

食事成分による腸内環境変化の宿主エネルギー代謝への影響

2022.3

東京農工大学大学院  
連合農学研究科  
応用生命科学専攻

渡辺 啓太



## 目次

略記.....	2
第1章 緒言 .....	4
第2章 分離大豆タンパク質(SPI)による腸内環境変化とエネルギー代謝制御 .....	8
第1節 はじめに.....	8
第2節 実験材料および方法 .....	8
第3節 結果および考察.....	14
第4節 小括 .....	21
第3章 カードランによる腸内環境変化とエネルギー代謝制御.....	23
第1節 はじめに.....	23
第2節 実験材料および方法 .....	23
第3節 結果および考察.....	29
第4節 小括 .....	36
第4章 総括 .....	37
第5章 参考文献.....	41
第6章 学位論文要旨 .....	47
第7章 業績集.....	48
第8章 謝辞 .....	52

## 略記

TMA: Trimethylamine

TMAO: Trimethylamine N-Oxide

DHA: Docosahexaenoic acid

EPA: Eicosapentaenoic acid

DOHaD: Developmental Origins of Health and Disease

BSH: Bilesalhydrolyase

DCA: Deoxycholic acid

LCA: Lithocholic acid

HFD: High-fat diet

FXR: Farnesoid X receptor

GPCR: G protein-coupled receptor

TGR5: Takeda Gprotein-coupled receptor5

GLP-1: glucagon-like peptide-1

PYY: peptide YY

SPI: soy protein isolate

PFA: paraformaldehyde

PBS: phosphate buffered saline

EtOH: ethanol

NEFA: non-esterified fatty acid

TG: triglyceride

MeOH: methanol

DPP-4: dipeptidylpeptidase-4

MRM: multiple reaction monitoring

CA: cholic acid

TCA: taurocholic acid

$\alpha$ -MCA:  $\alpha$ -muricholic acid

$\beta$ -MCA:  $\beta$ -muricholic acid

T $\alpha$ MCA: tauro- $\alpha$ -muricholic acid

T $\beta$ MCA: tauro- $\beta$ -muricholic acid

CDCA: chenodeoxycholic acid

TCDCa: taurochenodeoxycholic acid

TLCA: tauroolithocholic acid

HCA: hyocholic acid

UDCA: ursodeoxycholic acid

HDCA: hyodeoxycholic acid

TDCA: taurodeoxycholic acid

TUDCA: tauroursodeoxycholic acid  
THDCA: taurohyodeoxycholic acid  
OTU: Operational Taxonomic Unit  
PCoA: principal component analysis  
LDA: linear discriminant analysis  
LEfSe: linear discriminant analysis effect size  
PCR: polymerase chain reaction  
PERMANOVA: permutational analysis of variance  
epi: epididymal adipose tissue  
peri: perirenal adipose tissue  
sub: subcutaneous adipose tissue  
BAs: bile acids  
FDR: false discovery rate  
HBG: high  $\beta$ -glucan  
LBG: low  $\beta$ -glucan  
MPI: mung bean protein isolate  
CGA: chlorogenic acid  
CA: caffeic acid  
HMCA: 4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid  
HMPA: 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) propionic acid  
HYA: 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid  
LPL: Lipoprotein lipase

## 第1章 緒言

食事は日々の生命活動維持に必要な栄養素やエネルギー源の摂取のために重要である。一方で、近年の食の欧米化に伴う過剰な食物摂取によるエネルギー恒常性の破綻は肥満症の発症に寄与し、さらに糖尿病、高血圧症や脂質異常症などの生活習慣病をはじめとする様々な疾患を誘発することから、世界で最も深刻な健康問題の一つとなっている。実際に、1970年代以降、世界中で肥満症の罹患率が高まっており、2016年には、成人の約40%(約20億人)と5歳から19歳の子供の18%(約3億4000万人)が肥満症あるいはその予備軍に該当すると推定されている<sup>1)</sup>。また、肥満人口の増加に伴い、高血圧治療に用いる降圧薬や糖尿病治療に用いる血糖降下薬などの需要が増大しており、2014年には世界全体で2兆アメリカドル以上の経済的影響が推定されているように、各国政府の財政を圧迫しており、肥満問題は個人の生命に関わる健康問題にとどまらず、社会的にも大きな問題となっている<sup>1)</sup>。そのような中、これらエネルギー代謝疾患の直接的な原因の一つとして、腸内細菌叢の破綻とそれに伴う腸内細菌代謝物の変化であることが、近年の腸内細菌解析技術の発展により科学的根拠に基づいて明らかとされつつある<sup>2)</sup>。

腸内細菌叢変化がエネルギー代謝疾患に関与している事を最初に示唆した研究は、2006年のゴードンらによるオミクス解析を応用した腸内細菌叢と肥満との関係を検討した研究である。ゴードンらは健常マウスと肥満マウスの腸内細菌叢を16S rRNA系統解析により比較し、肥満マウスでは健常マウスと比べ *Bacteroidetes* 門に属する菌が少なく、*Firmicutes* 門に属する菌の割合が高いことを明らかとした。さらに、肥満マウスの腸内細菌叢を、腸内細菌を持たない無菌マウスに移植することで、移植されたマウスが肥満症状を呈することを示している。このような肥満マウスと健常マウス間でみられた腸内細菌叢組成の相違はヒトにおいても同様に確認されている。ヒトにおける研究としては他にも、欧州と中国で実施されたコホート研究がある。両国には人種的、食生活的差異があるにも関わらず、2型糖尿病患者の腸内細菌叢に、酪酸産生 *Clostridium* 属の割合が低く非酪酸産生 *Clostridium* 属の割合が高いという共通点が確認され、腸内細菌叢が肥満を含むエネルギー代謝疾患に大きな影響を及ぼす要因となる可能性が示唆された<sup>3,4)</sup>。

エネルギー代謝疾患をはじめとする様々な病態と密接に関与することが示唆され始めている腸内細菌叢は、食事やストレスなどの環境因子によって劇的にその構成が影響を受けることが明らかとなっている。特に食事は腸内細菌叢の変化を短時間で劇的に誘導することが明らかとされている。例えば、ヒトにおける食事介入試験において、卵、チーズやベーコンなどの肉類を含む動物性食品を5日間摂取した被験者の腸内細菌叢には胆汁酸耐性を示す菌種(*Alistipes* 属、*Bilophila* 属や *Bacteroides* 属など)の増加が確認された一方で、野菜類、米やレンズ豆といった植物性食品を摂取した被験者の腸内細菌叢には食物繊維を分解する菌種(*Roseburia* 属、*Eubacterium rectale* や *Ruminococcus bromii* など)の増加が確認された<sup>5)</sup>。また、地中海食のような野菜・穀類を中心とした食事を日常的に摂取しているヒトの腸内細菌叢には、難消化性多糖を分解する *Prevotella* 属や *Lachnospira* 属が豊富に存在し、腸内細菌代謝物である短鎖脂肪酸の生体内濃度が高水準で存在しているのに対し、コリンやカルニチンなどを豊富に含む動物性食品を中心とした食事を日常的に摂取するヒトの腸内細菌叢には、*Ruminococcus* 属や *Streptococcus* 属などが増加していることが観察された。さらには地中海食の日常的

な摂取量が少ないほど、腸内細菌代謝物である TMA (Trimethylamine)を原料として宿主の肝臓で産生される心血管疾患発症原因物質、TMAO (Trimethylamine N-Oxide)が尿中で高濃度に検出された<sup>6,7)</sup>。別の報告では、食事療法によって体重が減少した肥満者の腸内細菌叢が、肥満者特有の腸内細菌叢構成から健常者の腸内細菌叢に似た構成に変化することが明らかとなり<sup>8)</sup>、摂取する食事の種類が腸内細菌叢構成に変化をもたらし、様々な疾患リスクに影響を及ぼしている可能性が示唆されている。

このように腸内細菌叢構成を変化させることで、宿主の生体恒常性維持に寄与する食事由来の成分が様々な研究報告から明らかとなりつつある。例えば、食事に含まれる脂肪酸は宿主のエネルギー源として吸収されるだけでなく、腸内細菌叢構成を変化させることで、肥満やインスリン抵抗性の惹起に寄与することが報告されている。DHA (Docosahexaenoic acid)や EPA (Eicosapentaenoic acid)などの多価不飽和脂肪酸を豊富に含む魚油を摂取させたマウスの腸内細菌叢には、*Akkermansia* 属、*Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属などの増加が確認され、飽和脂肪酸の豊富なラードを摂取させたマウスの腸内細菌叢には *Bilophila* 属や *Bacteroides* 属の増加が確認された。さらに、腸内細菌叢の変化と共に、ラードを摂取させたマウスでは血中エンドトキシン濃度の上昇、脂肪組織炎症やインスリン抵抗性が観察され、食用油と腸内細菌叢間の相互作用が脂肪組織炎症に密接に関与することが示された<sup>9)</sup>。また、食事脂質中の主な構成脂肪酸の一つであり我々の生命維持に重要な必須脂肪酸であるリノール酸も、乳酸菌などの腸内細菌代謝を受けて水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸などに合成されることで、腸管上皮バリア機能の一つであるタイトジャンクションの制御、腸管免疫制御やアトピー性皮膚炎改善、脂質代謝制御や白色脂肪組織のベージュ化による抗肥満作用や抗酸化作用に寄与することが明らかとなっている<sup>10-16)</sup>。また、植物色素であるフラボノイドをはじめとしたポリフェノール類も腸内細菌による代謝を受け、宿主の生体恒常性維持に寄与することが明らかとされている。例えば、大豆イソフラボンの一つであるダイゼインは *Bifidobacterium breve* や *Lactobacillus paracasei* などの腸内細菌によってエクオールに合成代謝されることで、骨粗鬆症や心血管疾患の予防に寄与することが示されている<sup>17)</sup>。アミノ酸類もまた、腸内細菌による代謝を受け、宿主の健康に寄与することが示唆されている。食事から摂取する必要のある必須アミノ酸の一つであるヒスチジンは、腸内細菌による代謝を受け、イミダゾールプロピオン酸に変換されることが明らかとなっている。イミダゾールプロピオン酸は健康な人の便中や血液中には殆ど存在しないのに対し、2型糖尿病患者においては高濃度で存在し、インスリン抵抗性の悪化に寄与することが示された。さらにその変換菌は2型糖尿病患者の腸内細菌叢に特異的に存在しており、腸内細菌代謝がヒトの疾患に寄与することが示されている<sup>18)</sup>。また近年では、ヒトの成人後の健康や疾患発症は成長過程における様々な環境因子への曝露のみならず、胎児期や出生直後の生理的環境も影響を及ぼすという、DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease)仮説の提唱以降、腸内細菌叢も子供の将来的なエネルギー代謝疾患、免疫疾患や神経発達障害などの様々な病態に影響を及ぼす環境因子であることが明らかとなりつつある。例えば、母乳成分の一つであるヒト母乳オリゴ糖は、*Streptococcus pneumoniae* や *Campylobacter jejuni* などの病原性細菌が上皮細胞に付着するのを阻害し、さらには毒素原性大腸菌が放出した毒素に結合することで、下痢や炎症からの保護作用を有することが明らかとされた<sup>19)</sup>。また、育児の際に栄養素を母乳に模倣した人工乳で育てられた乳児は、母乳で育てられた乳児と異なる腸内細菌叢

を構成し、さらに、人工乳のみで育てられた乳児は胃腸炎、急性中耳炎やアレルギーなどの免疫疾患発症リスクが増加することが確認されており、栄養源の違いによる腸内細菌叢構成の変化が寄与している可能性が示唆されている<sup>20)</sup>。実際に、母乳は人工乳と比較して、腸粘液産生、タイトジャンクション形成や免疫細胞制御などの免疫機能への寄与が示されている *Lactobacillus* 属、*Bacteroides* 属や *Clostridia* 綱などの定着に貢献し、乳児の腸粘膜バリアの恒常性維持に関与していることが報告されている<sup>21)</sup>。近年では、母乳自体が細菌叢を有しており、母乳成分のバランスや母乳を直接与えるか搾乳し哺乳瓶で与えるかなど様々な要因で細菌叢の構成が変化し、乳児の腸内細菌叢の構成に影響を及ぼすことで、乳児の健康や発達に寄与する可能性が示唆されている<sup>22)</sup>。このように、我々が日常的に摂取する食事は直接的に腸内細菌叢の構成に影響を及ぼし、宿主の生体恒常性維持に大きく寄与していることが示唆されている。この中で特に、主要な腸内細菌代謝物である胆汁酸や短鎖脂肪酸が、宿主に存在する受容体を活性化するシグナル分子として作用し、宿主のエネルギー恒常性維持に最も重要な役割を担っていることが明らかとなりつつある。

胆汁酸は、肝臓においてコレステロールより合成されるステロイド化合物であり、タウリンまたはグリシンがアミド結合した抱合型胆汁酸として胆嚢に貯蔵される一次胆汁酸と、一次胆汁酸が腸内細菌による代謝を受けて合成される二次胆汁酸の二種類に大別される。一次胆汁酸は、食事摂取により胆嚢が収縮すると、胆管を通じて十二指腸に分泌される。分泌された胆汁酸の約 95%は回腸下部より再吸収され、門脈を通じて肝臓へと戻る。一方、再吸収されなかった一次胆汁酸の一部は、小腸下部において腸内細菌の BSH (bile salt hydrolase)によって抱合型胆汁酸の脱抱合が起き、さらに腸内細菌による脱水酸化、二水酸化やエピマー化をはじめとした代謝を受け、デオキシコール酸 (deoxycholic acid; DCA)やリトコール酸 (lithocholic acid; LCA)などの二次胆汁酸に合成される<sup>23)</sup>。また、胆汁酸が有する界面活性作用は殺菌効果をもたらすため、胆汁酸は腸内細菌叢の形成に直接的に関与する重要な制御因子でもあり、胆汁酸組成と腸内細菌叢は相互作用を有していると言える<sup>24, 25)</sup>。実際に腸内細菌叢変化と胆汁酸組成は密接に生体恒常性に寄与しており、例えば非アルコール性脂肪肝臓炎の罹患者は、胆汁酸合成量、糞便中の一次胆汁酸量および一次胆汁酸/二次胆汁酸比の増加を伴う腸内細菌叢破綻が観察されている<sup>26,27)</sup>。また、抗生物質投与による腸内細菌叢の破綻が血清グルコース濃度および血清トリグリセリド濃度減少を引き起こし、この糖代謝・脂質代謝異常に腸内細菌叢破綻に伴う二次胆汁酸量低下の寄与が明らかとされている<sup>28)</sup>。こうした胆汁酸量の変化を伴う腸内細菌叢変化は食事によって誘発されることが明らかとされており、例えば高脂肪食(HFD; High-fat diet)の摂取が、腸内胆汁酸量を急速に増加させ、腸内細菌叢組成を変化させることが示されている<sup>29)</sup>。胆汁酸は脂質をミセル化することで消化・吸収を助ける重要な分子である一方で、核内受容体の FXR (farnesoid X receptor)や G タンパク質共役型受容体(G protein-coupled receptor; GPCR)の一つである TGR5 (Takeda Gprotein-coupled receptor 5)などを活性化させるリガンドとしても機能しており、胆汁酸による糖代謝、脂質代謝のようなエネルギー代謝制御にこれら受容体に関与していることが明らかとされている<sup>30)</sup>。例えば、腸管内分泌 L 細胞に発現する TGR5 や FXR が、腸内細菌代謝物である DCA や LCA などによって活性化され、インスリン分泌を促進するインクレチンである腸管ホルモン GLP-1 (Glucagon-like peptide-1)の分泌を亢進することが報告されている<sup>31-37)</sup>。GLP-1 は、小腸下部、大腸や盲腸に散



在する腸管上皮内分泌 L 細胞が合成するプログルカゴンが、翻訳後プロセッシングを受けることで産生される 30 アミノ酸のペプチドホルモンである。GLP-1 は膵臓に作用することで、インスリン分泌の促進やグルカゴン分泌の抑制を介した、食後の血糖値上昇の抑制に寄与することや、肝臓に作用することで、肝臓への脂肪蓄積の抑制や脂肪合成の抑制に関与することが明らかとされている<sup>38)</sup>。胆汁酸受容体のうち、TGR5 は大腸において、GLP-1 の発現と分泌を誘導する<sup>36)</sup>。一方、FXR の活性化は、L 細胞における解糖と炭水化物応答領域結合タンパク質の活性を阻害することにより、回腸における GLP-1 の発現と分泌を抑制することで、エネルギー代謝を制御していることが示されている<sup>37,39)</sup>。

短鎖脂肪酸は、一つのカルボキシル基に数個から数十個のアルキル基炭素が鎖状に繋がった構造をしている脂肪酸のうち、炭素数が 1~6 個の脂肪酸の総称である。バターやチーズなどの乳製品、味噌、醤油、食酢や一部の酒類といった発酵食品に高く含有しており、食事により摂取することができるが、生体内における主な短鎖脂肪酸の供給源は、腸管内における食物繊維に代表される難消化性多糖の腸内細菌叢による発酵である。難消化性多糖は、ヒトの消化酵素では消化されないため、小腸で吸収されないまま大腸へと到達し、そこで腸内細菌による代謝を受ける。その主要な代謝物が、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸であり、酢酸では *Acetobacter* 属、*Bifidobacterium* 属や *Gluconobacter* 属、プロピオン酸では *Dialister* 属や *Ruminococcus* 属、酪酸では *Butyrivibrio* 属、*Clostridium* 属や *Eubacterium* 属などに分類される一部の腸内細菌が短鎖脂肪酸を産生する菌株として同定されている<sup>40-42)</sup>。これら短鎖脂肪酸は腸管より吸収されて宿主のエネルギー源となるだけでなく、GPCR である GPR41、GPR43 や Olfr78 などを通じて宿主のエネルギー代謝調節機能を発揮することが明らかとされている<sup>41,43,44)</sup>。GPR41 は腸管、膵島、交感神経系などに発現しており、腸管内分泌 L 細胞においては腸管ホルモンの一つである食欲抑制ホルモン PYY (peptideYY)の分泌制御に、膵 β 細胞においてはインスリン分泌調節に、交感神経系においては心拍数や熱産生調節によるエネルギー代謝制御に寄与することが報告されている<sup>45-47)</sup>。GPR43 は腸管、脂肪組織などに発現している。腸管内分泌 L 細胞においては GLP-1 分泌促進に、脂肪組織においてはエネルギー恒常性維持に寄与することが報告されている<sup>48,49)</sup>。Olfr78 は血管や腸管に発現しており、血管においてはレニン分泌を調節することで血圧調節、腸管内分泌 L 細胞においては PYY の分泌制御に寄与することが明らかとされている<sup>50,51)</sup>。このように、腸内細菌代謝によって産生された胆汁酸や短鎖脂肪酸が、宿主のエネルギー代謝制御に大きな影響を及ぼすことが明らかとされつつある。

本研究では、食事成分による腸内環境(腸内細菌叢組成・腸内細菌代謝物)への影響に着目し、これらを介した代謝機能改善作用機序を明らかにすることを目的とした。食事成分によるエネルギー代謝制御機構の解明は、世界的に深刻な問題となっている生活習慣病の新たな予防・治療法の確立に繋がり、人々の毎日の健康に貢献できると期待される。

## 第2章 分離大豆タンパク質(SPI)による腸内環境変化とエネルギー代謝制御

### 第1節 はじめに

大豆タンパク質は、動物性タンパク質に含まれる必須アミノ酸のほとんどを含み、動物性タンパク質とほぼ同等の栄養価を持つ完全タンパク質であることが知られている。分離大豆タンパク質(soy protein isolate; SPI)は、大豆タンパク質の精製物のうちタンパク質含有量が 90%以上のものであり、フィルム形成特性を有することから乳化剤、ゲル化剤や保湿剤などとして加工肉製品、乳児用調整乳やパスタなどへの添加物として利用されている<sup>52)</sup>。その主要成分はグリシニンと  $\beta$ -コングリシニンであり、全大豆タンパク質の約 40%を占めるグリシニンには代謝機能改善作用に対する一貫した結果が得られていないのに対し、全大豆タンパク質の約 20%を占める  $\beta$ -コングリシニンは、中性脂肪増加抑制、脂肪肝抑制効果やインスリン抵抗性の改善など多くの代謝機能改善作用が報告されている<sup>53-58)</sup>。SPI の摂取においても、体重および体脂肪の減少効果や脂肪肝抑制効果を有することが明らかとされている<sup>54,59)</sup>。このような  $\beta$ -コングリシニンや SPI などの大豆タンパク質摂取による代謝機能改善効果は、胆汁酸組成変化との関連が示唆されており<sup>26,27,29)</sup>、この胆汁酸組成変化に腸内細菌叢の関与が推察されているが<sup>23,60)</sup>、これらの要因の動的な相互作用はいまだ明らかとされていない。そこで、本研究では、SPI の摂取が、腸内細菌叢と胆汁酸組成の変化を調節し、HFD による体重増加や肥満に対する予防効果を発揮すると仮定し、SPI の摂取、腸内細菌叢、および胆汁酸シグナルの相関関係を明らかにすることを目的とした。

### 第2節 実験材料および方法

#### 2-1. 動物および負荷試験

実験動物(Conventional)は、日本エスエルシー株式会社から購入した C57BL/6J 系統の雄マウスを使用した。7週齢のマウスを購入し、CLEA Rodent Diet CE-2(日本クレア)を与えて1週間馴化させた後、8週齢から試験食の負荷試験を開始した。コントロール食として高脂肪食(HFD; 60kcal%脂肪含有量;リサーチダイエツト)、試験食として HFD に含まれるカゼインを SPI に置換した HFD-SPI 食の2種の飼料を負荷試験に用いた(Table.1)。負荷期間は4週間で、週1回体重測定を行い、体重変化を比較した。実験動物は、室温 20~23°C、湿度 40~60% の環境の下、12時間の明暗サイクルで飼育した。

無菌実験は、日本クレア株式会社に委託した。無菌環境を構築した小型ビニールアイソレーター内で飼育した無菌マウス(Jcl:MCH(ICR)[Gf]♂、8週齢)に、50kGy のガンマ線照射により滅菌処理した HFD、HFD-SPI を4週間自由摂食させ、体重推移を観察した。

Table. 1

Ingredient	HFD	HFD-SPI
	g	g
Casein	200	0
Soy Protein Isolate	0	203.3
L-Cystine	3	0
DL-Methionine	0	3
Maltodextrin 10	125	125
Sucrose	68.8	68.8
Cellulose, BW200	50	50
Soybean oil	25	25
Lard	245	245
Mineral mix S10026	10	10
DiCalcium phosphate	13	13
Calcium carbonate	5.5	5.5
Potassium citrate, H <sub>2</sub> O	16.5	16.5
Vitamin mix V10001	10	10
Choline bitartrate	2	2
Total weight, g	773.8	777.1
Energy, kcal/g	5.1	5.1
% Energy		
Protein	18	18
Carbohydrate	21	21
Fat	61	61
% Weight		
Protein	23	23
Carbohydrate	26	26
Fat	35	35

## 2-2. 剖検および組織採集

4週間の負荷試験終了後に剖検と分析に必要な組織の採集を行った。解剖は約5時間の絶食後に行った。絶食中はマウスを空ケージに移し、糞便を採集した。採集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、尾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、マウスの腹腔内にソムノペンチルを注射することにより麻酔を行い、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。下大静脈より採血を行い、得られた血液サンプルは、4°C、7,000×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。また、採取した組織サンプルは重量を測定し、アルミホイルに包んで-80°Cで凍結保存した<sup>49)</sup>。

### 2-3. ヘマトキシリン・エオシン染色(HE 染色)

肝臓の一部を切り取り、OCT コンパウンド(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%PFA (paraformaldehyde)を 1mL ずつ滴下して 10 分間静置し、組織を固定した。PBS (phosphate buffered saline) (10 分間、3 回)で洗浄後、ヘマトキシリンで 20 分間染色した。70% EtOH (ethanol)および水で洗浄した後、エオシンで 5 分間染色した。再度、70% EtOH および水で洗浄した後、70% EtOH (10 分間)および 100% EtOH (10 分間、2 回)により脱水し、さらにキシレン(10 分間、2 回)により透徹を行った。風乾させた後、MOUNT-QUICK (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、光学顕微鏡で肝組織像を観察した<sup>49)</sup>。

### 2-4. 血漿中の脂質の定量

血漿中の総コレステロール濃度は、ラボアッセイ™コレステロール(コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法、富士フイルム和光純薬)のキットを用いて測定した。血漿中の遊離脂肪酸(non-esterified fatty acid; NEFA)濃度は、ラボアッセイ™NEFA (ACS・ACOD 法、富士フイルム和光純薬)のキットを用いて測定した。血漿中のトリグリセリド(triglyceride; TG)濃度は、ラボアッセイ™トリグリセリド(GPO・DAOS 法、富士フイルム和光純薬)のキットを用いて測定した<sup>49)</sup>。

### 2-5. 肝臓中 TG 定量

肝臓を約 75mg 切り取り、TG 抽出バッファー[0.45M 酢酸:メタノール(methanol; MeOH):クロロホルム=1:2.5:1.25] 4mL 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 1mL 加えてよく攪拌し、4°C、1,500×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、250μl 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™トリグリセリドの測定キットを用いて測定し、肝臓 1g に含まれる TG 量を求めた<sup>49)</sup>。

### 2-6. 血漿中 GLP-1 濃度測定

活性型 GLP-1 の分解を防ぐために、採取した血液 99μl に DPP-4 (dipeptidylpeptidase-4)インヒビター(Merck Millipore)を 1μl 加えてよく混合し、4°C、7,000×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 濃度をレビス®GLP-1(Active)(富士フイルムワコーシバヤギ)のキットを用いて測定した<sup>61)</sup>。

### 2-7. 血漿中インスリン濃度測定

血漿中のインスリン濃度は、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)のキットを用いて測定した<sup>49)</sup>。

## 2-8. 血漿中 PYY 濃度測定

血漿中の PYY 濃度は、マウス/ラット PYYELISA キット(富士フイルム和光純薬)を用いて測定した<sup>61)</sup>。

## 2-9. 糞便中の短鎖脂肪酸定量

採取した糞便を 10 倍量の MilliQ 水に懸濁し、4°C、8,000×g で 5 分間遠心した。回収した上清に 2%量の 5-スルホサリチル酸を加え、4°C で 15 分間インキュベートした後、4°C、15,000×g で 15 分間遠心して除タンパク処理をした。内部標準物質として 2-エチル酪酸を加えた後、5%量の塩酸と 2 倍量のジエチルエーテルを加えて、液液分配抽出を行った。調製サンプル中の各種短鎖脂肪酸濃度を GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu)により測定した。GC には、内径 0.25 mm, 膜厚 0.36 μm の VF-WAX ms 30m キャピラリーカラム(Agilent)を使用し、キャリアガスには 1mL/min の流速でヘリウムを使用した。測定中の GC は、初期温度 50°C で 1 分間維持した後、15°C/分、8°C/分、15°C/分でそれぞれ 145°C、220°C、240°C に昇温し、240°C に達した後 1 分間保持させた。EI イオン源とインジェクターの温度はそれぞれ 200°C と 250°C とした。各化合物は個別のイオン(m/z)および検出時間で分離・同定した(Table. 2)。得られたイオンクロマトグラフのピークを積分し、個々の短鎖脂肪酸と 2-エチル酪酸の検量線を用いて定量した<sup>61)</sup>。

Table. 2

短鎖脂肪酸	ion (m/z)	Retention time (min)
酢酸	60	10.6
プロピオン酸	74	11.7
n-酪酸	60	12.8
n-吉草酸	60	14.3
2-エチル酪酸	88	14.6

## 2-10. 糞便・盲腸・血漿中の胆汁酸定量

採取した糞便あるいは盲腸内容を凍結乾燥機で一晩乾燥させ、サンプルの乾燥重量を測定した。乾燥サンプルを MilliQ 水+0.4M NaOH (1:1, v/v)中に懸濁し、内部標準物質としてデオキシコール酸およびタウロデオキシコール酸の重水素標識体(d<sub>4</sub>-DCA および d<sub>4</sub>-TDCA)を加え、さらにヘキサンを加えて液液分配抽出を行った。下層を回収し、4°C、20,000×g で 10 分間遠心した。上清を回収し、サンプル充填前に、MeOH 1mL、MilliQ 水 3mL を通してコンディショニングした Oasis® PRiME HLB 1cc Extraction Cartridges (Waters)に通して精製した。サンプル充填後、MilliQ 水 500μL で洗浄し、MeOH+アセトニトリル(1:1, v/v) 1mL で溶出した。

血漿サンプルについては、サンプル 100μl に対して、MilliQ 水 100μl+0.4M NaOH 200μl を加え、内部標準物質と d<sub>4</sub>-DCA および d<sub>4</sub>-TDCA を加えて遠心した後、上清を Oasis® HLB μElution Plate 30μm (Waters)により精製し、MeOH+アセトニトリル(1:1, v/v)100μL で溶出した。ACQUITY UPLC®システム(Waters)に Xevo TQD

MS (Waters)を組み合わせた LC/MS/MS を用いて、調製サンプル中の各種胆汁酸濃度を測定した。カラムは Acquity HSS C18 (2.1 3 100mm, 1.7mm) column (Waters)を使用した。移動相は、0.1%酢酸水溶液とアセトニトリル-イソプロパノール(9:1, v/v)を用いた。各化合物の検出は、ネガティブイオンエレクトロスプレーモードの多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring; MRM)で行い、個別のプレカーサーイオン、プロダクトイオンおよび検出時間で分離・同定した (Table. 3)。

Table. 3

胆汁酸	Precursor ion [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Product ion [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Retention time (min)	Collision energy (V)
CA	407.6	407.6	5.23	20
TCA	514.7	514.7	3.62	35
aMCA	407.6	407.6	4.13	20
bMCA	407.6	407.6	4.31	20
TaMCA+TbMCA	514.7	514.7	2.76	35
CDCA	391.6	391.6	6.97	10
TCDCA	498.6	124.2	4.66	60
LCA	375.6	375.6	10.0	15
TLCA	482.7	482.7	6.60	30
HCA	407.6	407.6	4.73	20
DCA	391.6	391.6	7.28	10
UDCA	391.6	391.6	5.22	10
HDCA	391.6	391.6	5.31	10
TDCA	498.6	124.2	4.98	60
TUDCA+THDCA	498.6	124.2	3.42	60
d4-DCA	395.6	395.6	7.28	10
d4-TDCA	502.7	124.0	4.98	60

## 2-11. 16S rRNA 菌叢解析

糞便中の DNA 抽出には、FastDNA™ SPIN Kit for Feces (MP Biomedicals)を使用した。サンプルの DNA 濃度を約 10ng/μl に揃え、16S rRNA 遺伝子の V4 領域を 515F/806R プライマーを用いて増幅した。Nextera® XT Index kitv2 SetA (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、「Preparing Libraries for Sequencing on the MiSeq」(part 15039740, Rev. D)のプロトコルを用いて調製し、アンプリコンのシーケンスを行った。シーケンス後の微生物群集解析は QIIME1 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, version1.9.1)のパイプラインを用いて、リードの結合、クオリティーチェック、細菌叢組成の解析を行った。データベースとしては Silva (version1.2.8)を用いて、データベースに含まれるリファレンス配列ごとに 97%の相同性を持つリードをまとめて Operational Taxonomic Unit (OTU)を作成した。得られた OTU をもとに試料の細菌について門、科レベルの菌叢組成を決定した。決定した細菌叢組成と統計

分析ソフト R を使用して、主成分分析(principal component analysis; PCoA)とヒートマップ解析を行った。PCoA には Vegan パッケージを、ヒートマップ解析には ComplexHeatmap パッケージを用いて相対存在比を計算した。線形判別分析(linear discriminant analysis; LDA)および LEfSe (LDA effect size)は、 $\alpha$  水準 0.05、LDA スコア閾値 2.0、相対存在比 0.1% 以上で設定し、Huttenhower lab Galaxy server (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>)を用いて計算した<sup>62)</sup>。

## 2-12. 定量リアルタイム PCR

FastDNA™ SPIN Kit for Feces (MP Biomedicals)により糞便サンプルから細菌叢 DNA を抽出し、DNA 濃度を 10ng/μl に揃え、さらにこれを 100 倍希釈したものをテンプレート DNA とした。Clostridium cluster XIVa のスタンダードとしては、*Blautia Coccoides* (JCM1395T、RIKEN BRC)を用いた。それぞれ、MonoFas バクテリアゲノム DNA 抽出 KitVII(ジーエルサイエンス)により DNA を抽出した。DNA 濃度を 10ng/μl に揃え、これを 5 倍ずつ段階希釈してスタンダードを調製した<sup>61)</sup>。定量リアルタイム PCR 解析は、TBGreen™ Premix Ex Taq™ II (TaKaRa)および StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて行った。また、*Clostridium cluster XIVa* の検出には、Forward:CGGTACCTGACTAAGAAGC、Reverse:AGTTTTYATTCTTGCGAACG のプライマーを使用した。

## 2-13. 統計処理

結果は全て平均値±標準誤差で表した。平均値の比較を t 検定により行い、p 値が 0.05 未満の場合、統計的に有意とした。腸内細菌叢の類似性を分析するために、統計分析ソフト R の Vegan パッケージを用いて Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA)検定を行った。

### 第3節 結果および考察

#### 3-1. SPIの抗生活習慣病作用

SPIの摂取による抗生活習慣病効果を確かめるために、通常飼育したC57BL/6Jマウス(Conventional)に、HFDまたはHFD-SPIを4週間摂食させ、体重変化や脂肪組織重量を比較した。その結果、HFD-SPI群はHFD群に比べて負荷1週間後時点から体重が有意に軽く、SPIが高脂肪食誘導性の体重増加を有意に抑制することが確認された(Fig. 1A)。また一日当たりの平均摂餌量に差は見られなかったものの、精巣周囲脂肪組織(epididymal adipose tissue; epi)および腎周囲脂肪組織(perirenal adipose tissue; peri)や、皮下脂肪組織(subcutaneous adipose tissue; sub)などの白色脂肪組織の重量がHFD-SPI群において有意に減少しており、SPI摂食による脂肪蓄積抑制効果が示された(Fig. 1B,C)。HFD群とHFD-SPI群で体重や組織重量に差が認められたため、続いて、血中および肝臓中の各種脂質パラメーターについて比較検討を行った。その結果、肝臓中のTG量がHFD-SPI群で有意に減少することが確認された(Fig. 1D)。また、肝臓中のTGの結果と一致して、肝臓切片を観察すると、HFD群の肝細胞では脂肪滴の肥大化が確認できる一方で、HFD-SPI群の肝細胞では脂肪が蓄積している様子は見られなかった(Fig. 1D)。一方、血中のコレステロール、TG、NEFA濃度および血糖値に差は見られなかった(Fig. 1E-H)。さらに、これらのSPIの抗生活習慣病作用機序を探るため、インスリン、PYY、GLP-1といった代謝関連ホルモン分泌の変化を調べた結果、インスリンおよび食欲減退効果を有する腸管ホルモンであるPYYの血漿レベルは2群間で同程度であったが(Fig. 1I,J)、GLP-1の血漿レベルはSPI摂食により有意に増大することが示された(Fig. 1K)。以上より、SPIは肝臓への中性脂肪蓄積を抑え、脂肪肝抑制作用を有することが確かめられた。



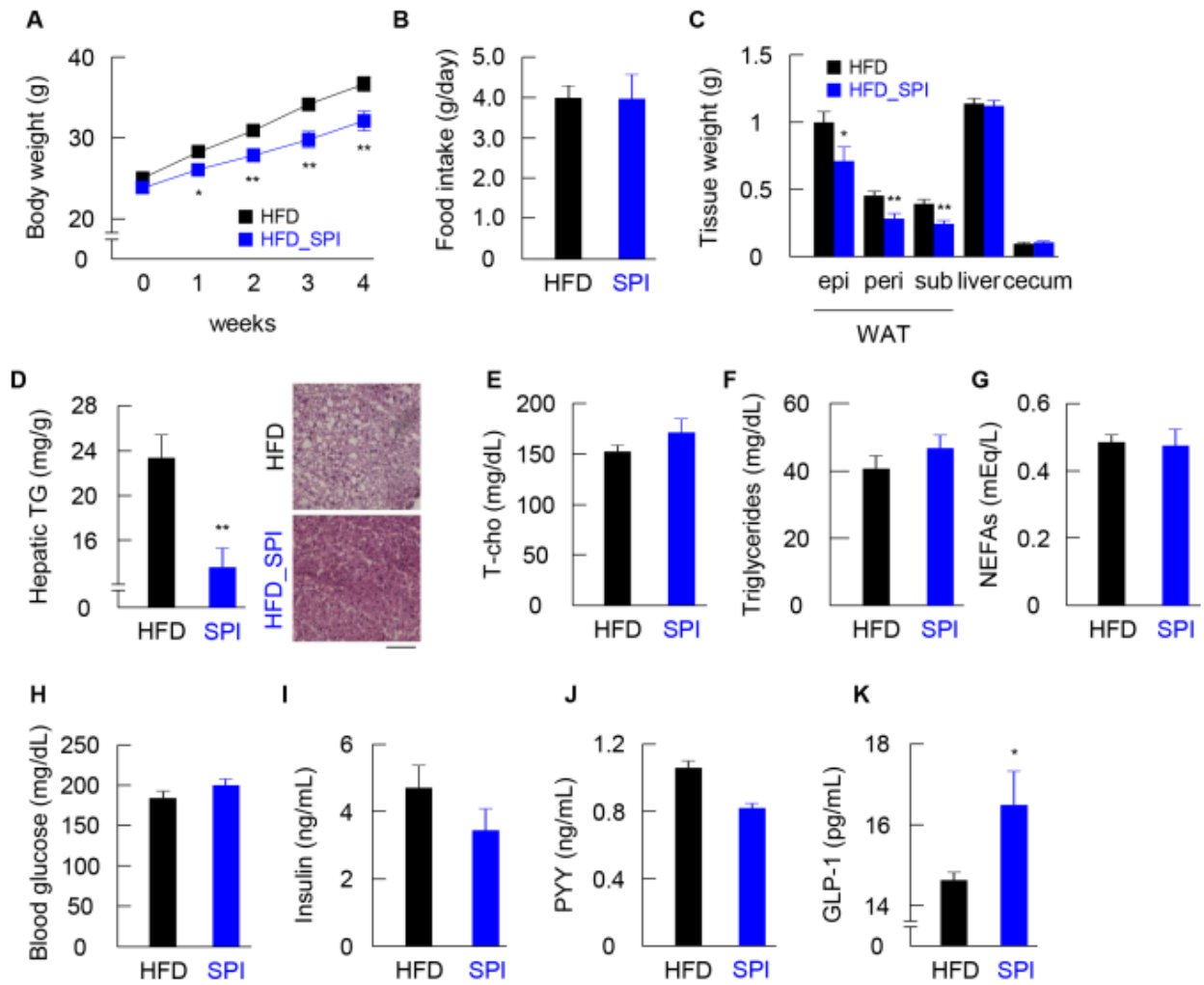


Figure. 1

CONV-R mice were characterized for body weight gain (A), food intake (B), weight of epididymal, perirenal, subcutaneous adipose tissues and liver and cecum (C), hepatic triglycerides and histology of hepatocytes by H&E staining (D) (n = 9–10). Plasma total cholesterol (E), plasma triglyceride (F), plasma NFFA (G), blood glucose (H), plasma insulin (I), plasma PYY (J), and plasma GLP-1 (K) (n = 8–10). Data are expressed as means  $\pm$  SE. Differences were assessed by Student's t-test. Significance is established at adjusted  $p < 0.05$  (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

### 3-2. 無菌条件下における SPI の生理機能

SPI の抗生活習慣病作用が腸内細菌叢を介した作用であるかを検証するために、無菌アイソレーター内で飼育した ICR マウス(Germ-free)を用いて、Conventional と同様の負荷試験を実施した。その結果、Germ-free 条件下においては、HFD 群と HFD-SPI 群に体重差は見られず、白色脂肪組織重量および肝臓中 TG 量の有意な減少も認められなかった(Fig. 2A-C)。また、PYY の血漿中濃度の変化は Conventional 条件下と Germ-free 条件下で同様であったが、GLP-1 の血漿中濃度への影響は消失していた(Fig. 2D,E)。以上より、Germ-free 条件下では SPI による脂肪肝に対する保護作用と GLP-1 分泌促進作用の消失が確認された。

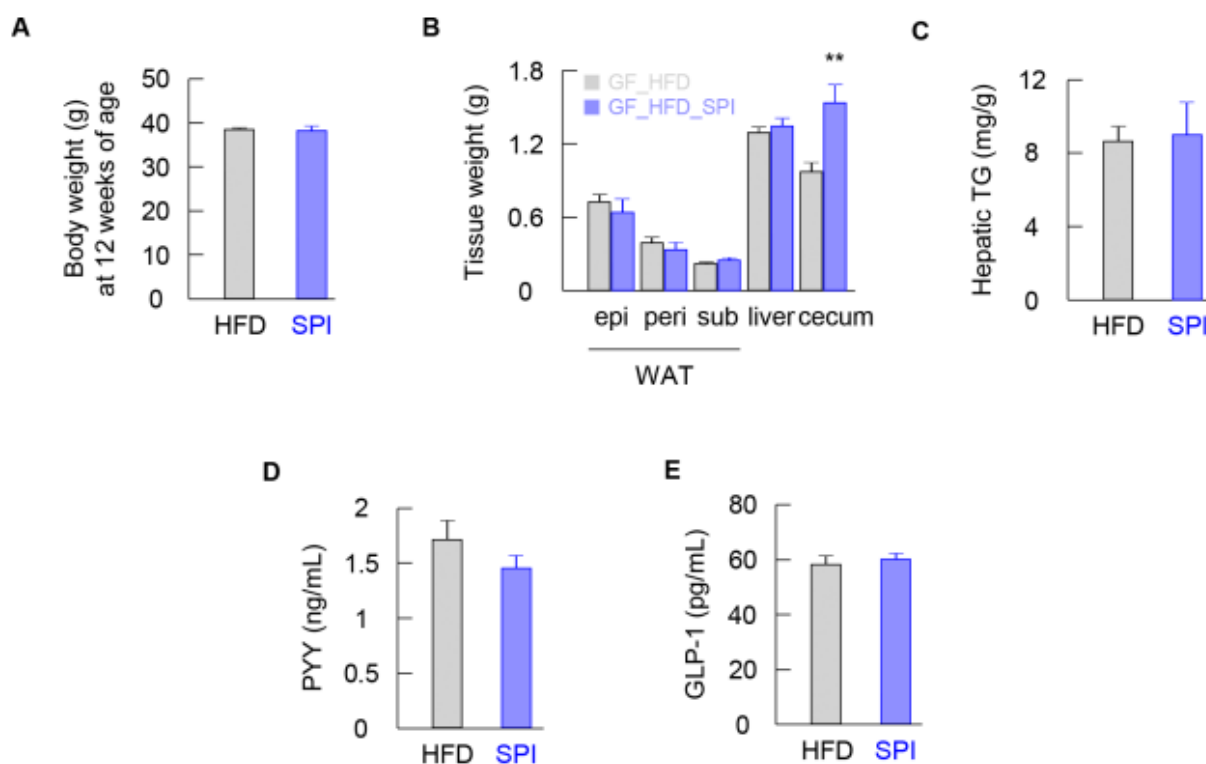


Figure. 2

GF mice were characterized for body weight at 12 weeks of age (A), weight of epididymal, perirenal, subcutaneous adipose tissues and liver and cecum (B), and hepatic triglyceride (C) (n = 8). Plasma PYY (D) and GLP-1 (E) were measured by ELISA (n = 8). Data are expressed as means  $\pm$  SE. Differences were assessed by Student's t-test. Significance is established at adjusted  $p < 0.05$  (\*\*  $p < 0.01$ ).

### 3-3. SPI 負荷による腸内細菌代謝物変化

HFD 群と HFD-SPI 群間の腸管ホルモン分泌に差が見られたことから、何らかの腸内細菌代謝物変化が SPI の脂質代謝改善作用に影響を及ぼしている可能性が示唆されたため、GLP-1 分泌に関与することが報告されている主要な腸内細菌代謝物である短鎖脂肪酸と胆汁酸の分析を行った。短鎖脂肪酸は腸管内分泌細胞に発現する GPR43 を活性化し、GLP-1 分泌を促進することが明らかとされている<sup>48)</sup>。しかし、糞便中の短鎖脂肪酸量に HFD 群と HFD-SPI 群間で有意な増加は認められなかった(Fig. 3A)。この結果は、盲腸重量が HFD-SPI 群で増加しなかったことと相関する(Fig. 1C)。従って、SPI は発酵性の低い素材であり、その代謝機能改善作用機序は、発酵性の高いフラクトオリゴ糖やイヌリン、 $\beta$ -グルカンなどに代表される難消化性多糖の代謝機能改善作用機序とは全く異なることが示唆された。次に、SPI が胆汁酸の合成、代謝に及ぼす影響を評価するために、糞便中の胆汁酸濃度を定量した。その結果、HFD-SPI 群では HFD 群と比較して、二次胆汁酸濃度が有意に上昇し、一次胆汁酸濃度は中程度に低下していた。興味深いことに、HFD-SPI 群では盲腸内の二次胆汁酸濃度が非常に高いにもかかわらず、糞便中の胆汁酸量は HFD 群よりも少なかった(Fig. 3B 左)。これらの結果から、HFD-SPI 群は、胆汁酸、特に二次胆汁酸が大腸でかなり吸収されていることが示唆された。特に、糞便中の DCA と LCA を含む二次胆汁酸量は、HFD-SPI 群は HFD 群よりも有意に高かった(Fig. 3C)。また、一次胆汁酸においては、齧歯類の主要な一次胆汁酸である  $\alpha$ -ムリコール酸( $\alpha$ -muricholic acid; aMCA)と  $\beta$ -ムリコール酸( $\beta$ -muricholic acid; bMCA)の両方が、HFD-SPI 群で HFD 群と比較して有意に減少していた(Fig. 3C)。一方、血漿中の胆汁酸については、HFD 群と HFD-SPI 群の間に有意な差はなかった(Fig. 3D)。また、Germ-free 条件下においては、盲腸および糞便中に二次胆汁酸は、ほとんど含まれていなかった(Fig. 3B 右)。DCA や LCA などの二次胆汁酸は、腸管内分泌細胞に発現する TGR5 を介して GLP-1 分泌を促進することが報告されていることから<sup>31)</sup>、SPI は腸内細菌による一次胆汁酸から二次胆汁酸への変換を促し、増加した DCA や LCA が腸管内分泌細胞膜上の TGR5 を活性化することで、GLP-1 分泌が促進されたことが示唆される。

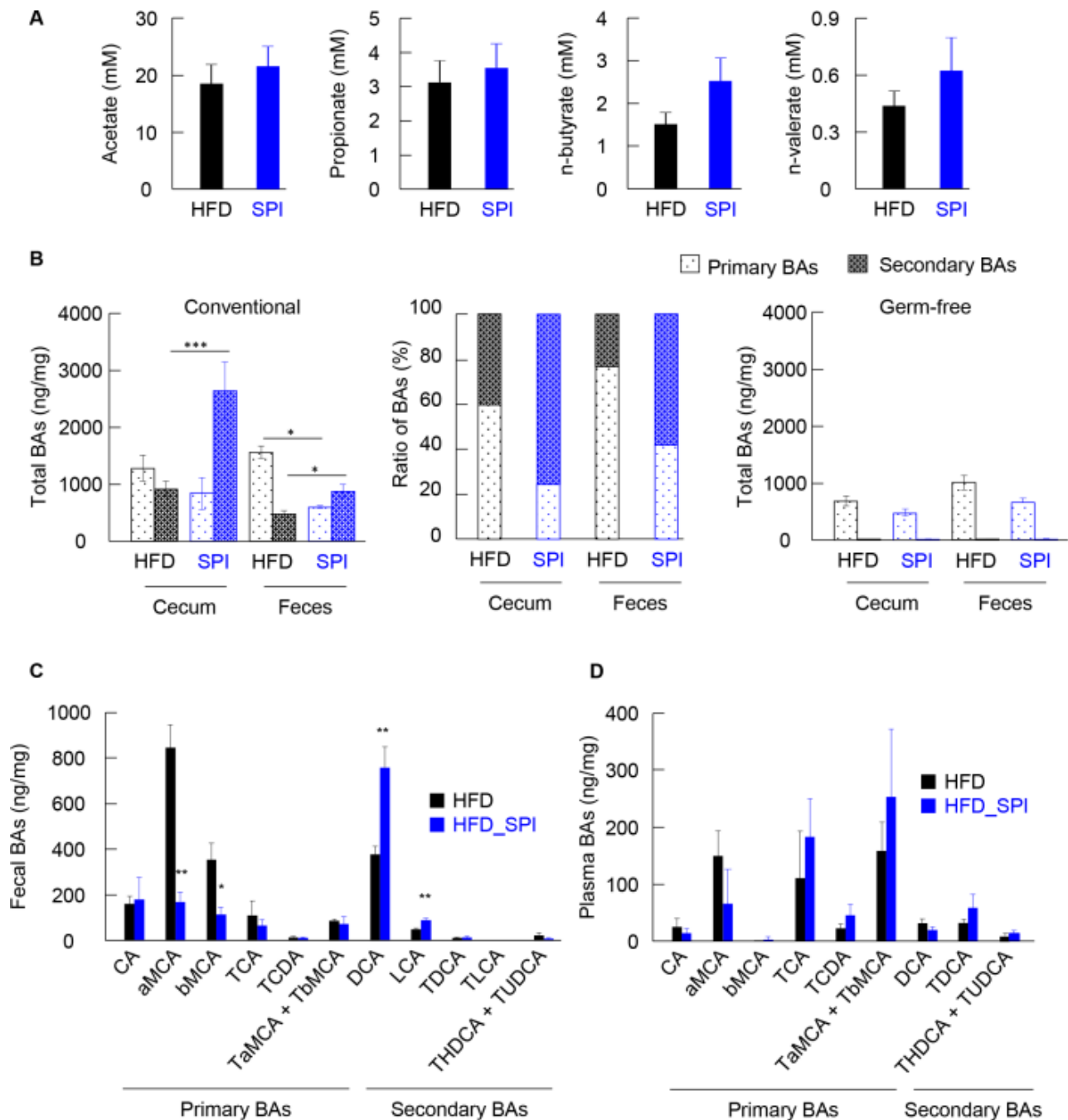


Figure. 3

Fecal SCFAs were measured in HFD- and HFD-SPI-fed CONV-R mice (A). BAs were determined in cecal contents and feces of CONV-R and GF mice (B and C). The data were shown in the absolute amounts (B, left and right) and ratio (B, middle) of primary and secondary BAs, and individual BAs (C). Individual BAs were determined in plasma of CONV-R mice (D). Data are expressed as mean  $\pm$  SE (n = 7–10). Differences were assessed by Student's t-test. Significance is established at adjusted  $p < 0.05$  (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

### 3-4. SPI 負荷による腸内細菌叢変化

SPI 摂食により腸内細菌叢がどのように変化したのかを明らかにするために、糞便より細菌叢 DNA を抽出し、16S rRNA 菌叢解析を行った。糞便中の微生物叢を分類学的に解析したところ、どちらの群においても、門 (phylum) レベルでは Firmicutes 門と Bacteroidetes 門の占有率が高く、Proteobacteria 門がそれに続いて占有率が高かった。Deferribacteres 門と Actinobacteria 門は、HFD と比較して、HFD-SPI 群で相対的な存在比率が優位に増加していた (Fig. 4A)。UniFrac 解析により得られた距離行列を用いて主座標分析 (PCoA) を行い、両細菌叢間の類似性を視覚化した結果、食事の種類に応じて異なるクラスタリングが示され、PCoA1 軸に沿って HFD-SPI 群と HFD 群の腸内細菌叢が完全に分離していた (Fig. 4B)。PERMANOVA による一対比較の結果、統計的に有意な分離であることも確認された。科 (family) レベルでの相対的な存在量をヒートマップで比較すると、科レベルにおいても SPI 負荷腸内細菌叢が変化することが明らかとなった。特に、*Bacteroidales*S24-7 科、*Ruminococcaceae* 科などの有意な増加と *Streptococcaceae* 科、*Lactobacillaceae* 科、*Coriobacteriaceae* 科などの有意な減少が認められた (Fig. 4C)。このうち、*Ruminococcaceae* 科は BSH 活性を有することが報告されている<sup>62)</sup>。さらに、腸管内の二次胆汁酸量が SPI 負荷により有意に増加していたことから、胆汁酸代謝に関連する菌の変化をリアルタイム PCR により調べた結果、コール酸 (cholic acid; CA) やケノデオキシコール酸 (chenodeoxycholic acid; CDCA) などの一次胆汁酸をそれぞれ DCA や LCA などの二次胆汁酸に変換する 7 $\alpha$  脱水酸化酵素を有する菌が多数報告されている *Clostridium cluster XIVa* 科の存在量が HFD-SPI 群で有意に増加していた<sup>64,65)</sup> (Fig. 4D)。さらに、LDA および LEfSe を用いて、HFD 群と HFD-SPI 群間で存在量の差が最も大きい分類群をさらに特定した結果、HFD 群と HFD-SPI 群はそれぞれに異なった細菌クラスターを有していることが確認された (Fig. 4E,F)。以上より、SPI 負荷により腸内細菌叢は変化し、特に二次胆汁酸産生菌である *Clostridium cluster XIVa* 科が有意に増加することが明らかとなった。

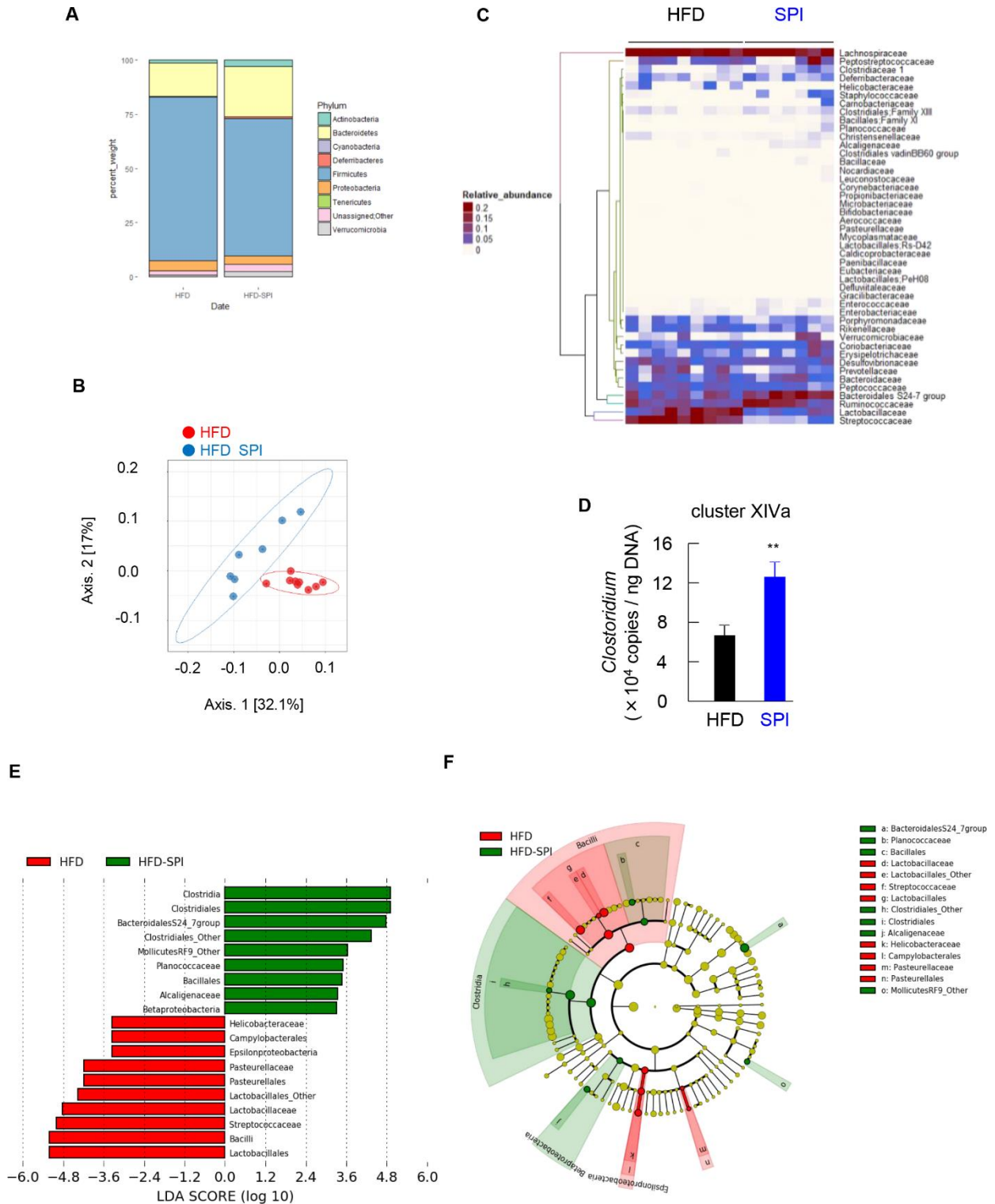


Figure. 4

(A) Relative abundance of major taxonomic groups at phylum level, (B) principal coordinate analysis (PCoA), and (C) heatmap of relative abundance of major taxonomic groups at family level (mean relative abundance > 0.1%) of the fecal microbiota in HFD-SPI-fed mice vs. the HFD controls based on unweighted Unifrac distances between diet groups. (D) Clostridium cluster XIVa of the fecal microbiota was measured by quantitative real-time PCR. Data are expressed as mean  $\pm$  SE (n = 6–8). Differences were assessed by Student's t-test. Differences were assessed by

Student's t-test. Significance is established at adjusted  $p < 0.05$  (\*\*  $p < 0.01$ ). Linear discriminative analysis (LDA) effect size (LEfSe) analyses of statistically significant taxa at family level. Taxa were sorted by degree of difference (E) and overlaid on a taxonomic cladogram (F). Only the taxa meeting a significant LDA threshold value of  $>2.0$  are shown.  $n = 9$  for HFD group,  $n = 7$  for HFD-SPI group.

#### 第4節 小括

本研究では、分離大豆タンパク質(SPI)が腸内細菌による胆汁酸代謝を介して、代謝機能改善作用を示すことを明らかにした。以下に、本研究で得られた知見を総括する。

SPIの主要成分である $\beta$ -コングリシニンは、抗肥満作用や脂肪肝抑制作用などを有することが既に明らかとされているが、本研究より、SPI摂取はHFD負荷による肥満誘導時において、体重および白色脂肪組織重量の増加を抑制し、特に、肝臓中の中性脂肪蓄積を有意に抑制する効果があることが確かめられた。このとき、糞便中・盲腸中のDCAやLCAなどの二次胆汁酸量が有意に増大することが明らかとなった。腸管内分泌細胞膜上に発現するTGR5は活性化されるとGLP-1分泌を促進することが明らかとされているが、そのアフィニティーはLCA>DCA>CDCA>CAであることが分かっている<sup>44)</sup>。よって、SPI摂取により、腸管内において二次胆汁酸量および二次胆汁酸/一次胆汁酸比が増大したことが、TGR5の活性化増大を介してGLP-1分泌亢進に寄与したと推測される。また、糞便中・盲腸中の二次胆汁酸量が有意に増加していたということは、すなわち、二次胆汁酸の排泄が促進されたということである。肝臓中の二次胆汁酸量の低下が血清グルコース濃度および血清中性脂肪濃度の減少をもたらすことが報告されており<sup>28)</sup>、二次胆汁酸が宿主のエネルギー恒常性維持に重要な役割を担っている可能性が示唆されている。

SPI負荷による腸内細菌叢変化を見てみると、*Ruminococcaceae*科と*Clostridium cluster XIVa*の有意な増加が認められた。*Ruminococcaceae*科はBSH活性を有することが報告されている<sup>63)</sup>。BSHにより抱合型胆汁酸が脱抱合されると、小腸下部や大腸においてある種の腸内細菌による脱水酸化や酸化などの代謝を受けるようになり、二次胆汁酸の産生が増大する。また、CAをDCAへ、CDCAをLCAへ変換する $7\alpha$ 脱水酸化酵素を有する*Clostridium cluster XIVa*の増加も、DCAやLCAなどの二次胆汁酸の増加に寄与したと考えられる。ただ、胆汁酸は腸内細菌による代謝を受ける一方で、腸管内の胆汁酸組成が腸内細菌叢組成に影響を及ぼすという相互関係が成り立っている。したがって、SPIそのものが直接的に*Ruminococcaceae*科と*Clostridium cluster XIVa*を増加させる作用を有するのか、あるいは、SPIが胆汁酸代謝に影響することで腸管内胆汁酸組成が変化し、その結果、胆汁酸代謝関連の腸内細菌数が増変したのかは、本研究結果だけでは結論付けることはできない。ただ、Germ-free条件下では、SPIの高い抗生活習慣病効果が打ち消されたことから、その代謝機能改善効果を発揮するためには腸内細菌および腸内細菌代謝物の存在が重要であることが示唆された。本研究結果より、SPIの抗肥満作用と高い脂肪肝抑制作用が確認され、その作用機序については、腸内細菌代謝物である二次胆汁酸が重要な鍵を握っていることが明らかとなった。

糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病の発症・増悪要因として、肝臓における脂肪蓄積の増加が密接に関

連していることが知られているが、肝臓脂肪量を効果的に減らす方法は、摂取カロリー制限による食事療法と数種類の医薬品以外には確立されていない。SPI は高い脂肪肝抑制効果を持つことから、抗生活習慣病効果の高い新たな機能性食品開発への応用が期待される。SPI の胆汁酸代謝を基軸とした作用機序の全容を明らかにしていくことは、腸内細菌叢と胆汁酸代謝の関連に着目した新たな生活習慣病治療法の確立にも繋がると期待される。



### 第3章 カードランによる腸内環境変化とエネルギー代謝制御

#### 第1節 はじめに

$\beta$ -グルカンは、 $\beta$ -D-グルコース多糖類の一種であり、細菌、酵母、真菌、藻類、食用キノコ、穀物などの細胞壁に存在している<sup>61,66,67</sup>。ほとんどの $\beta$ -グルカンの一般的な形態は、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)グリコシド結合を持つD-グルコースユニットから構成されているが、酵母や真菌の $\beta$ -グルカンは分岐しており、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)グリコシド結合を含んでいる。一方、大麦をはじめとする穀類の $\beta$ -グルカンは、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)および $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)グリコシド結合を形成している。その他の $\beta$ -グルカンは、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)グリコシド結合のみの直鎖構造を持っている。宿主の酵素はこの $\beta$ -グリコシド結合を切断することができないため、 $\beta$ -グルカンは難消化性多糖類とみなされており、いくつかの $\beta$ -グルカンでは摂取することで腸内細菌叢の変化に伴い、免疫応答や代謝制御など宿主の生体恒常性に有益な効果が得られることが報告されている<sup>61,68</sup>。

*Agrobacterium bio-bar*などの細菌によって合成されるカードランは、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)グリコシド結合のみを持つ直鎖状の $\beta$ -グルカンであり、食品添加物として加工食品のゼラチン化剤、安定剤や増粘剤などに使用されている<sup>69</sup>。これまでに、カードランの摂取が腸管内の短鎖脂肪酸濃度を上昇させ、宿主の免疫系や骨代謝を改善することが報告されているものの、代謝恒常性に及ぼす影響はいまだ明らかとされていない<sup>70,71</sup>。そこで、本研究では、カードランの摂取が、腸内細菌叢と腸内細菌代謝物量の変化を調節し、HFDによる食事誘導性肥満に対する代謝機能改善効果を発揮すると仮定し、カードランの摂取、腸内細菌叢、および腸内細菌代謝物の相関関係を明らかにすることを目的とした。

#### 第2節 実験材料および方法

##### 2-1. 動物および負荷試験

実験動物は、日本エスエルシー株式会社から購入したC57BL/6J系統の雄マウスを使用した。3週齢のマウスを購入し、CLEA Rodent Diet CE-2(日本クレア)を与えて1週間馴化させた後、4週齢から試験食の負荷を開始した。飼料は高脂肪食(HFD; 60kcal%脂肪含有量;リサーチダイエツト)をベースに10%(w/w)の38 $\mu$ m(400メッシュ)セルロース粉末(富士フィルム和光純薬株式会社)またはカードラン(富士フィルム和光純薬株式会社)を配合したものをを用いた(Table. 4)。負荷期間は12週間で、週1回体重測定を行い、体重変化を比較した。実験動物は、室温20~23 $^{\circ}$ C、湿度40~60%の環境の下、12時間の明暗サイクルで飼育した。

Table. 4

Ingredient	Cellulose	Curdlan
	g	g
Casein	200	200
L-Cystine	3	3
Maltodextrin 10	125	125
Sucrose	68.8	68.8
Cellulose, BW200	50	50
Soybean oil	25	25
Lard	245	245
Mineral mix S10026	10	10
DiCalcium phosphate	13	13
Calcium carbonate	5.5	5.5
Potassium citrate, H <sub>2</sub> O	16.5	16.5
Vitamin mix V10001	10	10
Choline bitartrate	2	2
Cellulose	86	0
Curdlan	0	86
Energy, kcal/g	4.72	4.72
% Energy		
Protein	20	20
Carbohydrate	20	20
Fat	60	60

## 2-2. 剖検および組織採集

12週間の負荷試験終了後に剖検と分析に必要な組織の採集を行った。解剖は約5時間の絶食後に行った。絶食中はマウスを空ケージに移し、糞便を採集した。採集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、尾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、マウスはイソフルランによる吸引麻酔を行い、血液および白色脂肪組織、肝臓、盲腸を採取した。下大静脈より採血を行い、得られた血液サンプルは、4°C、7,000×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。また、採取した組織サンプルは重量を測定し、アルミホイルに包んで-80°Cで凍結保存した<sup>49)</sup>。

## 2-3. 16S rRNA 菌叢解析

糞便中のDNA抽出には、FastDNA™ SPIN Kit for Feces (MP Biomedicals)を使用した。サンプルのDNA濃

度を約 10ng/μl に揃え、16S rRNA 遺伝子の V4 領域を 515F/806R プライマーを用いて増幅した。Nextera® XT Index kit v2 SetA (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、「Preparing Libraries for Sequencing on the MiSeq」(part 15039740, Rev. D)の protocol を用いて調製し、アンプリコンのシーケンスを行った。シーケンス後の微生物群集解析は QIIME1(Quantitative Insights Into Microbial Ecology, version 1.9.1)のパイプラインを用いて、リードの結合、クオリティーチェック、細菌叢組成の解析を行った。データベースとしては Silva (version 1.2.8)を用いて、データベースに含まれるリファレンス配列ごとに 97%の相同性を持つリードをまとめて OTU を作成した。得られた OTU をもとに試料の細菌について門、科レベルの菌叢組成を決定した。決定した細菌叢組成と統計分析ソフト R を使用して、主成分分析(PCoA)とヒートマップ解析を行った。PCoA には Vegan パッケージを、ヒートマップ解析には ComplexHeatmap パッケージを用いて相対存在比を計算した<sup>62)</sup>。

#### 2-4. 属レベルでの定量リアルタイム PCR による腸内細菌の相対存在量比較

FastDNA™ SPIN Kit for Feces (MP Biomedicals)により糞便サンプルから細菌叢 DNA を抽出し、DNA 濃度を 1ng/μl に揃えテンプレート DNA とした。各サンプルの 16S rRNA 遺伝子コピーを、特異的な 16S プライマーを用いたリアルタイム PCR で評価した。内部コントロールとしてユニバーサル 16S rRNA 遺伝子を用い、16S rRNA に対する相対レベルで表した。定量リアルタイム PCR 解析は、TBGreen™ Premix Ex Taq™II (TaKaRa) および StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて行った<sup>61)</sup>。ユニバーサル 16S rRNA および各菌属の検出には、下記のプライマーを使用した(Tabel. 5)。

Table. 5

Gene	Primer	Sequence
<i>Universal</i>	Forward	5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'
	Reverse	5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'
<i>Muribaculum</i>	Forward	5'-AGGGAGCAATTGAGTCCACG-3'
	Reverse	5'-TGATATTCCGCCTACGCACC-3'
<i>Paramuribaculum</i>	Forward	5'-TAATACGGAGGATGCGAGCG-3'
	Reverse	5'-CAAGGCACCCAGTTTCAACG-3'
<i>Duncaniella</i>	Forward	5'-TAATACGGAGGATGCGAGCG-3'
	Reverse	5'-GCATTCCGCATACTTCTCGC-3'
<i>Catenibacterium</i>	Forward	5'-TAGCGCAGGGATGGACCTAT-3'
	Reverse	5'-TGTCTCAGTCCCAATGTGGC-3'

## 2-5. 糞便中の短鎖脂肪酸定量

採取した糞便を 10 倍量の MilliQ 水に懸濁し、4°C、8,000×g で 5 分間遠心し、上清を回収した。2%量の 5-スルホサリチル酸を加えて除タンパクした後、5%量の塩酸と 2 倍量のジエチルエーテルを加えて、液液分配抽出を行った。内部標準物質は 2-エチル酪酸を用いた。調製サンプル中の各種短鎖脂肪酸濃度を GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu)により測定した。カラムは VF-WAX ms column (30m, 0.25mmID、1µm Thickness、Agilent)を使用した。各化合物は個別のイオン(m/z)および検出時間で分離・同定した(Table. 2)。得られたイオンクロマトグラフのピークを積分し、個々の短鎖脂肪酸と 2-エチル酪酸の検量線を用いて定量した<sup>61)</sup>。

## 2-6. 血漿中の脂質の定量

血漿中の総コレステロール濃度は、ラボアッセイ™コレステロール(コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法、富士フィルム和光純薬)のキットを用いて測定した。血漿中の NEFA は、ラボアッセイ™NEFA(ACS・ACOD 法、富士フィルム和光純薬)のキットを用いて測定した。血漿中の TG 濃度は、ラボアッセイ™トリグリセライド(GPO・DAOS 法、富士フィルム和光純薬)のキットを用いて測定した<sup>49)</sup>。

## 2-7. 血漿中 GLP-1 濃度測定

活性型 GLP-1 の分解を防ぐために、採取した血液 198µl に DPP-4 インヒビター(Merck Millipore)を 2µl 加えてよく混合し、4°C、7,000×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 glucagon-like peptide-1 (Active) ELISA (Merck Millipore)のキットを用いて測定した<sup>62)</sup>。

## 2-8. 血漿中インスリン濃度測定

血漿中のインスリン濃度は、レビス®インスリン-マウス(RTU)(富士フィルムワコーシバヤギ)のキットを用いて測定した<sup>49)</sup>。

## 2-9. 肝臓中 TG 定量

肝臓を約 75mg 切り取り、TG 抽出バッファー(0.45M 酢酸:MeOH:クロロホルム=1:2.5:1.25) 4mL 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 1mL 加えてよく攪拌し、4°C、1,500×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、250µl 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™トリグリセライドの測定キットを用いて測定し、肝臓 1g に含まれる TG 量を求めた<sup>49)</sup>。

## 2-10. ヘマトキシリン・エオシン染色(HE 染色)

肝臓の一部を切り取り、OCT コンパウンド(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%PFA を 1mL ずつ滴下して 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。70% EtOH および水で洗浄した後、エオシンで 5 分間染色した。再度、70% EtOH および水で洗浄した後、70% EtOH (10 分間)および 100% EtOH (10 分間、2 回)により脱水し、さらにキシレン (10 分間、2 回)により透徹を行った。風乾させた後、MOUNT-QUICK(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、光学顕微鏡で肝組織像を観察した<sup>49)</sup>。

## 2-11. リアルタイム PCR

マウス組織からの RNA 抽出は RNAiso Plus (TaKaRa)を用いて行った。抽出した RNA は Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen)を用いて逆転写を行った。逆転写で得られた cDNA は Taq DNA polymerase (TaKaRa)とプライマーにより増幅し、定量リアルタイム PCR 解析は、TBGreen™ Premix Ex Taq™II (TaKaRa)および StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて行った。遺伝子発現は、ハウスキーピング遺伝子 18S を用いた比較 2- $\Delta\Delta C_t$  法により正規化した。各遺伝子のプライマーは、下記の配列を使用し(Tabel. 6)<sup>49)</sup>。

Table. 6

Gene	Primer	Sequence
<i>18S</i>	Forward	5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3'
	Reverse	5'-AGACAAATCGCTCCACCAAC-3'
<i>Accl</i>	Forward	5'-AAGGCTATGTGAAGGATG-3'
	Reverse	5'-CTGTCTGAAGAGGTTAGG-3'
<i>Pgcl1a</i>	Forward	5'-GAGAATGAGGCAAACCTTGCTAGCG-3'
	Reverse	5'-TGCATGGTTCTGAGTGCTAAGACC-3'
<i>Cpt1a</i>	Forward	5'-GCATAAACGCAGAGCATTCC-3'
	Reverse	5'-GATGTTGGGGTTCTTGTCTCC-3'

## 2-12. 糞便中の胆汁酸定量

採取した糞便を凍結乾燥機で一晩乾燥させ、サンプルの乾燥重量を測定した。乾燥サンプルを MilliQ 水 + 0.4M NaOH (1:1, v/v)中に懸濁し、内部標準物質として d4-DCA および d4-TDCA を加え、さらにヘキサンを加えて液液分配抽出を行った。下層を回収し、4°C、20,000×g で 10 分間遠心した。上清を回収し、サンプル充填前に、MeOH 1mL、MilliQ 水 3mL を通してコンディショニングした Oasis® PRiME HLB 1cc Extraction Cartridges (Waters)に通して精製した。サンプル充填後、MilliQ 水 500 $\mu$ L で洗浄し、MeOH + アセトニトリル(1:1, v/v) 1mL で溶出した。サンプル充填後、MilliQ 水 500 $\mu$ L で洗浄し、MeOH + アセトニトリル(1:1, v/v)1mL で溶出した。

ACQUITY UPLC®システム (Waters)に Xevo TQD MS (Waters)を組み合わせた LC/MS/MS を用いて、調製サンプル中の各種胆汁酸濃度を測定した。カラムは Acquity HSS C18 (2.13100mm、1.7mm) column (Waters)を使用した。移動相は、0.1%酢酸水溶液とアセトニトリル-イソプロパノール(9:1、v/v)を用いた。各化合物の検出は、ネガティブイオンエレクトロスプレーモードの MRM で行い、個別のプレカーサーイオン、プロダクトイオンおよび検出時間で分離・同定した (Table. 3)。

### 2-13. 統計処理

結果は全て平均値±標準誤差で表した。腸内細菌叢の類似性を分析するために、統計分析ソフト R の Vegan パッケージを用いて PERMANOVA 検定を行った。各群の alpha diversity は Shannon-diversity を用いて測定した。16S rRNA シーケンシングにおける FDR (false discovery rate) q 値を Benjamini-Hochberg 法を用いて推定した。16S rRNA シーケンシングのデータは、FDR 補正を行った Student's t-test を用いて解析した。P < 0.05 および q < 0.05 で統計的に有意な差とした。

### 第3節 結果および考察

#### 3-1. カードランによる腸内細菌叢組成の改善

高脂肪食摂取による腸内細菌叢破綻は肥満を増悪させる一方で、食物繊維摂取による腸内環境変化は宿主の代謝機能を改善させることが知られている。そこでまず初めに、食物繊維と同様、難消化性多糖類の一種であるカードランによる腸内細菌組成の変化を調べた。非発酵性繊維であるセルロースを対照群とし、セルロースあるいはカードランを配合した HFD を 12 週間摂食させ、負荷試験後の糞便中の腸内細菌叢の変化を比較した。その結果、PCA と alpha-diversity によって示されるように、カードランが腸内細菌叢の組成を変化させることが確認された(Fig. 5A)。糞便中の細菌叢を門(phylum)レベルでのバーチャート解析を行った結果、カードラン負荷群では、Bacteroidetes 門が増加し、Firmicutes 門、Deferribacteres 門、Proteobacteria 門の減少が認められた(Fig. 5B)。Bacteroidetes 門の相対的な存在量は、カードラン負荷群がセルロース負荷群よりも有意に高く、一方で Firmicutes 門、Deferribacteres 門、Proteobacteria 門の相対的な存在量は有意に減少していた。さらに、科(family)レベルで各群をクラスタリングすると、カードラン負荷群において *Bacteroidales* S24-7 科、*Prevotellaceae* 科、*Erysipelotrichaceae* 科の増加が確認された(Fig. 5C)。特に、*Bacteroidales* S24-7 科に属している *Muribaculum* 属、*Paramuribaculum* 属、*Duncaniella* 属、*Erysipelotrichaceae* 科に属している *Catenibacterium* 属の存在量の顕著な増加が確認され(Fig. 5D,E)、カードラン負荷により、腸内細菌叢組成の改善が確認された。

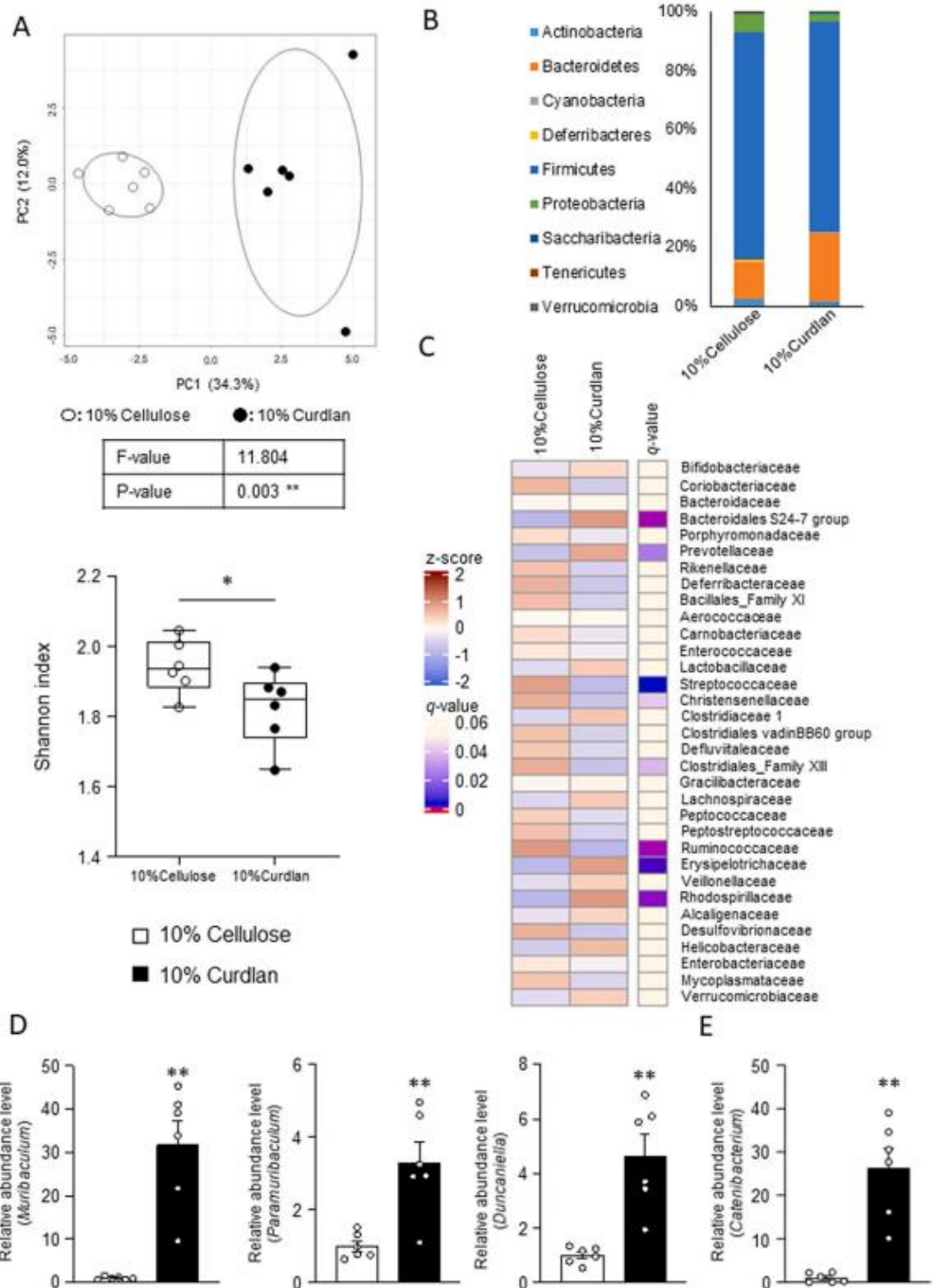


Figure. 5

Changes in fecal microbiota of mice supplemented with curdlan. (A) Principal component analysis (PCA) of taxonomic groups at the family level. Difference in  $\alpha$ -diversity between cellulose and curdlan groups. (B) Relative abundance of major taxonomic groups at the phylum level. (C) Heat map of relative abundance of major taxonomic groups at the family level (mean relative abundance  $> 0.1\%$ ). (D, E) The relative abundance of the gene



*Muribaculum*, *Paramuribaculum*, *Duncaniella* (D), and *Catenibacterium* (E) between cellulose or curdlan groups were detected using real-time PCR. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (Cellulose-supplementation group: n = 6, Curdlan-supplementation group: n = 6).  $P < 0.05$  was considered statistically significant (\* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ).

### 3-2. カードラン負荷による糞便中短鎖脂肪酸の増加

食物繊維の摂取は、その多糖構造の違いに応じて腸内細菌の組成を変化させることにより、様々なレベルで腸内短鎖脂肪酸濃度を増加させることが知られている。そこで、カードラン負荷後の腸内における短鎖脂肪酸産生量を測定した。12週間の負荷試験後、カードラン負荷群の盲腸重量は、セルロース負荷群と比較して有意に高かった(Fig. 6A)。この結果は、マウスにおいては、盲腸が食物繊維の主な発酵部位であり、発酵性飼料の摂取により盲腸が肥大することから、セルロースに比べてカードランが盲腸で発酵することを示している<sup>72)</sup>。盲腸重量の結果と相関して、カードラン負荷群の糞便中短鎖脂肪酸は、セルロース負荷群のそれよりも有意に高かった(Fig. 6B)。この結果は、短鎖脂肪酸であるプロピオン酸や酪酸を産生することが知られている *Bacteroidales* S24-7 科に属する *Muribaculum* 属、*Paramuribaculum* 属、*Duncaniella* 属の増加と一致している(Fig. 5D)<sup>73,74)</sup>。以上のように、カードランの摂取により、腸内細菌代謝物である短鎖脂肪酸、特に酪酸のレベルが顕著に増加された。

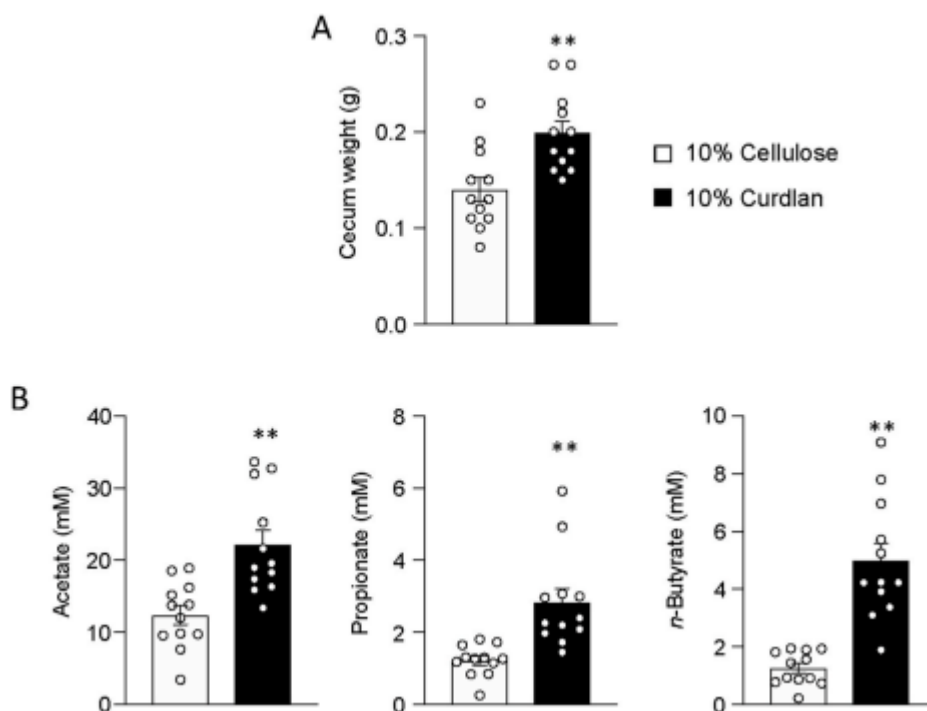


Figure. 6

Short-chain fatty acid (SCFA) production by curdlan supplementation. (A) Weight of cecum in mice fed a high-fat diet (HFD) supplemented with cellulose or curdlan for 12 weeks. (B) Amounts of acetic, propionic and butyric acids among SCFAs extracted from fecal samples collected during a 5-h fast after 12 weeks of cellulose or curdlan supplementation determined using GC-MS. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (Cellulose-supplementation group:

n = 12, Curdlan-supplementation group: n = 12. P < 0.05 was considered statistically significant (\*\*P < 0.01).

### 3-3. カードラン負荷による高脂肪食誘導性高血糖の改善

腸管内の短鎖脂肪酸の増加は宿主の代謝恒常性に影響を与えることが知られているため<sup>43,75</sup>、HFD 誘発肥満マウスにおけるカードラン負荷による代謝機能への影響を調べた。通常飼育した C57BL/6J マウスに、重量比 10%でセルロースまたはカードランを配合した HFD を 12 週間負荷し、体重変化や脂肪組織重量を比較した。その結果、体重および脂肪重量の増加は、セルロース群とカードラン群間で同等であった(Fig. 7A,B)。さらに、肝臓重量や肝臓中の TG や脂肪滴の大きさ、肝臓におけるエネルギー消費(Pgc1a)、 $\beta$  酸化(Cpt1a)、脂肪酸合成(Acc1)などの代謝酵素遺伝子の発現量も、セルロース群とカードラン群の間で有意な差はみられなかった(Fig. 7C,D)。一方で、血漿 TG 量と NEFA 量も、セルロース群とカードラン群で同程度であったが、血糖値と血漿総コレステロール値においては、カードラン群がセルロース負荷群と比較して有意に低かった(Fig. 7E)。さらに、セルロース群に比べ、カードラン群の血漿中のインスリンおよびインクレチンの一種である GLP-1 濃度は有意に高かった(Fig. 7F,G)。腸管ホルモンである GLP-1 は、膵臓の  $\beta$  細胞の増殖やグルコース依存性のインスリン分泌の増加に関係していることから<sup>48</sup>、カードランの摂取は、血漿インスリンおよび GLP-1 レベルの上昇に伴い、高血糖を改善している可能性が示された。

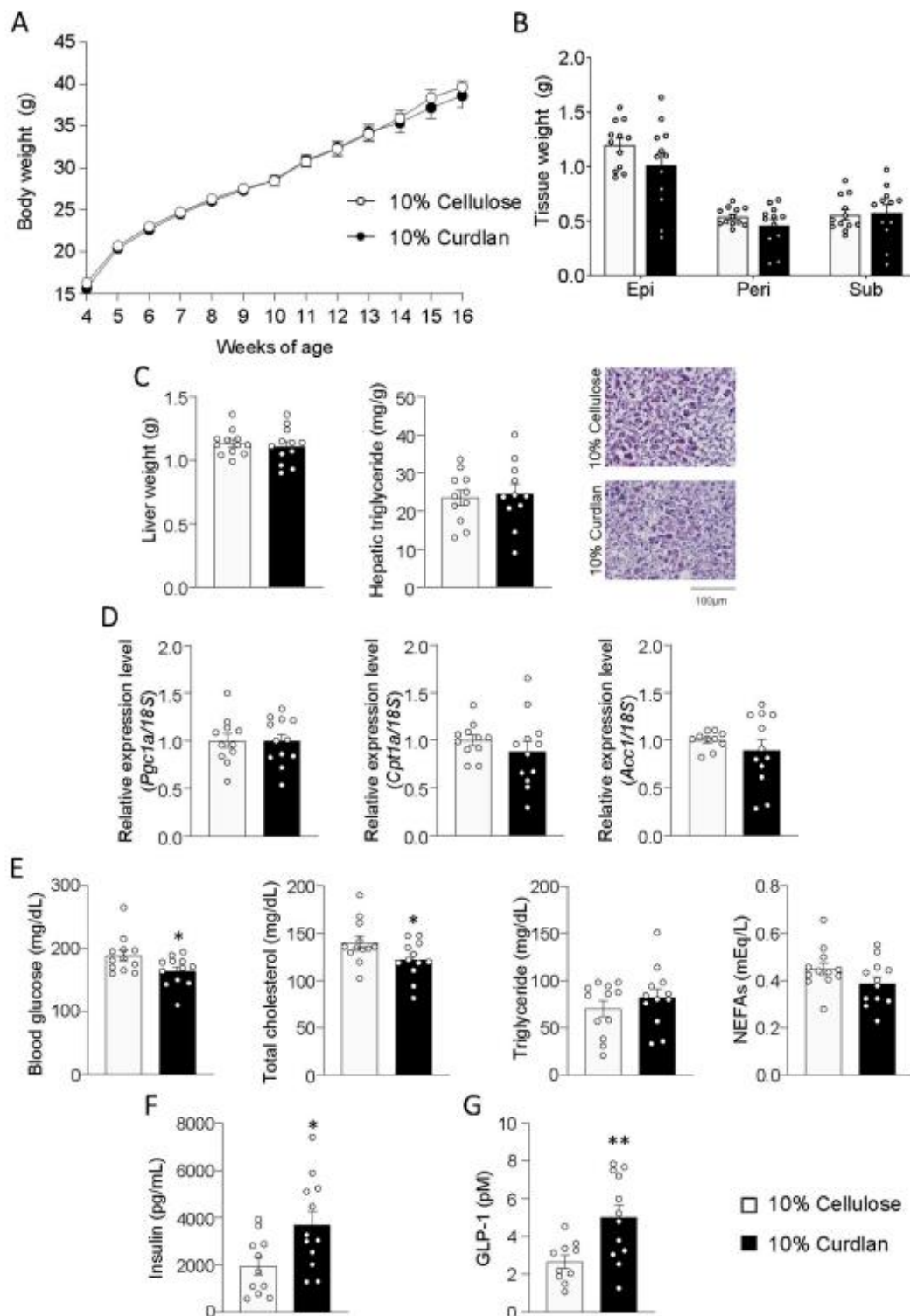


Figure. 7

Improvement of metabolic function by curdian supplementation. (A) Body weight gain. (B) Weight of white epididymal (epiWAT), perirenal (periWAT), and subcutaneous (subWAT) adipose tissues. (C) Weight of liver. Hepatic triglyceride, and hematoxylin and eosin (H&E) staining of hepatocytes in cellulose or curdian group. (D) Relative mRNA expressions involved in energy expenditure (*Pgc1a*),  $\beta$ -oxidation (*Cpt1a*), and fatty acid synthesis

(Acc1) in the liver. (E) Blood glucose, plasma total cholesterol, triglyceride, non-esterified fatty acids (NEFAs), (F) plasma insulin, and (G) plasma GLP-1 levels were measured after fasting for 5 h. (B–G) Mice fed a HFD diet supplemented with cellulose or curdlan for 12 weeks. Data are expressed as means  $\pm$  SEM.  $P < 0.05$  was considered statistically significant (\* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ). Cellulose-supplementation group:  $n = 10$ – $12$ ; Curdlan-supplementation group:  $n = 11$ – $12$ . Each cage contained two mice. Epi, epididymal; Peri, perirenal; Sub, subcutaneous; WAT, white adipose tissue.

#### 3-4. カードラン負荷による糞便中の胆汁酸量の変化

短鎖脂肪酸は、その受容体である GPR41、GPR43 を介してインスリンおよび GLP-1 の分泌を促進し、代謝制御機構に影響を与える<sup>43,76</sup>。しかし、腸内細菌叢は短鎖脂肪酸産生だけでなく、一部の腸内細菌が有する BSH によって、肝臓で合成された一次胆汁酸の脱抱合や脱水酸化などの代謝による二次胆汁酸産生にも寄与している。さらに、二次胆汁酸の増加によっても GLP-1 の分泌に影響を与えることが知られている<sup>31,36,37,77</sup>。そこで、カードラン摂取と血漿 GLP-1 増加の関係を明らかにするために、糞便中の一次胆汁酸および二次胆汁酸を測定した。結果、一次胆汁酸に対する二次胆汁酸の比率は、セルロース負荷群より、カードラン負荷群の方が優位に高かった(Fig. 8A)。さらにそれぞれの胆汁酸の定量分析を行った結果、齧歯類で最も多い一次胆汁酸である bMCA が、カードラン負荷群ではセルロース負荷群に比べて大幅に減少している一方で、主要な二次胆汁酸である DCA は、セルロース負荷群に比べ、カードラン負荷群では大幅な増加が確認された(Fig. 8B)。これらの結果から、カードラン摂取による二次胆汁酸の増加もまた、血漿中の GLP-1 濃度の上昇に関与することが示唆される。

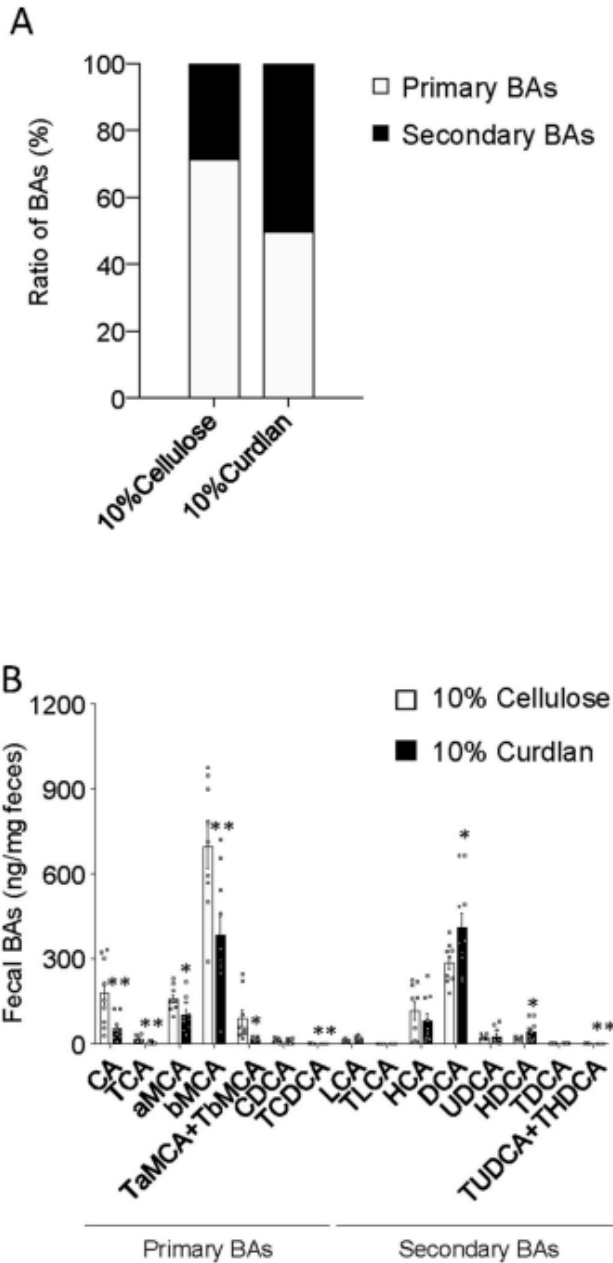


Figure. 8

Changes in the bile acid (BA) profile of mice supplemented with curdlan. (A) Ratio of primary and secondary BAs. (B) Individual BAs. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Cellulose-supplementation group: n = 9; Curdlan-supplementation group: n = 10. P < 0.05 was considered statistically significant (\*P < 0.05 and \*\*P < 0.01). CA, cholic acid; TCA, tauro-cholic acid; aMCA,  $\alpha$ -muricholic acid; bMCA,  $\beta$ -muricholic acid; TaMCA, tauro- $\alpha$ -muricholic acid; TbMCA, tauro- $\beta$ -muricholic acid; CDCA, chenodeoxy cholic acid; TCDCa, tauro-chenodeoxy cholic acid; LCA, lithocholic acid; TLCA, tauro-lithocholic acid; HCA, hyocholic acid; DCA, deoxycholic acid; UDCA, ursodeoxycholic acid; HDCA, hyodeoxycholic acid; TDCA, tauro-deoxycholic acid; TUDCA, tauro-ursodeoxycholic acid; THDCA, tauro-hyodeoxycholic acid.

#### 第4節 小括

本研究では、カードランが腸内細菌叢の組成変化を介して、高脂肪食誘導性高血糖の抑制作用を示すことを明らかにした。以下に、本研究で得られた知見を総括する。

カードランの摂取は、腸内細菌の組成に影響を与え、代謝および免疫機能を改善することが報告されている<sup>70)</sup>。しかし、カードラン摂取による腸内短鎖脂肪酸産生を介した代謝機能への影響はこれまで明らかにされていない。本研究では、高脂肪食誘導性肥満マウスにカードラン負荷することで、血糖値と血漿総コレステロール値が低下することを明らかにした。さらに、カードラン負荷による血糖値上昇抑制効果は、腸内細菌叢による短鎖脂肪酸産生と胆汁酸組成の変化が寄与していることを見出した。本研究では、カードラン負荷により、*Bacteroidales S24-7* 科と *Erysipelotrichaceae* 科の有意な増加が示された。*Bacteroidales S24-7* 科に属する *Muribaculum* 属、*Paramuribaculum* 属、*Duncaniella* 属は、短鎖脂肪酸であるプロピオン酸や酪酸を産生することが知られている<sup>73,74)</sup>。したがって、カードラン負荷による糞便中の短鎖脂肪酸量の増加に、*Muribaculum* 属、*Paramuribaculum* 属、*Duncaniella* 属の増加が一部関与する可能性が示唆された。また、*Erysipelotrichaceae* 科の *Catenibacterium* 属は、BSH 遺伝子を有することが知られている<sup>63)</sup>。BSH は二次胆汁酸産生に重要な酵素であることから、カードラン負荷による *Catenibacterium* 属の増加が二次胆汁酸への代謝効率の向上に寄与することで糞便中の二次胆汁酸が増加し、血漿 GLP-1 濃度が上昇した可能性も考えられる。カードラン負荷による二次胆汁酸増加と GLP-1 分泌調節の作用機序を明らかにするには、さらなる研究が必要である。また、コレステロールは胆汁酸合成の基質として利用されるため、カードラン負荷による血漿コレステロール量の低下は、糞便中の胆汁酸組成の変化と関連している可能性が示唆されるが、カードラン負荷によるコレステロール抑制効果の詳細な機序を明らかにするためには、短鎖脂肪酸受容体欠損マウスを用いた更なる研究が必要である。

本研究では、カードラン負荷が高脂肪食誘発高血糖に対して抑制効果を発揮し、腸内環境を改善することを示した。これらの効果は、腸内細菌の代謝物である短鎖脂肪酸や二次胆汁酸産生による GLP-1 の分泌促進の結果として起こることが想定される。したがって、本研究結果は、今後、肥満や糖尿病などの生活習慣病を予防するための食品添加物の開発に貢献するものと考えられる。

## 第4章 総括

本研究では、難消化性食事成分である分離大豆タンパク質(SPI)およびカードランの摂取が、腸内細菌叢の組成変化とそれに伴う腸内細菌代謝物量の変化を介して、代謝機能改善作用を示すことを第2章および第3章で明らかにした。第2章および第3章において、SPIあるいはカードランの摂取は、肥満と正の相関菌とされる *Streptococcaceae* 科の減少、短鎖脂肪酸産生菌である *Bacteroidales S24-7* 科の増加および二次胆汁酸合成酵素 BSH を有する *Ruminococcaceae* 科あるいは *Erysipelotrichaceae* 科の増加が共通して示された。さらに、両研究において、腸管ホルモン GLP-1 の分泌が同程度に促進することが認められた。しかしながら、第2章の SPI 摂取では脂肪肝抑制が観察されたものの、インスリン分泌促進は認められず、一方第3章のカードラン摂取ではインスリン分泌促進は認められたものの脂肪肝抑制は観察されなかった。両研究で共通して同程度の分泌上昇が確認された GLP-1 の生理作用である、脂肪肝抑制とインスリン分泌促進が、それぞれ一方でのみ認められた事に関しては、GLP-1 以外の生体内成分の影響が想定される。第2章では SPI 摂取により、糞便中の二次胆汁酸量が劇的に増加しており、第3章のカードラン摂取による増加量よりも倍近い増加が観察された。肝臓に発現する二次胆汁酸受容体 FXR は脂肪肝蓄積抑制作用を有しているため<sup>34)</sup>、この二次胆汁酸量の差が、SPI 摂取とカードラン摂取による脂肪肝抑制効果の違いに影響を及ぼした可能性が示唆される。一方、インスリン分泌促進の違いに関しては、第3章のカードラン摂取でのみ上昇が確認された短鎖脂肪酸の関与が推察される。短鎖脂肪酸は、膵臓  $\beta$  細胞の GPR43 を活性化することで膵臓  $\beta$  細胞の分化を促進することが示されている<sup>79)</sup>。また、短鎖脂肪酸の一つである酪酸は、膵臓  $\beta$  細胞において HDAC 阻害による分化促進をすることが明らかとなっている<sup>43)</sup>。以上のように、SPI およびカードランの摂取による、腸内環境変化を介したエネルギー代謝への影響は、腸内細菌代謝物による宿主の様々な受容体を介した複合的な作用に起因することが示唆される。

近年、様々な代謝性疾患や免疫疾患が、食生活や腸内細菌叢の構成と関連していることが明らかになっている。腸内細菌叢は、「第3の臓器」と呼称されるように、宿主との単純な共生関係に留まらず、宿主の生体恒常性維持に重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。さらに、様々な食事成分を腸内細菌叢が代謝することで産生される腸内細菌代謝物群が、宿主受容体を介して様々な生理機能をもたらす、宿主と腸内細菌叢を繋ぐ実質的な分子実体であることが証明されている。我々もまた、本研究で明らかにした SPI やカードランなどの食事成分以外にも、腸内細菌叢の構成とそれに伴う腸内細菌代謝物組成を変化させ、宿主に有益な作用をもたらす食事成分をいくつか明らかにしている。

例えば食事によって摂取される食物繊維のうち、大麦に含まれる、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)と  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)グリコシド結合が混在した  $\beta$ -グルカンが、腸内環境を変化させることで宿主のエネルギー代謝に有益な効果を与えることを報告した<sup>61)</sup>。大麦  $\beta$ -グルカンは胚乳細胞壁に含まれる水溶性食物繊維である。種子胚乳、胚芽やふすまなど  $\beta$ -グルカン含有部位を含む全粒粉の摂取が、インスリン感受性の増加などの糖代謝に有益な効果を示すことから、作用成分として大麦  $\beta$ -グルカンが期待されていたが、詳細な作用機序は明らかにされていなかった<sup>78,80,81)</sup>。そこで我々は、 $\beta$ -グルカン高含有大麦粉 (high  $\beta$ -glucan; HBG)あるいは低含有大麦粉 (low  $\beta$ -glucan; LBG)を混合した高脂肪食をマウスに与え、大麦  $\beta$ -グルカンによるエネルギー代謝へ

の影響を検討した。その結果、HBG食を与えたマウスでは、体重および脂肪重量の増加抑制、さらには腸管ホルモンである PYY と GLP-1 の分泌量増加が確認された。また、HBG食を与えたマウスの糞便では短鎖脂肪酸の増加と、主要な酢酸産生菌である *Bifidobacterium* 属を含む Actinobacteria 門の存在量の劇的な増加が観察された。興味深いことに、無菌マウスに対して HBG食を与えてもこれらの変化は確認されなかった。また、大麦  $\beta$ -グルカンを HFD に直接混合した餌を与えたマウスにおいても、HBG食を与えたマウスと同様の腸管ホルモン分泌量、糞便中短鎖脂肪酸量および Actinobacteria 門の存在量の増加が確認された。これらの結果から、大麦  $\beta$ -グルカンは腸内細菌叢の組成を変化させ、腸内細菌代謝物である短鎖脂肪酸量を増加させることで、短鎖脂肪酸を介して分泌が促進される腸管ホルモンの作用を向上させ、宿主のエネルギー代謝に有益な効果を与えることが明らかとなった<sup>61)</sup>。

SPI やカードラン以外にも、摂取により腸内細菌叢を変化させ、宿主生体恒常性に有益な食品添加物として緑豆タンパク質 (mung bean protein isolate; MPI)による効果を明らかにしてきた。MPI は、春雨の原料となる緑豆デンプンの生産余剰物であり、その主成分である 8S グロブリンが大豆タンパク質 SPI の有する  $\beta$ -コングリシニンと高いアミノ酸相同性と構造類似性をもつことから、 $\beta$ -コングリシニンに代わる安価な新規機能性食材候補として大いに期待されている。実際に MPI の摂取は、齧歯類における脂肪肝抑制やヒトにおける糖代謝および脂質代謝の改善が報告されているものの<sup>82-84)</sup>、肥満抑制効果の詳細な作用機序は明らかとされていなかった。そこで、高脂肪食に含まれるカゼインを MPI に置換した HFD-MPI 食と HFD 食をマウスに与え、MPI による肥満抑制効果を検討した。その結果、MPI 負荷においても SPI 負荷同様に、HFD 負荷に伴う体重および白色脂肪組織重量の増加抑制、肝臓中の中性脂肪蓄積抑制効果、腸管ホルモン GLP-1 分泌増加が確認された。また、糞便中・盲腸中の二次胆汁酸量の有意な増加と BSH 活性を有する *Ruminococcaceae* 科の増加も観察された。さらに、無菌マウスではこれらの変化が消失したことから、MPI 負荷も SPI 負荷と同様に腸内細菌叢構成および腸内細菌代謝物(二次胆汁酸)組成を変化させることで、宿主のエネルギー代謝機能改善効果に寄与することが明らかとなった<sup>85)</sup>。

植物が自身の細胞生成や活性化に使用するフェノール類化合物の食事による摂取もまた、その健康効果が期待されている。コーヒーはフェノール類植物化合物を含む食品の中でも最も広く消費されている飲料の一つであり、習慣的な摂取が心臓病や脳卒中の予防、がんのリスク軽減、エネルギー代謝疾患の改善などの健康効果につながる可能性が示唆されている<sup>86,87)</sup>。コーヒーにはクロロゲン酸(chlorogenic acid; CGA)やカフェ酸(caffeic acid; CA)が非常に豊富に含まれているが、これらが O-methyltransferase により生合成された 4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid (HMCA)は抗酸化作用や抗炎症作用、抗がん作用、認知機能や神経変性の改善、骨のリモデリングの調節や耐糖能障害、脂質異常症や炎症の緩和など様々な生体恒常性維持に寄与することが明らかとなっているものの、詳細な分子機序は殆ど明らかにされていない<sup>88-92)</sup>。また、HMCA は腸内細菌叢による代謝を受けて 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) propionic acid (HMPA)に変換され、腸の抗炎症作用、抗酸化作用や神経保護作用を持つことが示されているものの、



HMPA がエネルギー代謝制御に影響を及ぼすかは明らかとされてこなかった<sup>94-96</sup>。そこで我々は、食事の中に含まれる HMCA と腸内細菌叢の相互関連に着目し、エネルギー代謝調節に及ぼす影響を検討した。その結果、HMCA は高脂肪食誘導性肥満モデルにおける体重増加抑制、脂肪肝の緩和やインスリン感受性の改善に寄与することが明らかとなった。また HMCA の摂取は、*Bacteroidetes* 門と *Actinobacteria* 門の増加や *Firmicutes* 門の減少といった腸内細菌叢組成の変化と盲腸内容物中における HMPA の増加を起こした。さらに、HMPA を直接摂取させた場合でも、HMCA 摂取で見られた高脂肪食誘導性肥満モデルにおける体重増加抑制、脂肪肝の緩和やインスリン感受性の緩和、腸内細菌叢の変化が確認された。以上より、HMCA や HMPA の摂取による腸内細菌叢の変化、特にエネルギー代謝制御や肝臓の脂質代謝への関与が示唆されている *Bacteroidales S24-7* 科や *Coriobacteriaceae* 科の増加が、HMCA 摂取による代謝機能改善に寄与する可能性が示唆された<sup>97</sup>。

また、食事の中に含まれる多価不飽和脂肪酸と腸内細菌叢の相互関連に着目し、宿主の脂肪酸受容体を介したエネルギー代謝調節に及ぼす影響の検討も行っている<sup>62</sup>。食事脂質中の主な構成脂肪酸の一つであるリノール酸は、一部の乳酸菌などの腸内細菌により、水酸化脂肪酸に代謝され 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (HYA) が産生される。実際に通常食摂取マウスと比較して、高脂肪食摂取マウスにおいては、盲腸中の乳酸菌の顕著な減少と HYA を含むいくつかの腸内細菌代謝由来脂肪酸の劇的な減少が確認された。また、高脂肪食にリノール酸を混合した餌をマウスに摂取させると脂肪組織炎症が観察されたのに対し、HYA を混合した餌をマウスに摂取させると脂肪組織炎症の誘発が観察されず、高脂肪食負荷による肥満症状の改善が確認された。さらに、HYA 産生能を有する乳酸菌である *Lactobacillus salivarius* を定着させたマウスでは盲腸中 HYA 産生量の増加と、高脂肪食誘導性の代謝異常に対する改善作用が観察されたことから、腸内細菌が食事の中に含まれる多価不飽和脂肪酸の代謝を制御し、産生された腸内細菌代謝物が宿主受容体を活性化させることで、高脂肪食により誘導される肥満に対する抵抗性に寄与することを明らかにした<sup>62</sup>。

近年肥満症や2型糖尿病などの臨床現場において注目を集めている低炭水化物食に代表されるようなケトン食や絶食もまた、腸内細菌叢の構成に影響を及ぼすことで宿主のエネルギー代謝制御に寄与している。マウスをケトン食負荷や 48 時間餌を与えない絶食などのケトジェニック環境下で飼育すると、*Bacteroidetes* 門の割合の減少や総菌数の減少などの腸内細菌叢変化が起こり、それに伴って腸管内短鎖脂肪酸量の減少が確認された。さらに、腸管内短鎖脂肪酸量が減少した結果、腸管における Lipoprotein lipase (LPL) 活性の抑制が観察された。一方で、全身においてはケトジェニック環境下であるために肝臓からのケトン体産生が劇的に増加し、LPL 活性の促進が確認された。以上より、腸管では脂質代謝・エネルギー利用を抑制し、全身では脂質代謝・エネルギー利用を亢進することで、飢餓状態などのグルコースを正常に利用できない環境における生存に有利な体質に変化させており、その作用機序の一部に腸内細菌叢が関連することを明らかにした<sup>98</sup>。

さらに、食事成分を摂取した個体の腸内細菌叢の変化による生体恒常性への影響のみならず、食事に

より変化した妊娠中の母体の腸内細菌叢が胎児の発達と出生後のエネルギー代謝疾患へ及ぼす影響に着目し各種検討を行った。その結果、妊娠中の母体が摂取した食物繊維が腸内細菌叢の発酵により短鎖脂肪酸を産生し、血液を介して母体腸内細菌叢由来の短鎖脂肪酸が胎児に届けられることで、胎児の代謝・内分泌系が正常に発達し、成長時のエネルギー代謝を整えることで、出生後に肥満になりくい体質を作ることを明らかとした<sup>79)</sup>。

このように、食事の種類や栄養環境の違いが腸内細菌叢の構成を直接的に制御しており、その結果、宿主の生体恒常性維持と密接に関与することが示されている。また、宿主と腸内細菌叢を繋ぐ実質的な分子実体である腸内細菌代謝物群が、宿主側の受容体を介して様々な生理機能を有することが明らかになり始め、腸内細菌叢構成と腸内細菌代謝物産生に大きく影響を及ぼす「食」の重要性が再認識されつつある。食事は我々が生命を維持するために重要なエネルギー源であると同時に、腸内細菌叢が宿主に有益な代謝を行うための腸内環境維持にも重要である。特に食事由来腸内細菌代謝物の研究においては、精製した代謝物そのものを投与する方法、代謝物の原料となる食事を投与する方法、あるいは代謝物を合成できる腸内細菌を直接投与することで生体内での効率的な代謝物産生を促す方法などが模索されており、新たな機能性食品の創出の可能性が期待される。また、これら代謝物が宿主の生体恒常性を維持するために重要な因子であることから、腸内環境の網羅的な解析が、我々の健康増進を手助けする新規な治療法の開発に繋がると期待される。

## 第5章 参考文献

- 1) Sung H, et al. Global patterns in excess body weight and the associated cancer burden. *CA Cancer J Clin.* 2019; 69: 88-112.
- 2) Ley RE, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006; 444: 1022-3.
- 3) Karlsson, FH, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature.* 2013; 498: 99-103.
- 4) Qin J, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* 2012; 490: 55-60.
- 5) David LA, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.* 2014; 505: 559-63.
- 6) De Filippis F, et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut.* 2016; 65: 1812-21.
- 7) Koeth RA, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med.* 2013; 19: 576-85.
- 8) Turnbaugh PJ, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006; 444: 1027-31.
- 9) Caesar R, et al. Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metab.* 2015; 22: 658-68.
- 10) Kishino S, et al. Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110: 17808-13.
- 11) Miyamoto J, et al. A Gut Microbial Metabolite of Linoleic Acid, 10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic Acid, Ameliorates Intestinal Epithelial Barrier Impairment Partially via GPR40-MEK-ERK Pathway. *J Biol Chem.* 2015; 290: 2902-18.
- 12) Kaikiri H, et al. Supplemental feeding of a gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, alleviates spontaneous atopic dermatitis and modulates intestinal microbiota in NC/nga mice. *Int J Food Sci Nutr.* 2017; 68: 941-51.
- 13) P Bergamo, et al. Immunomodulatory activity of a gut microbial metabolite of dietary linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, associated with improved antioxidant/detoxifying defences. *J Funct Foods.* 2014; 11: 192-202.
- 14) Goto T, et al. 10-oxo-12(Z)-octadecenoic acid, a linoleic acid metabolite produced by gut lactic acid bacteria, potently activates PPAR $\gamma$  and stimulates adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 459: 597-603.
- 15) Kim M, et al. 10-oxo-12(Z)-octadecenoic acid, a linoleic acid metabolite produced by gut lactic acid bacteria, enhances energy metabolism by activation of TRPV1. *FASEB J.* 2017; 31: 5036-48.
- 16) Furumoto H, et al. 10-Oxo-trans-11-octadecenoic acid generated from linoleic acid by a gut lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* is cytoprotective against oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016; 296: 1-9.
- 17) Mayo B, et al. Equol: A Bacterial Metabolite from The Daidzein Isoflavone and Its Presumed Beneficial Health Effects. *Nutrients.* 2019; 11: 2231.
- 18) Koh A, et al. Microbially Produced Imidazole Propionate Impairs Insulin Signaling through mTORC1. *Cell.*

2018; 175: 947-61.

19) Gopalakrishna KP, et al. Influence of Maternal Milk on the Neonatal Intestinal Microbiome. *Nutrients*. 2020; 12: 823.

20) Hegar B, et al. The Role of Two Human Milk Oligosaccharides, 2'-Fucosyllactose and Lacto-N-Neotetraose, in Infant Nutrition. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2019; 22: 330-40.

21) Walker WA, et al. Breast Milk, Microbiota, and Intestinal Immune Homeostasis. *Pediatr Res*. 2015; 77: 220-28.

22) Moossavi S, et al. Composition and Variation of the Human Milk Microbiota Are Influenced by Maternal and Early-Life Factors. *Cell Host Microbe*. 2019; 25: 324-35.

23) Wahlstrom A, et al. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metab*. 2016; 24: 41-50.

24) Ridlon JM, et al. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes*. 2016; 7: 22-39.

25) Begley M, et al. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev*. 2005; 29: 625-51.

26) Mouzaki M, et al. Bile Acids and Dysbiosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One*. 2016; 11: e0151829.

27) Puri P, et al. The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids. *Hepatology*. 2018; 67: 534-48.

28) Kuno T, et al. Reduction in hepatic secondary bile acids caused by short-term antibiotic-induced dysbiosis decreases mouse serum glucose and triglyceride levels. *Sci Rep*. 2018; 8: 1253.

29) Murakami Y, et al. High-fat Diet-induced Intestinal Hyperpermeability is Associated with Increased Bile Acids in the Large Intestine of Mice. *J Food Sci*. 2016; 81: H216-22.

30) McGlone ER, et al. ANNALS EXPRESS: Bile acids and the metabolic syndrome. *Ann Clin Biochem*. 2018; 19: 4563218817798.

31) Thomas C, et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab*. 2009; 10: 167.

32) Palau-Rodriguez M, et al. Metabolomic insights into the intricate gut microbial-host interaction in the development of obesity and type 2 diabetes. *Front Microbiol*. 2015; 6: 1151.

33) Fiorucci S, et al. Bile Acid-Activated Receptors, Intestinal Microbiota, and the Treatment of Metabolic Disorders. *Trends Mol Med*. 2015; 21: 702-14.

34) Molinaro A, et al. Role of Bile Acids in Metabolic Control. *Trends Endocrinol Metab*. 2018; 29: 31-41.

35) Vitek L, et al. The role of bile acids in metabolic regulation. *J Endocrinol*. 2016; 228: R85-96.

36) Kumar DP, et al. Activation of Transmembrane Bile Acid Receptor TGR5 Modulates Pancreatic Islet  $\alpha$  Cells to Promote Glucose Homeostasis. *J Biol Chem*. 2016; 291: 6626-40.

37) Trabelsi MS, et al. Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells. *Nat Commun*. 2015; 6: 7629.

38) Holst JJ. The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. *Physiol Rev*. 2007; 87: 1409-39.

39) Watanabe M, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation.

Nature. 2006; 439: 484-9.

- 40) Knip M, et al. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2016; 12: 154-67.
- 41) Koh A, et al. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*. 2016; 165: 1332-45.
- 42) Louis P, et al. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol*. 2014; 2: 661-72.
- 43) Kimura I, et al. Free fatty acid receptors in health and disease. *Physiol. Rev*. 2020; 100: 171-210.
- 44) Kawamata Y, et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem*. 2003; 278: 9435-40.
- 45) Samuel BS, 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.
- 46) Winzell MS, et al. G-protein-coupled receptors and islet function-implications for treatment of type 2 diabetes. *Pharmacol Ther*. 2007; 116: 37-448.
- 47) Kimura I, 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, 8030-5.
- 48) Tolhurst G, et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*. 2012; 61: 364.
- 49) Kimura I, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun*. 2013; 4: 1829.
- 50) Pluznick J. A novel SCFA receptor, the microbiota, and blood pressure regulation. *Gut Microbes*. 2014; 5: 202-7.
- 51) Nishida A, et al. Gut microbial short-chain fatty acids-mediated olfactory receptor 78 stimulation promotes anorexigenic gut hormone peptide YY secretion in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021; 557: 48-54.
- 52) Singh P, et al. Functional and Edible Uses of Soy Protein Products. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2008; 7: 14-28.
- 53) Hashidume T, et al. Single ingestion of soy beta-conglycinin induces increased postprandial circulating FGF21 levels exerting beneficial health effects. *Sci Rep*. 2016; 6: 28183.
- 54) Aoyama T, et al. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). *Nutrition*. 2000; 16: 349-54.
- 55) Deibert P, et al. Weight loss without losing muscle mass in pre-obese and obese subjects induced by a high-soy-protein diet. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004; 28: 1349-52.
- 56) Moriyama T, et al. Soybean beta-conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004; 68: 352-9.
- 57) Yamazaki T, et al. Dietary beta-conglycinin prevents fatty liver induced by a high-fat diet by a decrease in peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 protein. *J Nutr Biochem*. 2012; 23: 123-32.

- 58) Wanezaki S, et al. Soy beta-conglycinin improves obesity-induced metabolic abnormalities in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *Obes Res Clin Pract.* 2015; 9: 168-74.
- 59) Nagao K, et al. Soy Protein Isolate Suppresses Lipodystrophy-induced Hepatic Lipid Accumulation in Model Mice. *J Oleo Sci.* 2017; 66: 161-9.
- 60) Sayin SI, et al. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab.* 2013; 17: 225-35.
- 61) Miyamoto J, et al. Barley beta-glucan improves metabolic condition via short-chain fatty acids produced by gut microbial fermentation in high fat diet fed mice. *PLoS One.* 2018;13.
- 62) Miyamoto J, et al. Gut microbiota confers host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids. *Nat Commun.* 2019; 10: 4007.
- 63) Labbé A, et al. Bacterial bile metabolising gene abundance in Crohn's, ulcerative colitis and type 2 diabetes metagenomes. *PLoS One.* 2014; 9: e115175.
- 64) Ridlon JM, et al. Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol.* 2014; 30: 332-8.
- 65) Ridlon JM, et al. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res.* 2006; 47: 241-59.
- 66) Zhu F, et al. Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: characteristics, physicochemical and biological activities. *J Food Compos Anal.* 2015; 41: 165-73.
- 67) Maheshwari G, et al. Extraction and isolation of  $\beta$ -glucan from grain sources-A review. *J Food Sci.* 2017; 82: 1535-45.
- 68) Novak M, et al. Beta-glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *J Immunotoxicol.* 2008; 5: 47-57.
- 69) Spicer EJ, et al. A toxicological assessment of curdlan. *Food Chem Toxicol.* 1999; 37:455-79.
- 70) Shimizu J, et al. Dietary curdlan suppresses dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci formation in Sprague-Dawley rat. *Nutr Res.* 2002; 22: 867-77.
- 71) Aizawa M, et al. Low molecular-weight curdlan, (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucan suppresses TLR2-induced RANKL-dependent bone resorption. *Biol Pharm Bull.* 2018; 41: 1282-5.
- 72) Xiao J, et al. Gut function-enhancing properties and metabolic effects of dietary indigestible sugars in rodents and rabbits. *Nutrients.* 2015; 10: 8348-65.
- 73) Org E, et al. Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort. *Genome Biol.* 2017;18: 70.
- 74) Smith BJ, et al. Changes in the gut microbiome and fermentation products concurrent with enhanced longevity in acarbose-treated mice. *BMC Microbiol.* 2019; 19: 130.
- 75) Donohoe DR, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab.* 2011; 13 :517-26.
- 76) De Silva A, et al. The gut hormones PYY 3-36 and GLP-1 7-36 amide reduce food intake and modulate brain activity in appetite centers in humans. *Cell Metab.* 2011; 14: 700-6.

- 77) Singh J, et al. Review on bile acids: effects of the gut microbiome, interactions with dietary fiber, and alterations in the bioaccessibility of bioactive compounds. *J Agric Food Chem*. 2019; 67: 9124-38.
- 78) Casiraghi MC, et al. Post-prandial responses to cereal products enriched with barley beta-glucan. *J Am Coll Nutr*. 2006; 25: 313-20.
- 79) Kimura I, et al. Maternal Gut Microbiota in Pregnancy Influences Offspring Metabolic Phenotype in Mice. *Science*. 2020; 367: eaaw8429.
- 80) Poppitt SD, et al. Supplementation of a high-carbohydrate breakfast with barley beta-glucan improves postprandial glycaemic response for meals but not beverages. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2007; 16: 16-24.
- 81) Nilsson AC, et al. Increased gut hormones and insulin sensitivity index following a 3-d intervention with a barley kernel-based product: a randomized cross-over study in healthy middle-aged subjects. *Br J Nutr*. 2015; 114: 899-907.
- 82) Watanabe H, et al. Dietary mung bean protein reduces hepatic steatosis, fibrosis, and inflammation in male mice with diet-induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Nutr*. 2017; 147: 52-60.
- 83) Kohno M, et al. Improvement of glucose metabolism via mung bean protein consumption: a clinical trial of GLUCODIA™ isolated mung bean protein in Japan. *Functional Foods in Health and Disease*. 2017; 7: 115-34.
- 84) Kohno M, et al. Improvement of glucose and lipid metabolism via mung bean protein consumption: clinical trials of GLUCODIA™ isolated mung bean protein in the USA and Canada. *J Nutr Sci*. 2018; 7: e2.
- 85) Nakatani A, et al. Dietary mung bean protein reduces high-fat diet-induced weight gain by modulating host bile acid metabolism in a gut microbiota-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 2; 501: 955-61.
- 86) Redeuil K, et al. Identification of novel circulating coffee metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2011; 1218: 4678-88.
- 87) Nieber K. The impact of coffee on health. *Planta Med*. 2017; 83: 1256-63.
- 88) Zubieta C, et al. Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-Omethyltransferase. *Plant Cell*. 2002; 14: 1265-77.
- 89) Chowdhury S, et al. Ferulic acid protects hyperglycemia-induced kidney damage by regulating oxidative insult, inflammation and autophagy. *Front Pharmacol*. 2019; 10: 27.
- 90) Choi YE, et al. Ferulic acid in combination with PARP inhibitor sensitizes breast cancer cells as chemotherapeutic strategy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 458: 520-24.
- 91) Mori T, et al. Combination therapy with octyl gallate and ferulic acid improves cognition and neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 2017; 292: 11310-25.
- 92) Sassa S, et al. Preventive effect of ferulic acid on bone loss in ovariectomized rats. *In Vivo*. 2003; 17: 277-80.
- 93) Salazar-López NJ, et al. Ferulic acid on glucose dysregulation, dyslipidemia, and inflammation in diet-induced obese rats: An integrated study. *Nutrients*. 2017; 9: 675.
- 94) Renouf M, et al. Plasma appearance and correlation between coffee and green tea metabolites in human subjects. *Br J Nutr*. 2010; 104: 1635-40.
- 95) Larrosa M, et al. Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Mol Nutr Food Res*. 2009; 53: 1044-54.

- 96) Verzelloni E, et al. Antiglycative and neuroprotective activity of colon-derived polyphenol catabolites. *Mol Nutr Food Res.* 2011; 55: S35-43.
- 97) Ohue-Kitano R, et al. 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic Acid Produced from 4-Hydroxy-3-methoxycinnamic Acid by Gut Microbiota Improves Host Metabolic Condition in Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients.* 2019; 11: 1036.
- 98) Miyamoto J, et al. Ketone body receptor GPR43 regulates lipid metabolism under ketogenic conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019; 116: 23813-21.



## 第 6 章 学位論文要旨

食事は生物の栄養状態や代謝機能に影響を与える最も重要な因子である。一方、過剰な食物摂取によるエネルギー恒常性の破綻は肥満症や 2 型糖尿病に代表される生活習慣病の発症に寄与することも知られている。そのような中、近年の腸内細菌解析技術の発展に伴い、これらエネルギー代謝疾患の直接的な原因の一つが、腸内細菌叢の破綻とそれに伴う腸内細菌代謝物の変化であることが科学的根拠に基づいて明らかとされつつある。さらに、食事由来の成分が腸内細菌叢の構成と腸内細菌代謝物量を変化させることで、宿主の生体恒常性維持に寄与することが様々な研究報告から明らかとなりつつある。このように、近年の健康志向の高まりによって食の重要性が再認識されたことで、代謝性疾患に対する予防効果が期待される食事成分の研究が活発に行われている。

大豆タンパク質や食物繊維に代表される難消化性多糖類は、健康効果が報告されている食事成分の一つである。大豆タンパク質の主要成分である  $\beta$ -コングリシニンや細菌由来の難消化性多糖類であるカードランもまた、抗肥満効果や免疫改善効果など生体恒常性維持に寄与することが報告されているものの、これら食事成分のエネルギー代謝制御機構の全容は未だ解明されていない。そこで、本研究では、食事成分による腸内環境(腸内細菌組成・腸内細菌代謝物)への影響に着目し、これらの食事成分摂取による代謝機能改善に至る作用機序を明らかにすることを目的とした。

第 2 章では、実験マウスに、高脂肪食中のカゼインを大豆タンパク質の精製物である分離大豆タンパク質(soy protein isolate; SPI) に置換した飼料を負荷し、SPI の摂取による腸内環境変化の食事誘導性肥満に対する影響を評価した。結果、SPI 摂取により、高脂肪食負荷に伴う体重増加・脂肪蓄積が有意に抑制されることが確かめられた。このとき、食餌成分の違いが二次胆汁酸合成菌の増加をはじめとした腸内細菌叢変化を引き起こし、その結果、腸管内において腸内細菌代謝物である二次胆汁酸の量を有意に増加させることが明らかとなった。また、二次胆汁酸の増加に伴うインクレチンの分泌増加が観察された。一方、腸内細菌叢を有さない無菌マウスに対して同様の実験を行った結果、これらの代謝機能の改善効果が消失することが示された。以上の結果より、大豆タンパク質の宿主代謝機能改善効果に腸内細菌叢およびその代謝物が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

第 3 章では、実験マウスに、微生物によって合成される難消化性多糖類の内、その糖の結合様式から  $\beta$ -グルカンに分類されるカードランを 10%(w/w)で混合した高脂肪食飼料を負荷し、カードラン摂取による腸内環境変化が食事誘導性肥満に与える影響を評価した。結果、カードラン摂取により、高脂肪食負荷に伴う血糖値と血漿総コレステロール値の増加が有意に抑制されることが確かめられた。このとき、腸管内では、短鎖脂肪酸産生菌や二次胆汁酸合成菌の増加といった腸内細菌叢変化と、それに伴う、腸内細菌代謝物である短鎖脂肪酸および二次胆汁酸の量の有意な増加が観察された。また、カードラン負荷によりインスリンおよびインクレチン分泌の上昇が観察された。以上の結果より、カードランによる宿主代謝機能改善効果が、腸内環境の変化によるインクレチン分泌促進の結果である可能性が示唆された。

以上のように、摂取した食事成分の種類の違いが腸内細菌叢の構成を直接的に制御し、短鎖脂肪酸や二次胆汁酸をはじめとした腸内細菌代謝物の産生量を変化させることで、宿主の生体恒常性維持に密接に寄与することが示された。特に本研究で扱った SPI やカードランは保湿剤や増粘剤として加工食品への食品添加物として利用されている食事成分であるため、これら食事成分の腸内細菌代謝物を基軸とした生体調整作用機序の全容を明らかにしていくことは、糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病を予防するための機能性食品や特定保健用食品の開発や新たな食事療法の提案に貢献するものと考えられる。

## 第7章 業績集

### 既発表論文目録

学位論文を構成する論文・著書(学位論文審査要件を満たすもの)

**Keita Watanabe**, Miki Igarashi, Xuan Li, Akiho Nakatani, Junki Miyamoto, Yuka Inaba, Asuka Sutou, Tsutomu Saito, Takumi Sato, Nobuhiko Tachibana, Hiroshi Inoue, Ikuo Kimura. "Dietary soybean protein ameliorates high-fat diet-induced obesity by modifying the gut microbiota-dependent biotransformation of bile acids." *PLoS One*. 13, e0202083 (2018). (査読有り)

学位論文を構成する論文・著書(学位論文審査要件を満たさないもの)

**Keita Watanabe**, Mayu Yamano, Yuki Masujima, Ryuji Ohue-Kitano, Ikuo Kimura. "Curdlan intake changes gut microbial composition, short-chain fatty acid production, and bile acid transformation in mice." *Biochem Biophys Rep*. 27, 101095 (2021). (査読有り)

### その他の論文・著書

Ikuo Kimura, Junki Miyamoto, Ryuji Ohue-Kitano, **Keita Watanabe**, Takahiro Yamada, Masayoshi Onuki, Ryo Aoki, Yosuke Isobe, Daiji Kashihara, Daisuke Inoue, Akihiko Inaba, Yuta Takamura, Satsuki Taira, Shunsuke Kumaki, Masaki Watanabe, Masato Ito, Fumiyuki Nakagawa, Junichiro Irie, Hiroki Kakuta, Masakazu Shinohara, Ken Iwatsuki, Gozoh Tsujimoto, Hiroaki Ohno, Makoto Arita, Hiroshi Itoh, Koji Hase. "Maternal gut microbiota in pregnancy influences offspring metabolic phenotype in mice." *Science*. 367, eaaw8429 (2020). (査読有り)

Junki Miyamoto, Ryuji Ohue-Kitano, Hiromi Mukoyama, Akari Nishida, **Keita Watanabe**, Miki Igarashi, Junichiro Irie, Gozoh Tsujimoto, Noriko Satoh-Asahara, Hiroshi Itoh, Ikuo Kimura. "Ketone body receptor GPR43 regulates lipid metabolism under ketogenic condition." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 116, 23813-23821 (2019). (査読有り)

Junki Miyamoto, Miki Igarashi, **Keita Watanabe**, Shin-ichiro Karaki, Hiromi Mukoyama, Shigenobu Kishino, Xuan Li, Atsuhiko Ichimura, Junichiro Irie, Yukihiko Sugimoto, Tetsuya Mizutani, Tatsuya Sugawara, Takashi Miki, Jun Ogawa, Daniel J. Drucker, Makoto Arita, Hiroshi Itoh, Ikuo Kimura. "Gut microbiota confers host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids." *Nature Commun*. 10, 4007 (2019). (査読有り)

Ryuji Ohue-Kitano, Satsuki Taira, **Keita Watanabe**, Yuki Masujima, Toru Kuboshima, Junki Miyamoto, Yosuke Nishitani, Hideaki Kawakami, Hiroshige Kuwahara, Ikuo Kimura. "3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic Acid Produced from 4-Hydroxy-3-methoxycinnamic Acid by Gut Microbiota Improves Host Metabolic Condition in Diet-Induced Obese Mice." *Nutrients*. 11, E1038 (2019). (査読有り)

Akiho Nakatani, Xuan Li, Junki Miyamoto, Miki Igarashi, Hitoshi Watanabe, Asuka Sutou, **Keita Watanabe**, Takayasu Motoyama, Nobuhiko Tachibana, Mitsutaka Kohno, Hiroshi Inoue, Ikuo Kimura. "Dietary mung bean protein reduces high-fat diet-induced weight gain by modulating host bile acid metabolism in a gut microbiota-dependent manner" *Biochem Biophys Res Commun.* 501, 955-961 (2018). (査読有り)

Junki Miyamoto#, **Keita Watanabe**#, Satsuki Taira, Mayu Kasubuchi, Xuan Li, Junichiro Irie, Hiroshi Itoh, Ikuo Kimura. "Barley b-glucan improves metabolic condition via short-chain fatty acids produced by gut microbial fermentation." *PLoS One.* e0196579 (2018). (査読有り) # equally first author

Xuan Li, **Keita Watanabe**, Ikuo Kimura. "Gut Microbial Dysbiosis Drives and Implies Novel Therapeutic Strategies for Diabetes Mellitus and Related Metabolic Diseases." *Front Immunol.* 10, 3389 (2017). (査読有り)

Mayu Kasubuchi#, **Keita Watanabe**#, Kanako Hirano,# Daisuke Inoue, Xuan Li, Kazuya Terasawa, Morichika Konishi, Nobuyuki Itoh, and Ikuo Kimura. "Membrane progesterone receptor beta (mPRb/Paqr8) promotes progesterone-dependent neurite outgrowth in PC12 neuronal cells via non-G protein-coupled receptor (GPCR) signaling." *Sci Rep.* 7, 5168 (2017). (査読有り) # equally first author

**渡辺啓太**、西田朱里、宮本潤基、木村郁夫. "妊娠中の食物繊維摂取と胎児の代謝" 糖尿病学 2021. p17-25 (2021).

宮本潤基、**渡辺啓太**、木村郁夫. "食と腸内細菌による宿主の代謝制御" 生化学. 93 巻 1 号 p52-58 (2021).

**渡辺啓太**、宮本潤基、長谷耕二、木村郁夫. "胎児期・乳児期の腸内細菌叢の長期的影響" 医学のあゆみ 特集号 Vol.275 No.9, p952-956 (2020).

宮本潤基、**渡辺啓太**、木村郁夫. "腸内細菌とDOHaD 学説" *Pharma Medica* Vol.38 No.12, p37-40 (2020).

**渡辺啓太**、向山広美、宮本潤基、木村郁夫. "食由来栄養シグナルと腸内環境を介した宿主エネルギー代謝制御" 糖尿病・内分泌代謝科 Vol.51 No.1, p1-7 (2020).

**渡辺啓太**、向山広美、宮本潤基、木村郁夫 "ケトン体生成を促す食事療法による体脂肪減少メカニズム" *バイオサイエンスとインダストリー (B&I)* Vol.78, No.3, p196-201 (2020).

平さつき、**渡辺啓太**、大植隆司、木村郁夫. "食物繊維由来腸内細菌代謝物、短鎖脂肪酸と宿主代謝制御" *ルミナコイド研究* Vol.22, No.2, p53-62 (2018).

渡辺啓太、宮本潤基、木村郁夫. "肥満と腸内細菌叢" *Modern Physician*, Vol.38, No.2, p158-161 (2018)

渡辺啓太、平さつき、木村郁夫. "短鎖脂肪酸の産生・代謝と生理機能" *食と医療*, 2018 WINTER-SPRING Vol.4, p30-37 (2018)

宮本潤基、渡辺啓太、木村郁夫. "腸内細菌による脂肪酸代謝と宿主への影響" *BIO Clinica*, Vol.32, No.14, p19-23 (2017)

宮本潤基、渡辺啓太、木村郁夫. "代謝制御における食物繊維・短鎖脂肪酸の関与" *内分泌・糖尿病・代謝内科* Vol.45, No.1, p7-13 (2017)

発表

○渡辺啓太、山野真由、大植隆司、加藤裕教、木村郁夫 “細胞膜上プロゲステロン受容体を介した代謝機能制御” 生理学研究所研究会 運動器／代謝系連関による生体機能制御とその変容の仕組み WEB 2021年12月(口頭)(査読なし)

○渡辺啓太、大植隆司、木村郁夫 “細胞膜上性ステロイドホルモン受容体 mPR $\epsilon$  を介した代謝機能制御”第93回日本薬理学会年会 神奈川 2020年3月(ポスター発表)(査読なし)

○渡辺啓太、大植隆司、木村郁夫 “細胞膜上性ステロイドホルモン受容体 mPR $\epsilon$  を介した代謝機能制御”第93回日本薬理学会年会 神奈川 2020年3月(口頭)(査読なし)

○渡辺啓太、劉瑩、大植隆司、木村郁夫 “細胞膜上性ステロイドホルモン受容体 mPR $\epsilon$  を介した代謝機能制御”日本農芸化学会 2020年度大会 福岡 2020年3月(口頭)(査読なし)

○渡辺啓太、大植隆司、井上大輔、木村郁夫 “新規細胞膜上性ステロイドホルモン受容体の機能解析”第37回内分泌代謝学サマーセミナー 下呂 2019年7月(ポスター発表)(査読なし)

○大植隆司、渡辺啓太、木村郁夫 “細胞膜上性ステロイドホルモン受容体を介した代謝機能制御”生理学研究所研究会 運動器／代謝系連関による生体機能制御とその変容の仕組み 岡崎 2018年9月(口頭)(査読なし)

○渡辺啓太、宮本潤基、平さつき、木村郁夫 “大麦  $\beta$ -グルカン由来腸内細菌代謝物による代謝改善効果の解明” 第36回内分泌代謝学サマーセミナー 宮城蔵王 2018年8月2(ポスター発表)(査読なし)

○渡辺啓太、粕渕真由、井上大輔、木村郁夫 “新規細胞膜上性ステロイドホルモン受容体の脂肪組織における機能解析” 第14回GPCR研究会 東京 2017年5月 (ポスター発表)(査読なし)

○宮本潤基、粕渕真由、渡辺啓太、平野加奈子、井上大輔、寺澤和哉、小西守周、伊藤信行、木村郁夫、“新規細胞膜上プロゲステロン受容体 mPR $\beta$  による神経機能への影響” 第14回GPCR研究会 東京 2017年5月 (ポスター発表)(査読なし)

粕渕真由、渡辺啓太、宮本潤基、中島啓、國澤純、○ 木村郁夫。”中鎖脂肪酸・ケトン食による代謝機能改善メカニズムの分子レベルでの解明” 日本農芸化学会 2017 年度大会 京都 2017 年 3 月(口頭)(査読なし)

○Keita Watanabe, Junki Miyamoto, Ikuo Kimura. “Barley b-glucan improves metabolic condition via short-chain fatty acids produced by gut microbial fermentation.” 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) 2018 年 7 月 (ポスター発表)(査読なし)

## 第 8 章 謝辞

本研究を行うにあたり、研究の場を与えてくださり多大なるご指導と適切なお助言を賜りました、京都大学大学院生命科学研究科生体システム学分野 教授(東京農工大学 大学院農学研究院 代謝機能制御学研究室 特任教授) 木村郁夫先生に深く御礼申し上げます。

並びに、博士課程 2 年次後期より、指導教官として懇切丁寧にご指導いただきました、東京農工大学農学研究院応用生命化学部門 教授 西河淳先生に心より感謝申し上げます。

また、研究協力を賜りました、東京農工大学農学研究院応用生命化学部門 テニユアトラック准教授 宮本潤基先生、金沢大学新学術創成研究機構革新的統合バイオ研究コア栄養・代謝研究ユニット 教授 井上啓先生、准教授 稲葉有香先生、不二製油グループ本社株式会社 齋藤努様、橘伸彦様、佐藤匠様に厚く御礼申し上げます。

そして、日常、有益な議論をはじめ、公私共に数々の面で大変お世話になりました京都大学大学院生命科学研究科生体システム学分野 准教授 加藤裕教先生、助教 大植隆司先生に心より感謝いたします。

最後に、東京農工大学応用生命科学専攻の先生方、同期の皆様、東京農工大学代謝機能制御学研究室の皆様、京都大学生体システム学分野の皆様、家族、友人に、充実した 3 年間の研究生生活を送らせていただいたこと、心より感謝いたします。