K, *et al.* The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Res.* **2016**, 23, 125-133.
- 15) Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* **2012**, 486, 222-227.
- 16) Carmody RN, Gerber GK, Luevano JM, *et al.* Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell Host Microbe.* **2015**, 17, 72-84.
- 17) Fuller R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **1989**, 66, 365-378.

- 18) Wolfe BE & Dutton RJ. Fermented Foods as Experimentally Tractable Microbial Ecosystems. *Cell*. **2015**, 161, 49-55.
- 19) Marco ML, Heeney D, Binda S, *et al.* Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr Opin Biotechnol*. **2017**, 44, 94-102.
- 20) Ashaolu TJ & Reale A. A Holistic Review on Euro-Asian Lactic Acid Bacteria Fermented Cereals and Vegetables. *Microorganisms*. **2020**, 8, 1176.
- 21) Lee A, Lee YJ, Yoo HJ, *et al.* Consumption of Dairy Yogurt Containing *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* and Heat-Treated *Lactobacillus plantarum* Improves Immune Function Including Natural Killer Cell Activity. *Nutrients*. **2017**, 9, 558.
- 22) 辨野義己. 腸内常在菌叢への介入. 実験医学. **2014**, 32, 25-30.
- 23) Hamad EM, Sato M, Uzu K, *et al.* Milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats. *Br J Nutr*. **2009**, 101, 716-724.
- 24) Aronsson L, Huang Y, Parini P, *et al.* Decreased fat storage by *Lactobacillus paracasei* is associated with increased levels of angiopoietin-like 4 protein (ANGPTL4). *PLOS ONE*. **2010**, 5, e13087.
- 25) Tanida M, Shen J, Maeda K, *et al.* High-fat diet-induced obesity is attenuated by probiotic strain *Lactobacillus paracasei* ST11 (NCC2461) in rats. *Obes Res Clin Pract*. **2008**, 2, 159-169.
- 26) Arora T, Singh S, & Sharma RK. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition*. **2013**, 29, 591-596.
- 27) Jean GL, Florian C, Rebeca M, *et al.* Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microb Cell Fact*. **2017**, 16, 79.
- 28) 光岡知足. 腸内菌叢の機能. 腸内細菌学. **1990**, 307-319.
- 29) Canfora EE, Jocken JW, & Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol*. **2015**, 11, 577-591.
- 30) Samuel BS, Shaito A, Motoike T, *et al.* Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2008**, 105, 16767-16772.

- 31) Kimura I, Inoue D, Maeda T, *et al.* Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41(GPR41). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2011**, 108, 8030-8035.
- 32) Kimura I, Ozawa K, Inoue D, *et al.* The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun.* **2013**, 4, 1829.
- 33) Priyadarshini M, Kotlo KU, Dudeja PK, *et al.* Role of short chain fatty acid receptors in intestinal physiology and pathophysiology. *Compr Physiol.* **2019**, 8, 1091-1115.
- 34) Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, *et al.* The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem.* **2003**, 278, 11312-11319.
- 35) Poul EL, Loison C, Struyf S, *et al.* Functional Characterization of Human Receptors for Short Chain Fatty Acids and Their Role in Polymorphonuclear Cell Activation. *J Biol Chem.* **2003**, 278, 25481-25489.
- 36) Byrne CS, Chambers ES, Morrison DJ, *et al.* The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *Int J Obes.* **2015**, 39, 1331-1338.
- 37) Nishitsuji K, Xiao J, Nagamoto R, *et al.* Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome. *Sci Rep.* **2017**, 7, 15876.
- 38) Sanna S, Zuydam NR, Mahajan A, *et al.* Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nat Genet.* **2019**, 51, 600-605.
- 39) Cornejo PI, Garach AM, Posigo MC, *et al.* Importance of gut microbiota in obesity. *Eur J Clin Nutr.* **2019**, 72, 26-37.
- 40) Lu Y, Fan C, Li P, *et al.* Short chain fatty acids prevent high-fat-diet-induced obesity in mice by regulating G protein-coupled receptors and gut microbiota. *Sci Rep.* **2016**, 6, 37589.
- 41) Canfora EE, Jocken JW, & Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol.* **2015**, 11, 577-591.
- 42) Sieuwerts S, Bok FAM de, Hugenholtz J, *et al.* Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Appl Environ Microbiol.* **2008**, 74, 4997-5007.
- 43) Montel MC, Buchin S, Mallet A, *et al.* Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int J Food Microbiol.* **2014**, 177, 136-154.

- 44) Li S, Li P, Feng F, *et al.* Microbial diversity and their roles in the vinegar fermentation process. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2015**, 99, 4997-5024.
- 45) Cameleyre M, Lytra G, Tempere S, *et al.* 2-Methylbutyl acetate in wines: Enantiomeric distribution and sensory impact on red wine fruity aroma. *Food Chem.* **2017**, 237, 364-371.
- 46) Pandey A, Srivastava S, Rai P, *et al.* Cheese whey to biohydrogen and useful organic acids: A non-pathogenic microbial treatment by *L. acidophilus*. *Sci Rep.* **2019**, 9, 8320.
- 47) Kalo P, Kemppinen A, & Ollilainen V. Determination of triacylglycerols in butterfat by normal-phase HPLC and electrospray-tandem mass spectrometry. *Lipids.* **2009**, 44, 169-195.
- 48) Latorre R, Sternini C, Giorgio RD, *et al.* Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterol Motil.* **2016**, 28, 620-630.
- 49) Larraufie P, Gallausiaux MC, Lapaque N, *et al.* SCFAs strongly stimulate PYY production in human enteroendocrine cells. *Sci Rep.* **2018**, 8, 74.
- 50) Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, *et al.* Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes.* **2012**, 61, 364.
- 51) Lukas D, Sibylle O, Michel C, *et al.* Effect of peptide YY3-36 on food intake in humans. *Gastroenterology.* **2005**, 9, 1430-1436.
- 52) June Z, Roy JM, Richard TT, *et al.* Dietary resistant starch upregulates total GLP-1 and PYY in a sustained day-long manner through fermentation in rodents. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2008**, 295, E1160-E1166.
- 53) Chambers ES, Viardot A, Psichas A, *et al.* Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut.* **2015**, 64, 1744-1754.
- 54) Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, *et al.* Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2013**, 110, 4410-4415.
- 55) Fleischer J, Bumbalo R, Bautze VJ, *et al.* Expression of odorant receptor Olfr78 in enteroendocrine cells of the colon. *Cell Tissue Res.* **2015**, 361, 697-710.
- 56) Arumugam M, Raes J, Pelletier E, *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* **2011**, 473, 174-180.
- 57) Odamaki T, Kato K, Sugahara H, *et al.* Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.* **2016**, 16, 90.

- 58) Tanaka Y & Benno Y. Application of a single-colony coculture technique to the isolation of unculturable gut bacteria. *Microbiol Immunol.* **2015**, 59, 63-70.
- 59) Louis P, Hold GL, & Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol.* **2014**, 2, 661-672.
- 60) Reichardt N, Duncan SH, Young P, *et al.* Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME J.* **2014**, 8, 1323-1335.
- 61) Nguyen TLA, Vieira-Silva S, Liston A, *et al.* How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech.* **2015**, 8, 1-16.
- 62) 山本憲二. 乳酸菌の定義. 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス誌. **2010**, 8-10.
- 63) 山本憲二. ビフィズス菌の定義. 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス誌. **2010**, 80-82.
- 64) Herreweghen FV, Abbeele den PV, Mulder TD, *et al.* In vitro colonisation of the distal colon by *Akkermansia muciniphila* is largely mucin and pH dependent. *Benef Microbes*, **2017**, 8, 81-96.
- 65) Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, *et al.* Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut.* **1987**, 28, 1221-1227.
- 66) 永嶋智子. *Lactobacillus* 属による腎盂腎炎から菌血症をきたした妊娠合併 2 型糖尿病の 1 例. 糖尿病誌. **2018**, 61, 827-832.
- 67) 藤岡載三. 尿・腹水から *Bifidobacterium breve* を分離した 1 症例. 医学検査誌. **2019**, 68, 370-375.
- 68) Gijs B, Aycha B, Albert G, *et al.* Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPAR γ -Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. *Diabetes.* **2015**, 64, 2398-2408.
- 69) Chansol H, Hayk S, Donald AM *et al.* Liver sympathetic denervation reverses obesity-induced hepatic steatosis. *J Physiol.* **2019**, 597, 4565-4580.
- 70) 永井克也. 自律神経による生体制御とその利用. 化学と生物. **2013**, 51, 160-167.
- 71) Miyamoto J, Ohue-Kitano R, Mukouyama H, *et al.* Ketone body receptor GPR43 regulates lipid metabolism under ketogenic condition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2019**, 116, 23813-23821.
- 72) Miyamoto J, Kasubuchi M, Nakajima A, *et al.* The role of short-chain fatty acid on blood pressure regulation. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* **2016**, 25, 379-383.
- 73) Koh A, Vadder FD, Datchary PK, *et al.* From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty

- acids as key bacterial metabolites. *Cell*. **2016**, 165, 1332-1345.
- 74) Kimura I, Ichimura A, Ohue-Kitano R, *et al*. Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease. *Physiol Rev*. **2020**, 100, 171-210.
 - 75) Psichas A, Sleeth ML, Murphy KG *et al*. The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion *via* free fatty acid receptor 2 in rodents. *Int J Obes*. **2015**, 39, 424-429.
 - 76) Anita W, Ava A, Thomas UG, *et al*. Microbial Modulation of Energy Availability in the Colon Regulates Intestinal Transit. *Cell Host & Microbe*. **2013**, 14, 582-590.
 - 77) Eleanor S and Kevin G. The L-Cell in Nutritional Sensing and the Regulation of Appetite. *Front Nutr*. **2015**, 2, 23.
 - 78) Valdes DS, Daniel S, Paul AG, *et al*. Effect of Dietary Acetic Acid Supplementation on Plasma Glucose, Lipid Profiles, and Body Mass Index in Human Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Acad Nutr Diet*. **2021**, 121, 895-914.
 - 79) Aoki R, Onuki M, Hattori K, *et al*. Commensal microbe-derived acetate suppresses NAFLD/NASH development via hepatic FFAR2 signalling in mice. *Microbiome*. **2021**, 9, 188.
 - 80) Macia L, Tan J, Vieira AT, *et al*. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat Commun*. **2015**, 6, 6734.
 - 81) Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, *et al*. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. **2013**, 504, 446-450.