

## 腸内細菌叢の変化が糖代謝に与える影響について

藤坂 志帆

富山大学附属病院 第一内科

### 要旨

近年、メタ16S解析やメタゲノム解析の確立により腸内細菌叢の研究が飛躍的に進展した。その結果、炎症性腸疾患や自己免疫疾患、アレルギー性疾患、悪性腫瘍など多くの疾患が腸内細菌叢の破綻と関係することが明らかとなってきた。さらに最近では肥満や糖尿病などの代謝疾患も腸内細菌叢の変化と関連があることが示されている<sup>1-3</sup>。私は遺伝的、環境的背景が異なる3種類のマウスを用い、腸内細菌叢の変化が代謝に与える影響についての研究を行った。

Jackson Labより購入したC57B6Jマウス(B6J)は高脂肪食投与により肥満しインスリン抵抗性になるが、129マウス(129J)は肥満しにくくインスリン感受性は良い<sup>4</sup>。一方Taconic Farmより購入した129マウス(129T)は、インスリン感受性は良いがB6Jと同様に肥満しやすい。この129Tと129Jの表現型の違いは異なる飼育環境で獲得した腸内細菌組成の相違で説明される<sup>5</sup>(業績論文6)。これら3系統のマウスの腸内細菌組成を生後6週齢より抗生剤(プラセボ、バンコマイシン、またはメトロダゾール)で変化させ、その後9週間高脂肪食負荷を行い糖代謝に与える影響を解析した。その結果、B6Jでのみ肝、脂肪、大腸粘膜固有層および血中の炎症マーカーが低下し、それに伴い肝、脂肪、骨格筋のインスリンシグナルが回復し糖代謝の改善が見られた。血清網羅的メタボローム解析では、炎症性のデオキシコール酸が抗生剤投与により減少し、高脂肪食投与で減少した胆汁酸受容体TGR5レベルが肝で回復した。これらの表現型は無菌マウスへの腸内細菌移植によっても再現されたことから抗生剤による腸内細菌叢の変化によりもたらされたものと考えられる。また、TGR5作動薬を投与するとB6Jでのみ抗炎症効果を認めた。このことから抗生剤投与による腸内細菌叢の変化は、炎症性の腸内細菌由来二次胆汁酸の減少と、その結果起こる抗炎症作用のある肝のTGR5レベルの回復によって肥満による慢性炎症を抑制して耐糖能を改善させることが明らかとなった。一方で、この腸内細菌による代謝改善効果は、高脂肪食投与しても炎症が惹起されにくい遺伝的背景を持つ129T、129Jでは認められなかったことから、腸内細菌叢の変化による代謝への影響には宿主の遺伝的背景も重要であると考えられた。

### 内容

ジャクソン社から購入したB6Jマウスは高脂肪食投与下で肥満しやすく、その結果慢性炎症が惹起され、耐糖能異常を呈しやすい。一方で129Jマウスは肥満しにくく耐糖能は良い。さらに129Jと同じ遺伝的背景を持ちながら、タコニック社で購入した129TマウスはB6J並みに肥満し

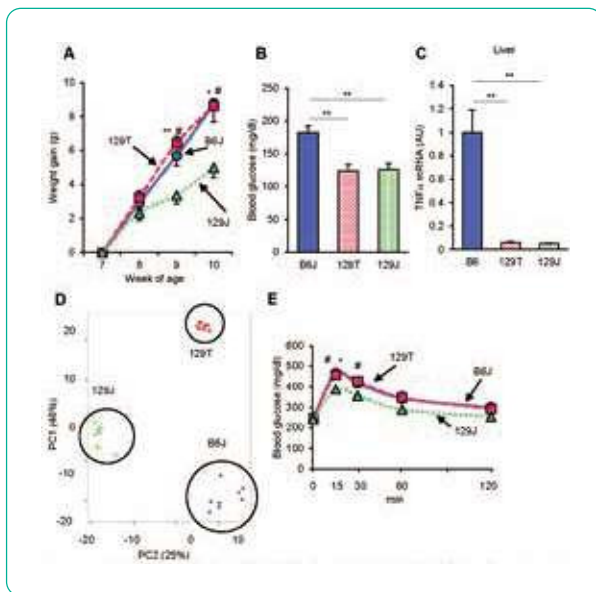


Figure1 (A) 高脂肪食負荷時の体重増加、(B) 血糖値、(C) 肝炎症マーカー (TNF $\alpha$ ) 発現量、(D) 糞便 16SrRNA シークエンス解析による腸内細菌組成の違い、(E) 高脂肪食負荷無菌 B6 マウスへの腸内細菌移植後経口糖負荷試験  
B6J:C57BL6J(Jackson)、129T:129S1(Jackson)、129J:129S6(Taconic) n=4-10 \*P<0.05, \*\*P<0.01

やすいが、肥満しても慢性炎症が惹起されずに耐糖能は良好である (Fig.1A-C)。これら3種類のマウスは全く異なる腸内細菌組成を持つ (Fig.1D)。そして129Tと129Jの太り易さの違いはそれぞれの腸内細菌組成の違いによって説明される<sup>5</sup>。さらにこれらのマウスの腸内細菌を無菌 B6 マウスに移植すると肥満体質の B6J、129T の腸内細菌を移植されたマウスは糖負荷試験で耐糖能異常を呈するようになる (Fig.1E)。これらのことから、腸内細菌叢は個体の太りやすさを決める重要な因子である一方で、その結果耐糖能異常を呈するかどうかは宿主側の遺伝的素因も重要であり、腸内細菌と宿主を介した糖代謝制御の複雑な関係が示唆された。

さらに腸内細菌叢と糖代謝との相関関係を明らかにすることを目的に、抗生剤を用いて腸内細菌叢を変化させた。B6J、129T、129J をそれぞれ3群に分け、生後6週齢よりプラセボ、バンコマイシン (グラム陽性球菌に特異的)、またはメトロニダゾール (嫌気性菌に特異的) を飲水投与しつつ、生後7週齢より約9週間高脂肪食処置した。糞便の16SrRNA シークエンス解析では抗生剤により腸内細菌叢は大きく変化していることがわかった (Fig. 2)。

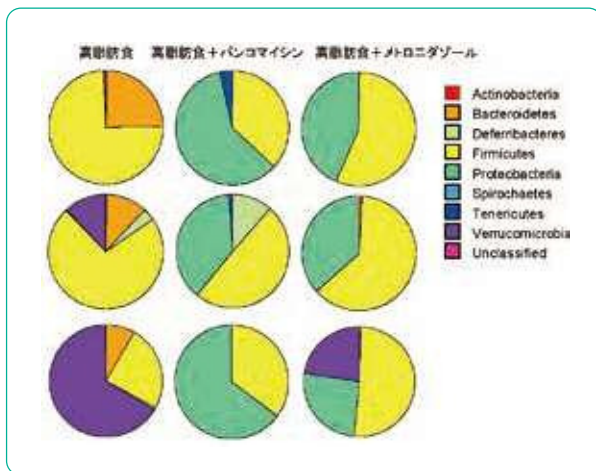


Figure2 糞便 16SrRNA シークエンス解析による腸内細菌組成の違い

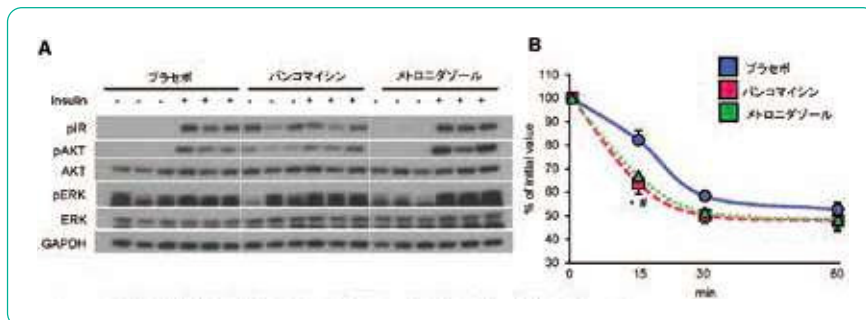


Figure3 肝臓におけるインスリンシグナル、(B) インスリン負荷試験 n=16  
\*P<0.05 プラセボ vs バンコマイシン、#P<0.05 プラセボ vs メトロニダゾール

体重には変化がなかったが、もともと高脂肪食負荷により耐糖能異常を呈しやすいB6Jにおいてのみ両抗生剤で肝、脂肪、骨格筋におけるインスリンシグナルの改善とインスリン感受性の改善を認めた(Fig.3A, B)。B6Jでみられた抗生剤投与によるインスリン抵抗性の改善は、高脂肪食負荷による慢性炎症の改善によって説明された。この慢性炎症の改善は全身で確認された(Fig.4)が、最も早期には肝臓で認められた。肝臓は腸内細菌由来の代謝産物が直接流入する臓器であることから抗生剤投与による慢性炎症改善のメカニズムを明らかにするためマウス血清のメタボローム解析を行った。その結果、二次胆汁酸であるデオキシコール酸がすべてのマウス系統において抗生剤投与により激減していた(Fig. 5A)。デオキシコール酸は腸内細菌の代謝産物であり、炎症促進用を持つ。これが減少することによりB6Jの炎症が改善すると考えられた。さらに肝臓におけるデオキシコール酸の受容体TGR5蛋白量は高脂肪食負荷により減少するが、これが抗生剤投与により回復した(Fig.5B)。TGR5作動薬を投与するとB6Jにおいてのみ抗炎症効果が発揮された(Fig.5C)。

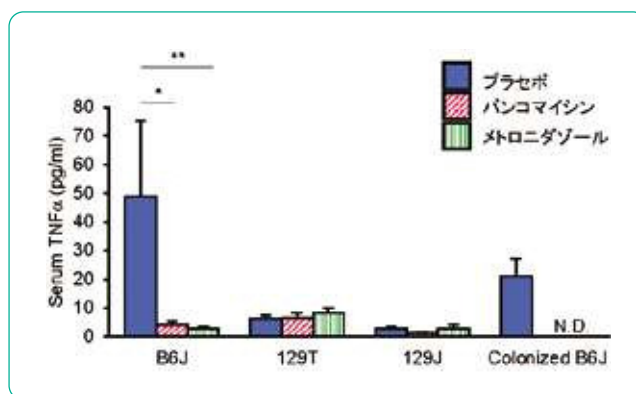


Figure4 血清 TNF $\alpha$  濃度 n=8 \*P<0.05, \*\*P<0.01

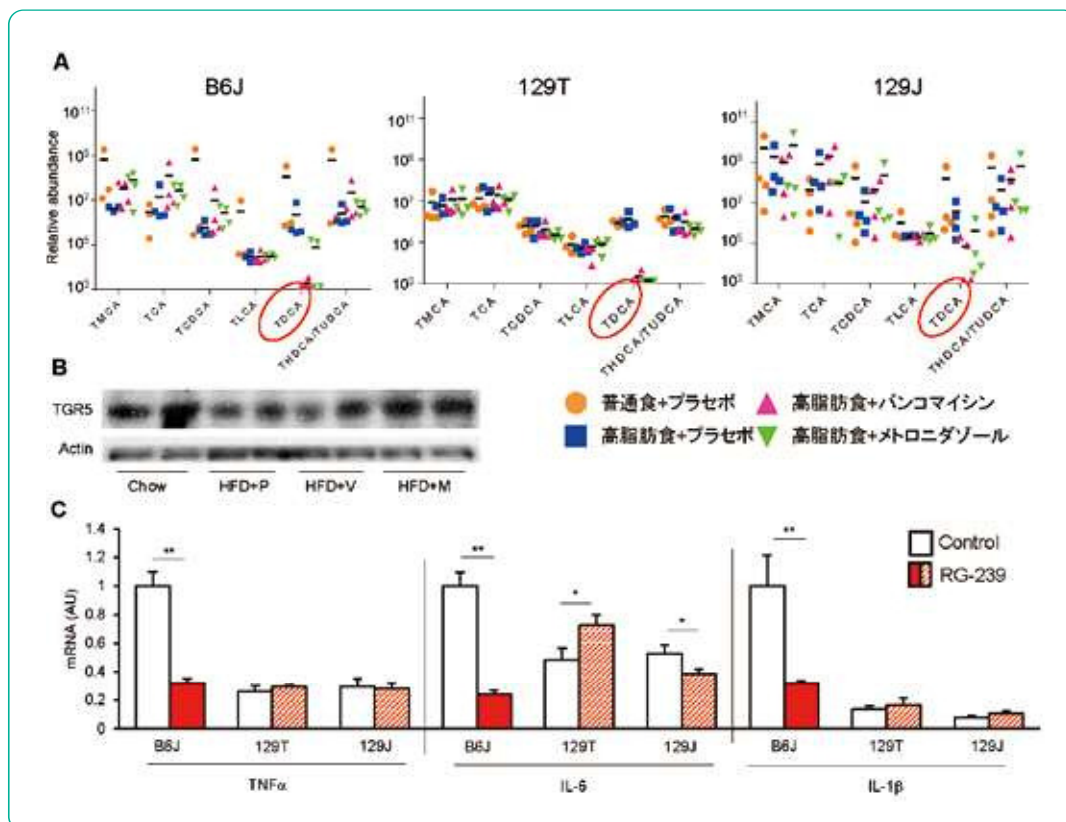


Figure5 (A)血清メタボローム解析による胆汁酸組成 n=4 (B)肝臓TGR5タンパク量 (C)TGR5作動薬(RG-239)投与またはコントロールマウスの肝臓における炎症性サイトカイン遺伝子発現量 n=3-5 \*P<0.05, \*\*P<0.01

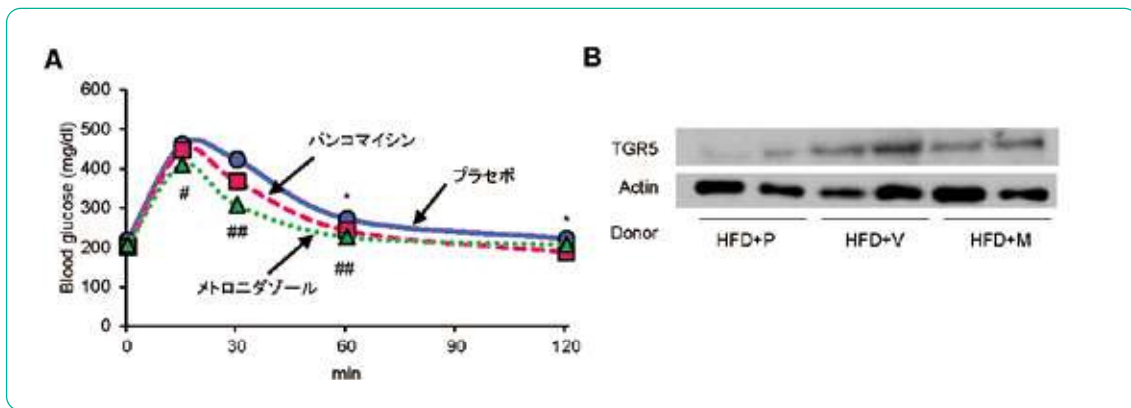


Figure6 (A) 高脂肪食負荷無菌B6マウスへの腸内細菌移植後経口糖負荷試験 n=7-9

(B) 移植後マウスの肝臓TGR5蛋白レベル

\* $P < 0.05$  プラセボ vs バンコマイシン、# $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  プラセボ vs メトロニダゾール

さらに抗生剤投与による炎症抑制効果と耐糖能改善、肝臓のTGR5蛋白レベルの回復は、抗生剤投与マウスの腸内細菌を高脂肪食投与無菌B6マウスに移植することによっても再現された (Fig. 4のColonized B6J および6A, B)。これらのことから、抗生剤により変化した腸内細菌が、炎症性の二次胆汁酸の産生を抑え、抗炎症作用のある胆汁酸受容体TGR5蛋白レベルを回復させることによりB6Jの慢性炎症を抑制して耐糖能を改善させたと考えられた。しかしこれらの効果は遺伝的に低炎症の129マウスでは発揮されなかったことから腸内細菌代謝産物と糖代謝において宿主の遺伝素因も重要であることが明らかとなった。

## 参考文献

1. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013;500(7464):541-6.
2. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, and Gordon JL. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-31.
3. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, Griffin NW, Lombard V, Henrissat B, Bain JR, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 2013;341(6150):1241214.
4. Almind, K., and Kahn, C.R. Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes*. 2004;53: 3274-3285.
5. Ussar S, Griffin NW, Bezy O, Fujisaka S, Vienberg S, Softic S, Deng L, Bry L, Gordon JL, and Kahn CR. Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metab*. 2015;22(3):516-30.

## 発表業績一覧

### 論文

1. Ussar S, Haering MF, **Fujisaka S**, Lutter D, Lee KY, Li N, Gerber GK, Bry L, Kahn CR. Regulation of Glucose Uptake and Enteroendocrine Function by the Intestinal Epithelial Insulin Receptor. *Diabetes*. 2017 Jan 17. pii: db151349. doi: 10.2337/db15-1349. [Epub ahead of print]
2. Sakaguchi M, **Fujisaka S**, Cai W, Winnay JN, Konishi M, O'Neill BT, Li M, García-Martín R, Takahashi H, Hu J, Kulkarni RN, Kahn CR. Adipocyte Dynamics and Reversible Metabolic Syndrome in Mice with an Inducible Adipocyte-Specific Deletion of the Insulin Receptor. *Cell Metab*. 2017 Jan 4. pii: S1550-4131(16)30641-6. doi: 10.1016/j.cmet.2016.12.008. [Epub ahead of print]
3. **Fujisaka S**, Ussar S, Clish C, Devkota S, Dreyfuss JM, Sakaguchi M, Soto M, Konishi M, Softic S, Altindis E, Li N, Gerber G, Bry L, Kahn CR. Antibiotic effects on gut microbiota and metabolism are host dependent. *J Clin Invest*. 2016 Dec 1;126(12):4430-4443.
4. Ussar S, **Fujisaka S**, Kahn CR. Interactions between host genetics and gut microbiome in diabetes and metabolic syndrome. *Mol Metab*. 2016 Jul 18;5(9):795-803. doi: 10.1016/j.molmet.2016.07.004. Review.
5. Softic S, Boucher J, Solheim MH, **Fujisaka S**, Haering MF, Homan EP, Winnay J, Perez-Atayde AR, Kahn CR. Lipodystrophy Due to Adipose Tissue-Specific Insulin Receptor Knockout Results in Progressive NAFLD. *Diabetes*. 2016 Aug;65(8):2187-200. doi: 10.2337/db16-0213.
6. Ussar S, Griffin NW, Bezy O, **Fujisaka S**, Vienberg S, Softic S, Deng L, Bry L, Gordon JI, Kahn CR. Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metab*. 2015 Sep 1;22(3):516-30. doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.007.

### 学会発表

1. **Fujisaka S**, Clish C, Dreyfuss JM, Soto M, Bry L, Devkota S, Kahn CR. Antibiotic Effects on Gut Microbiota, Insulin Signaling and Bile Acid Metabolism are Dependent on Host Genetic Background. 2016 Keystone Symposia on Gut Microbiota, Metabolic Disorders and Beyond; Apr 17-21; Rhode Island.

2. **Fujisaka S**, Dreyfuss JM, Clish C, Pacheco JA, Kostic A, Bry L, Kahn CR. Dynamic Response in Plasma Metabolites Reflect Effects of Diet, Genetics and the Gut Microbiome. 76th Scientific Sessions of American Diabetes Association; 2016 Jun 10-14; LA.
3. Sakaguchi M, **Fujisaka S**, Cai W, Konishi M, O'Neil BT, Takahashi H, Kahn CR. Regulatory Control of Adipose Mass: Insights from a Novel Model of Lipodystrophy. 76th Scientific Sessions of American Diabetes Association; 2016 Jun 10-14; LA.
4. Altindis E, **Fujisaka S**, Kahn CR. Fecal Proteomics Analysis Provides a Novel Window into the Effects of Diet and Gut Microbiome on Host Gut Metabolism. 76th Scientific Sessions of American Diabetes Association; 2016 Jun 10-14; LA.
5. **藤坂志帆**, 戸邊一之, Kahn CR. 腸内細菌叢の変化が耐糖能に与える影響. 第37回日本肥満学会; 2016 Oct 7-8; 東京
6. **藤坂志帆**, Ussar S, Clish C, Bry L, Kahn CR. 腸内マイクロバイオーームの変化が耐糖能に与える影響. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会; 2016 May 19-21; 京都
7. **Fujisaka S**, Bry L, Clish C, Dreyfuss J, Devkota S, Ussar S, Sakaguchi M, Konishi M, Kahn CR. Role of Host Genetics in Antibiotic Effects on the Gut Microbiome, Inflammation and Insulin Signaling in Diet-Induced Obesity. American Diabetes Association 75th Scientific Sessions; 2015 Jun 5-9; Boston
8. Sakaguchi M, **Fujisaka S**, Cai W, Konishi M, Kahn CR. Systemic Effects of an Inducible Knockout of Insulin and IGF-1 Receptors in Adipose Tissue: A Novel Model of a Remitting Form of Metabolic Syndrome. American Diabetes Association 75th Scientific Sessions; 2015 Jun 5-9; Boston
9. **Fujisaka S**, Ussar S, Kahn CR. Antibiotic Treatment Alters the Gut Microbiome, Adipose Tissue Inflammation and Energy Metabolism. American Diabetes Association 74th Scientific Sessions; 2014 Jun 13-17; San Francisco.
10. **Fujisaka S**, Ussar S, Devkota S, Kahn CR. Antibiotic treatment alters the gut microbiome, bile acid metabolism and adipose tissue inflammation. BBDC-Joslin Diabetes Conference; 2014 Oct 17-18; Toronto.