

氏 名（本籍）	清水 秀憲（大阪府）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 52 号
学位授与年月日	2023 年 10 月 4 日
学位授与の条件	学位規程第 3 条第 2 項該当者
学位論文の題名	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
論文審査委員	主 査 教 授 小西 守周
	副 査 教 授 江本 憲昭
	副 査 教 授 長谷川 潤
	副 査 准教授 灘中 里美

論文内容の要旨

緒言

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。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、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などの重大な病気を発症することが知られている¹⁾。そのため、肥満を未然に防ぐことが出来れば、これら様々な病態の発症予防につながるといえる。

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おり²⁾、現在、日本国内で使用できる主な肥満症の治療薬は、マジンドール（中枢性食欲抑制薬）のみである。しかしながら、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投与期間に制限が設けられているなど課題も多い。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から³⁾、有効性・安全性が認められる特異的な肥満症治療薬の新規開発は喫緊の課題である。

このような中、近年の解析技術の進展により、モデル動物やヒトにおいて、腸内細菌が宿主エネルギー代謝に影響を与えていることが明らかになりつつある。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、さらに腸内細菌が肥満症に直接的に影響することを世界で初めて科学的に実証した⁴⁾。実際、ヒトにおいても、肥満患者が食事療法により肥満を解消することで健常者の腸内細菌叢に近づくことが報告されており、腸内細菌が宿主のエネルギー代謝状態を反映する新しい指標となりうる概念が提唱された⁴⁾。腸内細菌で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、腸管における脂質吸収の抑制^{5,6)}、Lipoprotein lipase (LPL) 阻害による脂肪細胞への脂肪蓄積抑制⁷⁾、交感神経活性化による脂肪分解促進⁸⁾ など、肥満改善につながる効果が報告されており、これら作用の基盤となるメカニズムの 1 つとして、腸内細菌由来の代謝産物の寄与が考えられている。

腸内細菌およびその代謝産物による宿主代謝機能制御への寄与とそのメカニズムを明らかにすることが出来れば、肥満症の創薬研究への応用につながる可能性が期待できる。そこで本研究では、腸内細菌およびその代謝産物に着目した肥満の予防・改善を目的とし、以下、3つのテーマについて研究を実施した。

- (1) 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
- (2) 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
- (3) PYY 分泌における短鎖脂肪酸受容体 Olfr78 の機能解析

第 1 章 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

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、メンブレンフィルターを用いて *in vitro* での検討を行った。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 (*Rumino. 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。続いて、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取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取により、体重増加の抑制傾向（図 1A）、腸内細菌叢の分布において大きな違いが認められた（図 1B）。そこで、リアルタイム PCR 法により腸内細菌の変化について詳細に解析した結果、乳酸菌およびビフィズス菌を摂取した場合に *Akkermansia* 属が増加しており（図 1C）、さらに糞便中の短鎖脂肪酸（特にプロピオン酸）濃度の増加傾向が認められた（図 1D）。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⁹⁾、乳酸菌やビフィズス菌の摂取によりマウスの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。

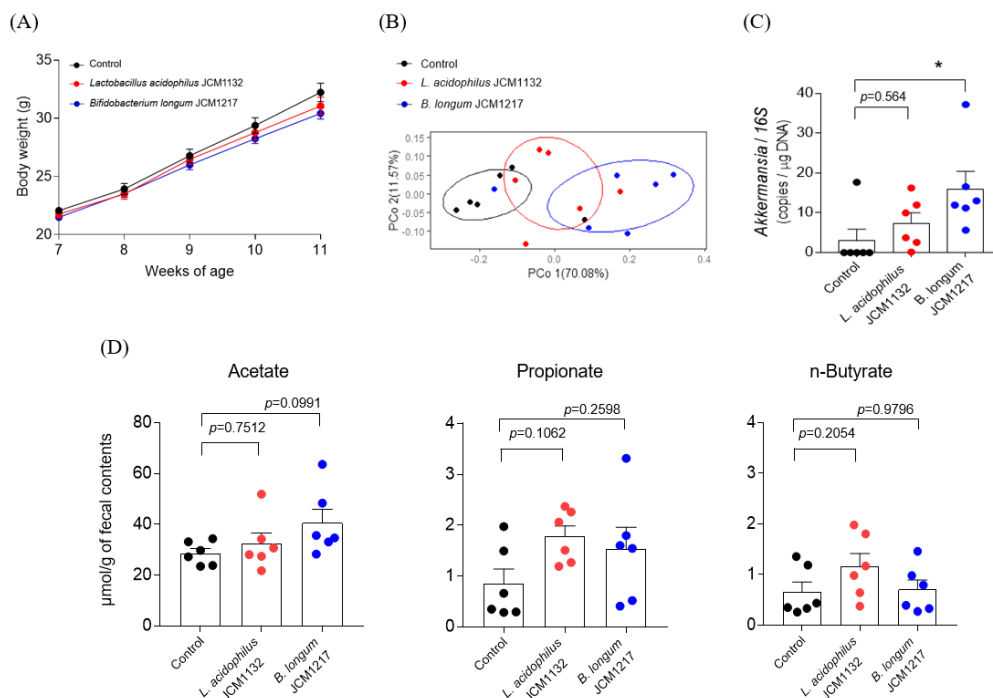


図 1. プロバイオティクスの摂取によるマウスの体重変化および腸内細菌叢への影響

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

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 章より、プロバイオティクスである乳酸菌やビフィズス菌が、ヒト腸内の短鎖脂肪酸産生菌を増加させることで代謝性疾患の改善に寄与している可能性を見出した。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、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。

そこで第 2 章では、食品由来の短鎖脂肪酸が、肥満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。はじめに、野生型マウスに各種短鎖脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸）を混餌した高脂肪食を 4 週間摂取させ、盲腸内および血漿中における短鎖脂肪酸濃度を解析した。その結果、盲腸内では対照群（高脂肪食のみ・高脂肪食にセルロース混餌）と類似傾向を示したのに対し（図 2A）、血漿中では各々摂取した短鎖脂肪酸の有意な増加が認められた（図 2B）。腸内細菌叢への影響について確認したところ、短鎖脂肪酸の摂取による腸内細菌叢の変化は認められなかったことから、摂取した短鎖脂肪酸は、主に消化管上部で吸収され、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。

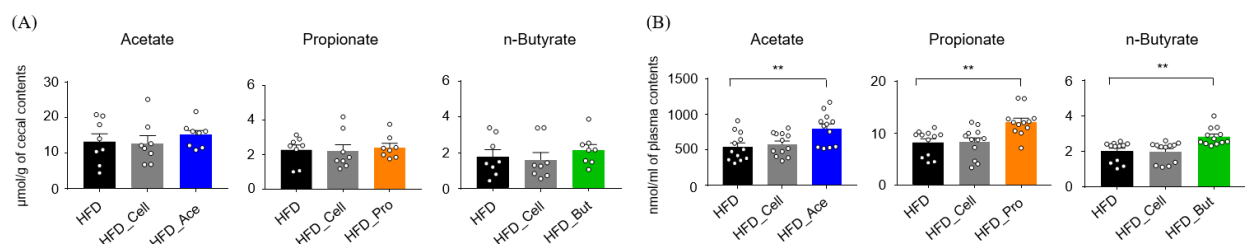


図 2. 短鎖脂肪酸の摂取による盲腸内 (A) および血漿中 (B) の短鎖脂肪酸濃度

HFD; High Fat Diet, Cell; Cellulose, Ace; Acetate, Pro; Propionate, But; n-Butyrate.

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

次に、野生型マウス、短鎖脂肪酸を認識する受容体である GPR41、GPR43 を各々全身欠損させたマウスを用いて、各種短鎖脂肪酸を混餌した高脂肪食を 4 週間摂取させた。その結果、野生型および GPR43 全身欠損マウスでは、短鎖脂肪酸の摂取により体重増加が有意に抑制されたのに対し、GPR41 全身欠損マウスでは差が認められなかった。興味深いことに、各々のマウスに共通して、短鎖脂肪酸の摂取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）の有意な減少が認められたのに対し、肝重量は GPR41 全身欠損マウスのみ差が認められなかった（図 3A, B）。短鎖脂肪酸の摂取により肥満由来の代謝性疾患である脂肪肝が改善した可能性に期待し、各種短鎖脂肪酸の摂取による肝臓の変化について検討した。その結果、野生型および GPR43 全身欠損マウスでは、肝臓中の脂肪蓄積抑制、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、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、これら短鎖脂肪酸による影響が消失した（図 3C）。GPR41 は、交感神経

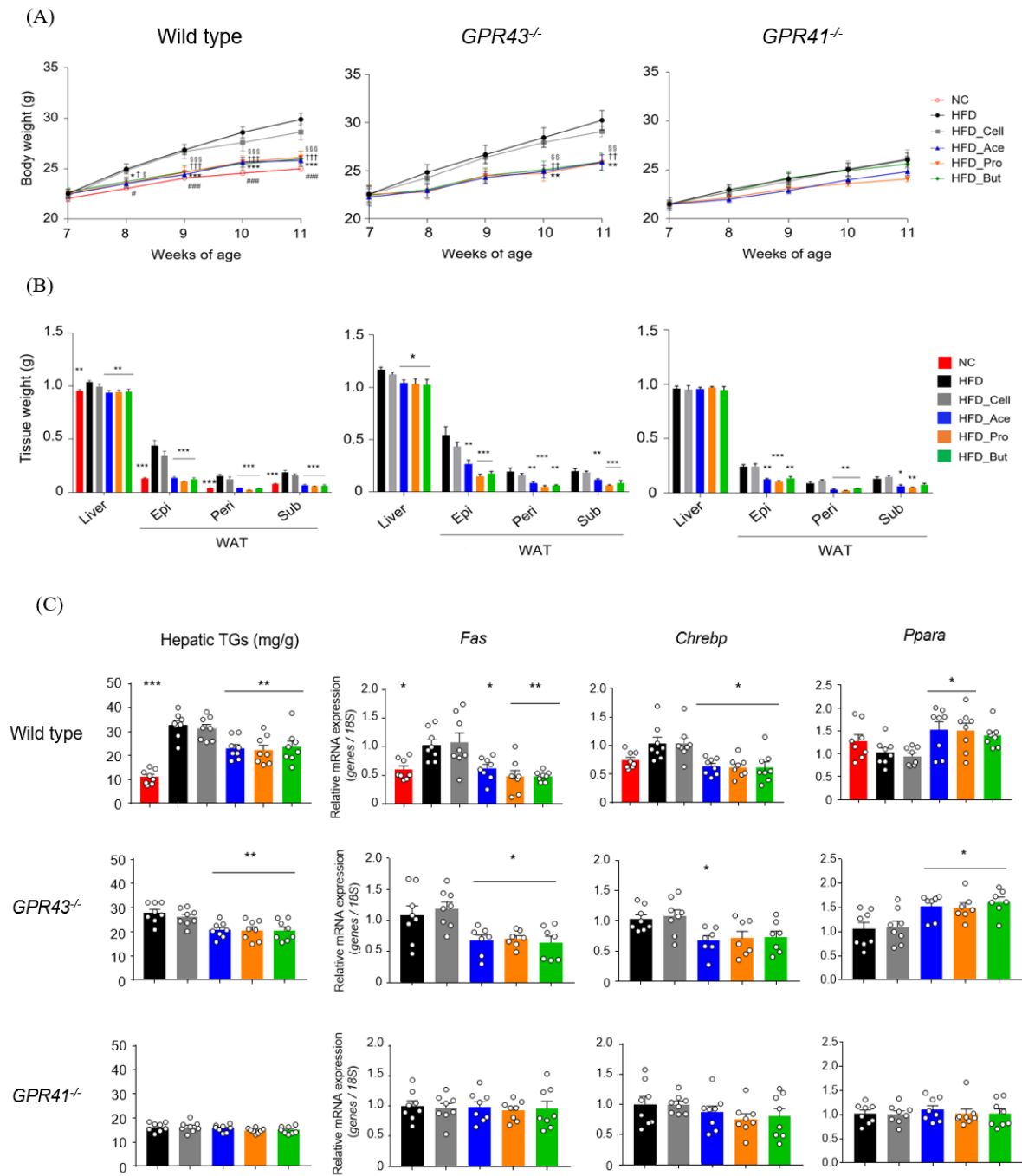


図 3. 短鎖脂肪酸の摂取による代謝機能改善作用

NC; Normal Chow, HFD; High Fat Diet, Cell; Cellulose, Ace; Acetate, Pro; Propionate, But; n-Butyrate, Epi, Epididymal, Peri; Perirenal, Sub; Subcutaneous, WAT; White Adipose Tissues.

All data are presented as the means \pm SEM ($n = 8-12$). (A) ### $P < 0.001$, # $P < 0.05$ (HFD vs. NC),

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ (HFD vs. Ace), ††† $P < 0.001$, †† $P < 0.01$, † $P < 0.05$ (HFD vs. Pro),

§§§ $P < 0.001$, §§ $P < 0.01$, § $P < 0.05$ (HFD vs. But). (B) *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

TGs; Triglycerides. All data are presented as the means \pm SEM ($n = 7-8$). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$,

* $P < 0.05$.

節、脾臓、腎臓、腸管に発現している^{10,11)}。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の代謝機能が改善し、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、肝臓の代謝機能改善に GPR41 が直接関与しているのか確認するため、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、GPR41 リガンド活性が高いプロピオン酸の腹腔内投与し 24 時間後、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。その結果、野生型マウスでは *Fas*、*Chrebp* の有意な減少、*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 (図 4)。以上の結果より、食品由来の短鎖脂肪酸は、主に消化管上部で吸収され、血流を介して肝臓中の脂肪蓄積抑制に寄与すること、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。

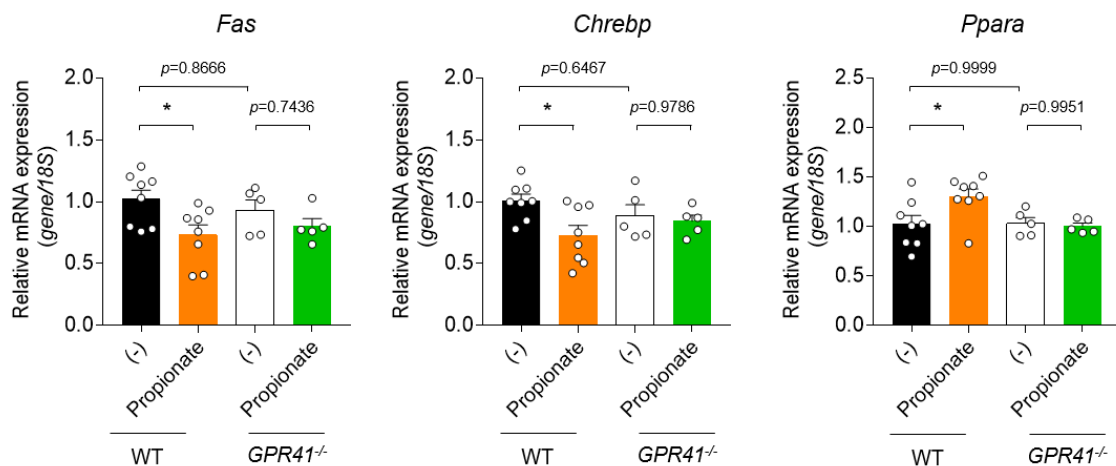


図 4. 短鎖脂肪酸の腹腔内投与による肝臓中の脂質代謝関連遺伝子の発現解析

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

第 3 章 PYY 分泌における短鎖脂肪酸受容体 Olfr78 の機能解析

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 細胞に存在しており、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 PYY を分泌する。PYY は、肥満症の新たな治療標的の 1 つになる可能性が期待されているが、PYY に着目した治療薬は、未だ開発されていない。この PYY 分泌について、近年、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¹²⁾。しかし、*Olfr78* については未だ不明な部分が多い。*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。

そこで第 3 章では、この *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、7 週齢の C57BL/6J の雄マウスを用いて、各組織における *Olfr78* の遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、大腸において *Olfr78* の顕著な発現が認められたことから (図 5A)、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 *Olfr78* 発現が認められた (図 5B)。

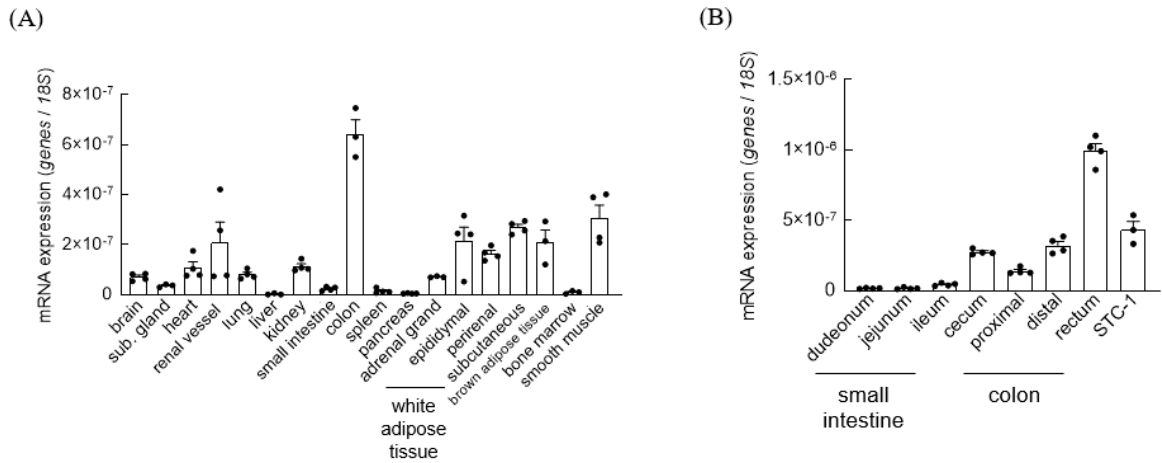


図 5. マウス組織中の *Olfr78* 発現解析

All data are presented as the means \pm SEM (n = 3–4).

次に、*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 (*in vitro*)。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いことを確認した (図 6A)。*Olfr78* の発現が認められた 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、酪酸を添加した場合では、細胞内 cAMP 濃度の増加は認められなかった (図 6B)。また、酢酸と PKA 阻害剤 (H-89) を合わせて添加した場合では、これらの増加が消失した (図 6C)。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、*Olfr78* 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。

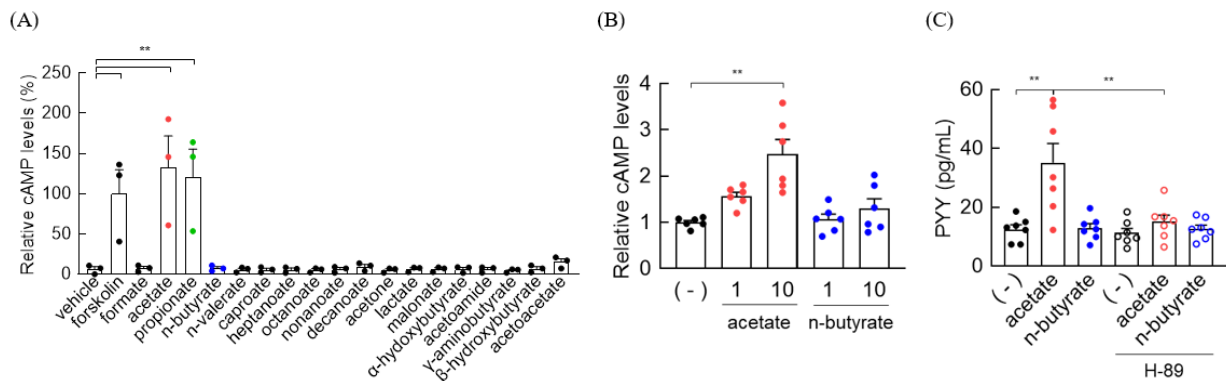


図 6. cAMP および PYY 分泌評価 (*in vitro*)

All data are presented as the means \pm SEM (n = 6–8). ***P* < 0.01.

次に、腸内の短鎖脂肪酸が *Olfr78* を介して PYY 分泌の促進に寄与しているか確認するため、野生型マウス、無菌マウスおよび *Olfr78* 全身欠損マウスを用いて比較検討した (*in vivo*)。腸内細菌は、食物繊維やオリゴ糖などの難消化性多糖類を資化することで短鎖脂肪酸を産生することから、低繊維食に

難消化性オリゴ糖を混餌させ、腸内細菌により短鎖脂肪酸を産生させる試みを行なった。野生型マウスでは、PYY 分泌の有意な増加が認められたのに対し、無菌マウスは PYY 分泌が消失した（図 7A）。一方、*Olf78* 全身欠損マウスを用いた場合では、野生型マウスと比較して、難消化性オリゴ糖による PYY 分泌量の増加は減弱した（図 7B）。以上の結果より、オリゴ糖などの難消化性多糖類を腸内細菌が資化することで腸内の短鎖脂肪酸が増加し、これにより *Olf78* が刺激されることで PYY 分泌が促進していることを明らかにした。

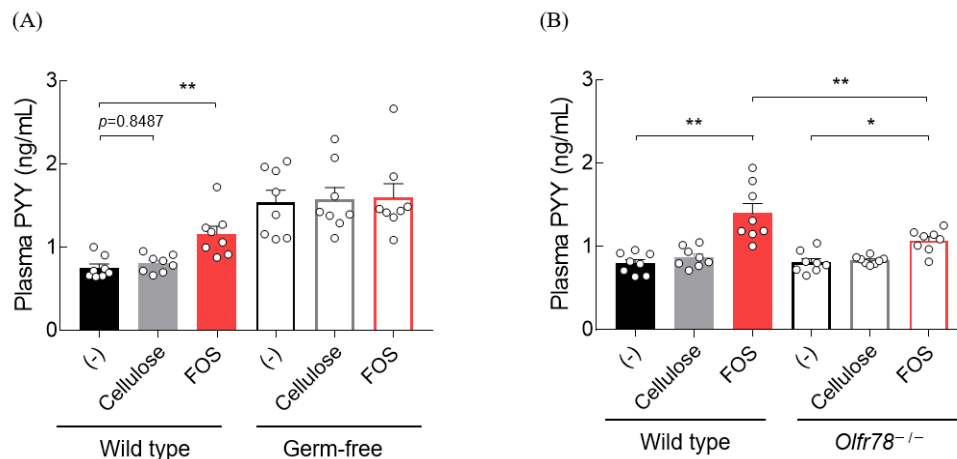


図 7. 各種マウスの PYY 血中濃度 (*in vivo*)

FOS; Fructo-oligosaccharides. All data are presented as the means \pm SEM (n = 8). * P < 0.05, ** P < 0.01.

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新規開発は喫緊の課題である。本研究では、腸内細菌やその代謝産物の変化に着目し、肥満や肥満由来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。本研究の結果から、以下の結論を得た。

1. 代表的なプロバイオティクスであるビフィズス菌や乳酸菌は、短鎖脂肪酸（特にプロピオン酸）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。
2. 食品由来の短鎖脂肪酸は、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、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。
3. 短鎖脂肪酸受容体として新たに同定された *Olf78* は、直腸において *Olf78* の発現が最も高いこと、*Olf78* 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。さらに各種細胞およびマウスを用いて検討した結果、短鎖脂肪酸（特に酢酸）が *Olf78*/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。

本研究により、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した。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つことを期待する。

参考文献

- 1) 伊藤裕. 日内会誌. **100**, 191–198 (2011).
- 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. 1–7 (2022).
- 3) Hsu WC. *et al. Diabetes Care*. **38**, 150–158 (2015).
- 4) Turnbaugh PJ. *et al. Nature*. **444**, 1027–1031 (2006).
- 5) Hamad EM. *et al. Br J Nut.* **101**, 716–724 (2009).
- 6) Kadooka Y. *et al. Eur J Clin Nutr.* **64**, 636–643 (2010).
- 7) Aronsson L. *et al. PLoS One*. **5**, e13087 (2010).
- 8) Tanida M. *et al. Neurosci Lett.* **619**, 114–120 (2016).
- 9) Lu Y. *et al. Sci Rep.* **6**, 37589 (2016).
- 10) Samuel BS. *et al. Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 16767–16772 (2008).
- 11) Kimura I. *et al. Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**, 8030–8035 (2011).
- 12) Fleischer J. *et al. Cell Tissue Res.* **361**, 697–710 (2015).

論文審査の結果の要旨

肥満症や、糖尿病、脂肪肝を含む肥満症由来の代謝性疾患に対する治療薬の開発は臨床上重要な課題として認識される。一方、近年では、腸内細菌叢を適切に調節することで、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り、腸内細菌の役割や代謝調節における意義について注目が集まっている。本研究が開始する以前においても、乳酸菌やビフィズス菌などのプロバイオティクスの摂取は、腸内細菌叢を変化させ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。しかし、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。本研究は、プロバイオティクスによる腸内細菌への影響を検討する過程で、その代謝産物である短鎖脂肪酸濃度が変化する知見が得られたことから、さらに短鎖脂肪酸と肥満や脂肪肝などの代謝性疾患の予防・改善との関わりについて検討を行ったものである。

具体的には、まず、腸内細菌培養系および実験動物であるマウスを用いた検討により、代表的なプロバイオティクスであるビフィズス菌や乳酸菌が、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。続いて、高脂肪食により肥満を誘導したマウスに対して、短鎖脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸）を直接摂餌させた際の代謝機能への影響とその分子メカニズムについて検討し、短鎖脂肪酸の有する様々な代謝調節活性のうち、短鎖脂肪酸受容体の GPR41 が肝臓の代謝機能改善に重要な役割を担っている可能性を見出した。最後に、新たに同定された短鎖脂肪酸受容体である Olfr78 に着目した研究を実施し、その結果、短鎖脂肪酸の、特に酢酸、プロ

ピオン酸がリガンドとなり、Olfcr78/Gs/cAMP/PKA 経路を介して、食欲抑制ホルモン PYY の分泌促進に寄与する可能性を見出した。

以上の研究成果に基づき作成された本学位論文では、腸内細菌代謝産物である短鎖脂肪酸が宿主の代謝に及ぼす作用とそのメカニズムの一端を明らかにできたものと考えられる。これらの知見は、肥満や脂肪肝などの代謝性疾患を予防・改善しうる機能性表示食品、特定保健用食品の開発や短鎖脂肪酸受容体をターゲットとした新たな創薬開発に貢献しうるものと期待できる。

したがって、上記の論文は博士（薬学）論文として、適当と判定する。