

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03090

研究課題名(和文) 動物性タンパク質摂取過多に伴い発生する腸内発酵産物が腸内及び各種臓器に及ぼす影響

研究課題名(英文) Influence of intestinal fermentation products caused by excessive animal protein intake on intestinal and various organs.

研究代表者

清水 英寿 (Shimizu, Hidehisa)

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：10547532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸内細菌代謝産物であるスカトールが、ラット個体、培養腸管細胞、培養肝ガン細胞、それぞれに与える影響について解析を行った。結果としてスカトールは、ラット個体においては、胆汁酸代謝の攪乱を誘発させ、肝臓や回腸での遺伝子発現、そして腸内細菌叢を変動させる事が明らかとなった。また、腸管細胞を用いた解析では、スカトールがAhRを介して細胞死を導く事が確認された。さらに培養肝ガン細胞では、スカトールはERKの活性化を介して細胞増殖を導く事が示唆された。以上の本研究結果から、腸内におけるスカトールの産生は、消化管機能の異常を誘発させ、さらに消化管疾患の発症・進展へも関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we analyzed the influence of skatole, an intestinal bacterial metabolite, on rats, cultured intestinal cells, and cultured hepatoma cells. As results, in rats, it was revealed that skatole induces disturbance of bile acid metabolism, change of gene expression in the liver and ileum, and dysbiosis. In the analysis using cultured intestinal cells, it was demonstrated that skatole leads to cell death via AhR activation. Furthermore, in cultured hepatoma cells, it was suggested that skatole promotes cell proliferation through activation of ERK. Based on the above results of the present study, it was shown that the production of skatole in the intestine induces abnormalities in gastrointestinal function, and may also be involved in the onset and progression of gastrointestinal diseases.

研究分野：病態生理学

キーワード：スカトール インドール系化合物 高食肉摂取 胆汁酸 二次胆汁酸 腸内細菌叢 大腸ガン 炎症性腸疾患

### 1. 研究開始当初の背景

近年、我が国では、生活習慣病患者の増加が深刻な社会問題となっている。その原因の一つとして、食生活の欧米化に伴う動物性タンパク質の摂取過多が挙げられている。このような食習慣は、腸内への胆汁酸流入量を増大させ、我が国でも増加している大腸ガン発症・進展の危険要因の一つとされている。実際に、一次胆汁酸であるコール酸を摂取させたラットの腸管上皮において、通常環境下だけでなく、 $\gamma$ 線照射によるアポトーシス誘導条件下でさえも、細胞増殖が引き起こされている事を我々が明らかにしている(引用文献: )。また同様に、炎症性腸疾患の発症にも、動物性タンパク質摂取過多による腸内での胆汁酸濃度上昇の関与が指摘されている。以上の様に、腸疾患の発症・進展には、動物性タンパク質の摂取過多による胆汁酸代謝異常が関与している事が見出されているが、どのような過程を経て導かれているのかは明らかとなっていない。そこで本研究では、加齢による腸内細菌叢の変化に着目し、特に加齢に伴って存在比率が著しく増大する Proteobacteria 門と Firmicutes 門に注目をした。Proteobacteria 門には、日常生活で摂取している食品タンパク質中に含まれるトリプトファンをインドールに代謝する、トリプトファンゼの活性が強い大腸菌群が含まれている。したがって加齢を引き金に、大腸内の Proteobacteria 門を介したインドール代謝が亢進していると予想される。研究代表者は現在までに、インドールの肝臓での代謝産物インドキシル硫酸による腎不全進行促進及びその合併症である動脈硬化の発症・進展メカニズムについて解析を行ってきた。本研究では、食品タンパク質中のトリプトファンを起点として、最終的に Firmicutes 門に属するクロストリジウム群によって代謝・産生されるスカトールに着目している。その理由として、通常の食事条件下ではスカトールは糞中で検出され難いが、高食肉摂取によって糞中に含まれるスカトール濃度が上昇するためである。そこで本研究では、腸内で産生されるスカトールに焦点を当て、宿主と腸内細菌叢のそれぞれに与える影響について病態発症・進展との関連を想定して研究を進める事とした。

### 2. 研究の目的

本研究では、加齢による腸内環境の悪化を介して、動物性タンパク質摂取過多による食品中のトリプトファンから代謝され産生されるスカトールが、胆汁酸合成・分泌の促進要因の一つであると予想した。加えて我々は、胆汁酸の一種であるコール酸を微量摂取させたラットにおいて、腸内細菌叢の変化と腸管及び肝機能障害が正の相関関係がある事を見出している(投稿準備中)。そのため、スカトールが起点となり、腸内細菌叢の変動及び胆汁酸代謝を含む腸管・肝臓機能に影

響を与え、生活習慣病の発症・進展に寄与していると仮説を立て、「食-腸内細菌叢-病態発症」の3者の関係性の一端を、胆汁酸代謝を中心に明らかにする事を本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### <実験 1>

Sprague-Dawley 系ラット(5 週齢雄性)に、抗酸化剤である *t*-Butylhydroquinone を添加した AIN-93G に準拠した基本飼料で 5 日間の予備飼育を行い、その後、同様の基本飼料を摂取させた対照群 (n=10)、0.025% スカトールを含む飼料を摂取させた試験群 (n=11) に分け、試験期間を 4 週間とし、飼料は全て自由摂取とした。試験期間終了時に採糞を行い、糞中胆汁酸組成を Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry (UPLC/ESI-MS) で分析した。また解剖時に、採血を行った後、腸間膜脂肪、副睾丸脂肪、後腹膜脂肪、腎周囲脂肪、肝臓、腎臓を採取し、それぞれの重量を測定した。採取した肝臓と回腸粘膜に関しては、RNA に調製した後、逆転写反応を行い、定量的 real-time PCR 法を用いて遺伝子の発現量について解析を行った。さらに、各種血漿パラメーターについて調べた。また、糞中に含まれているインドールについては、Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) で測定を行った。

#### <実験 2>

Sprague-Dawley 系ラット(5 週齢雄性)に、抗酸化剤である *t*-Butylhydroquinone を添加した AIN-93G に準拠した基本飼料で 5 日間の予備飼育を行い、その後、同様の基本飼料を摂取させた対照群 (n=12)、0.025% スカトールを含む飼料を摂取させた試験群 (n=12) に分け、試験期間を 6 週間とし、飼料は全て自由摂取とした。2 週間目、4 週間目、6 週間目に採糞を行い、糞中胆汁酸組成を UPLC/ESI-MS で分析した。また、解剖時に採血を行った後、副睾丸脂肪、肝臓、腎臓を採取し、それぞれの重量を測定した。採取した盲腸内容物から DNA 抽出を行った後、次世代シーケンサーを用いて 16S rRNA の遺伝子領域の一部の配列を指標に、菌属及びその増減の決定を行った。各種血漿パラメーターについても測定を行った。

#### <実験 3>

Sprague-Dawley 系ラット(5 週齢雄性)に、抗酸化剤の影響を排除するため、抗酸化剤である *t*-Butylhydroquinone 未添加の AIN-93G に準拠した基本飼料で 5 日間の予備飼育を行い、その後、同様の基本飼料を摂取させた対照群 (n=11)、0.025% スカトールを含む飼料を摂取させた試験群 (n=11) に分け、試験期間を 4 週間とし、飼料は全て自由摂取とした。試験期間終了時に採糞を行い、糞中胆汁酸組成

を UPLC/ESI-MS で分析した。また解剖時に、採血を行った後、腸間膜脂肪、副睾丸脂肪、後腹膜脂肪、腎周囲脂肪、肝臓、腎臓を採取し、それぞれの重量を測定した。

#### <実験 4>

スカトールの標的受容体を同定する事を目的に、18 種類の核内受容体型転写因子を対象にルシフェラーゼアッセイにて、転写活性を測定した。

腸管細胞に対するスカトールの影響を調べる事を目的に、培養腸管細胞の生存率に対する影響を解析した。また、スカトールによる生存率の変化が AhR の活性化を介しているのか確認を行った。

肝ガン細胞に対するスカトールの影響を調べる事を目的に、培養肝細胞の生存率への影響を解析した。また、増殖・生存に関わる ERK が、細胞に対するスカトール刺激によって活性化が導かれるのか確認を行った。

#### <実験 5>

腎臓近位尿管細胞に対してインドキシル硫酸が、Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) の発現上昇を導くのか確かめた。さらに、インドキシル硫酸は腎機能低下に関与していることから、AhRR の SNP である Pro189Ala が腎機能に影響を与えるのか、他の研究機関に依頼して確認を行った。

### 4. 研究成果

#### <実験 1>

抗酸化剤である *t*-Butylhydroquinone が含有されている AIN93G にスカトールが 0.025% 添加された餌をラットに 4 週間摂取させた後、解析を行い、以下のような結果を得た。スカトール摂取ラット群において、糞中二次胆汁酸量は増加し、特にその中でも、大腸ガンや炎症性腸疾患の原因とされている Deoxycholic acid (DCA) の濃度が有意に上昇していた。加えて、糞中インドール量が、スカトール摂取ラット群で有意に増加していた。インドール産生菌は胆汁酸に対して耐性が高い Proteobacteria 門に属する大腸菌によって産生されることから、スカトール摂取ラット群の腸内において、トリプトファンからインドールの変換に寄与するトリプトファナーゼを有する大腸菌等のインドール産生菌が増加している事が示唆された。または、スカトールがオートインデューサーとしてインドール産生菌に作用して、菌内のトリプトファナーゼの活性を高めた事によってインドール濃度が上昇した可能性もある。回腸において発現変動をする遺伝子を調べたところ、PPAR $\gamma$  の発現量が、スカトール摂取ラット群で有意に低下していた。PPAR $\gamma$  は、炎症シグナルに対して抑制的に働く事が知られているのを考慮に入れると、この状況は炎症反応が亢進されやすい状況である事が示唆される。ちなみに PPAR $\gamma$  の発現量が低い状

態は、炎症性腸疾患でも観察されることから、腸内におけるスカトール産生増加が疾患発症・進展に関与している可能性が考えられる。以上から、動物性タンパク質摂取過多による腸内スカトール量の上昇が、胆汁酸代謝異常を引き起こし、また腸内細菌叢を変化させ、大腸ガンや炎症性腸疾患の起因となる可能性が示された。

#### <実験 2>

「実験 1」では、4 週間の飼育期間でラットの解析を行ったが、本実験では、6 週間の飼育期間でスカトールがラット個体に及ぼす影響について解析を行い、以下の結果を得た。まず、コントロール群とスカトール摂取群と比較して、摂食量と体重に違いは認められなかった。臓器重量に関しても、肝臓、腎臓、脂肪のそれぞれに変化は観察されなかった。AST 及び ALT、血中コレステロール値及びトリアシルグリセロール値、血中アディポネクチン値に有意な差は検出されなかった。糞中の総胆汁酸濃度、二次胆汁酸濃度、DCA 及びその関連胆汁酸濃度については、試験開始 2 週間後からスカトール摂取群で有意な上昇が見られ、試験開始 4 週間後及び 6 週間後でも結果は同様であった。我々は、消化管内での胆汁酸、特に DCA が Bacteroidetes 門の減少に影響を与えている事を明らかにしている(論文投稿中)。そこで盲腸内の Bacteroidetes 門に関して調べたところ、スカトール摂取群でその存在比が有意に低下していた。以上の結果から、スカトール摂取を起因とした胆汁酸代謝の亢進によって、腸内での DCA 濃度が上昇し、それが原因となり Bacteroidetes 門が減少したと考えられる。

#### <実験 3>

「実験 1」及び「実験 2」では、餌に抗酸化剤である *t*-Butylhydroquinone を含有させていたが、本実験では抗酸化剤の除いた AIN93G を基本食としたスカトール摂取試験を行い、ラット個体に対する影響について解析を行った。その結果については、以下の通りである。まず、コントロール群とスカトール摂取群と比較して、摂食量及び体重は、両群の間で差はなかった。臓器重量に関しては、肝臓重量がスカトール摂取群で優位に上昇していたが、腎臓及び脂肪重量については両群の間で差は観察されなかった。AST 及び ALT、血中及び肝臓トリアシルグリセロール値について、両群の間で差は認められなかった。しかし、血中及び肝臓コレステロール値については、スカトール摂取群でそれぞれ増加傾向にあった。糞中の総胆汁酸量や二次胆汁酸量に関しては、「実験 1」と「実験 2」とは異なり、コントロール群とスカトール摂取群で変化はなかったが、総胆汁酸量に対する胆各種胆汁酸の比率について調べたところ、スカトール摂取群で 12 $\alpha$ -hydroxylated bile acids 及びその成分の 1 つである DCA の比率が有意

に上昇していた。また、摂取スカトール量と糞中の総胆汁酸量に対する DCA 比は有意な正の相関を示した事から、この結果はスカトール摂取が起因となっている可能性が高い。さらに、糞中の総胆汁酸量に対する DCA 比と肝臓重量は有意な正の相関を示した事から、肝臓重量の増加は、スカトールによる腸内における DCA 比の上昇によって引き起こされる事が示唆された。

#### <実験 4>

スカトールの標的受容体に対する解析を試みた。18 種類の核内受容体型転写因子に対してスカトールが活性化を導くか確認を行ったところ、既に報告されている Aryl hydrocarbon receptor ( AhR ) のみ活性化が確認された。

培養腸管細胞に対してスカトールが与える影響について解析を行った。結果として、スカトールが腸管細胞の細胞死を導く事が明らかとなった。そこで、スカトールの受容体として報告されている AhR との関係について調べたところ、スカトールによる細胞死に AhR は関与しない事が確認された。

培養肝ガン細胞である HepG2 細胞に対するスカトールの作用についても解析を行った。スカトールは ERK の活性化を惹起させ、HepG2 細胞の増殖を導く可能性が示唆された。

#### <実験 5>

「実験 1」において、腸内でインドール濃度の上昇が観察された事から、体内へ吸収されたインドールが肝臓で代謝される事で産生されるインドキシル硫酸に関連した解析も行った。インドキシル硫酸がターゲットする主な臓器は腎臓であり、腎臓近位尿細管細胞に作用して、腎機能の低下を導く事を研究代表者はこれまでに明らかにしている。そこで、培養腎臓近位尿細管細胞を用いて解析を行ったところ、AhRR の発現増加が観察された。AhRR は AhR のネガティブフィードバック制御に関わっている事から、AhRR は腎機能に影響を与えると予想した。そこで AhRR に存在する SNP である AHRR Pro189Ala に着目して解析を行ったところ、この SNP の存在は腎機能に影響を与えていた。よって、腸内でのスカトール産生増加を起因するインドール濃度の上昇だけでなく、それに伴って腎臓で発現増加すると考えられる AhRR に存在する SNP が、腎機能に影響を与える事が明らかとなった。

#### <引用文献>

Hagio Masahito, Shimizu Hidehisa, Joe Ga-Hyun, Takatsuki Manami, Shiwaku Maiko, Xu Hong, Lee Ja-Young, Fujii Nobuyuki, Fukiya Satoru, Hara Hiroshi, Yokota Atsushi, Ishizuka Satoshi, Diet supplementation with cholic acid promotes intestinal epithelial proliferation in rats

exposed to  $\gamma$ -radiation, *Toxicol Lett*, Vol. 232, 2015, pp. 246-252.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

清水英寿, 食品タンパク質由来腸内細菌代謝産物が導く慢性腎不全の進行促進メカニズム-タンパク質の少ない食事が慢性腎不全の悪化を防ぐ理由とは...?-, *化学と生物*, 査読有, Vol. 3, 2017, pp. 203-209.

Nakayama Kazuhiro, Saito Shinichi, Watanabe Kazuhisa, Miyashita Hiroshi, Nishijima Fuyuhiko, Kamo Yoshie, Tada Koji, Ishizuka Satoshi, Niwa Toshimitsu, Iwamoto Sadahiko, Shimizu Hidehisa. Influence of AHRR Pro189Ala polymorphism on kidney functions, *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有, Vol. 81, 2017, pp. 1120-1124.

#### 〔学会発表〕(計 9 件)

清水英寿, お肉をたくさん食べるのは健康に良いの?悪いの?-腸内環境から見た違い-, 日本農芸化学会中四国支部第 33 回市民フォーラム, 2017 年.

蔵田航一, 河原秀明, 石塚敏, 清水英寿, 食品由来腸内細菌代謝産物スカトールによる腸管細胞死誘導メカニズムの解析, 第 71 回日本栄養・食糧学会大会, 2017 年.

清水英寿, 田中愛健, 野勢琢馬, 吹谷智, 横田篤, 石塚敏, スカトールは消化管の恒常性破綻を引き起こす, 第 1 回 Uremic Toxin 研究会, 2017 年.

蔵田航一, 河原秀明, 清水英寿, 腸管細胞におけるスカトールの作用メカニズムの解析, 日本農芸化学会中四国支部第 47 回講演会, 2017 年.

清水英寿, 田中愛健, 野勢琢馬, 吹谷智, 横田篤, 石塚敏, 食品タンパク質由来腸内細菌代謝産物スカトールが糞中胆汁酸組成および肝臓に与える影響, 第 49 回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会, 2016 年.

清水英寿, タンパク質摂取過多を起因とした糞中二次胆汁酸増加を導く分子種の検討, 第 70 回日本栄養・食糧学会大会関連学術集会, 2016 年.

野勢琢馬, 清水英寿, 萩尾真人, 原博, 石塚敏, スカトールによる胆汁酸代謝変動

と糞中インドール濃度増加, 第 21 回  
Hindgut Club Japan ミーティング, 2015 年.

清水英寿, トリプトファン代謝物による  
腎不全及びその合併症の発症・進行メカ  
ニズムに関する研究, 平成 27 年度 第 2  
回日本農芸化学会北海道支部講演会,  
2015 年.

Nose T, Shimizu H, Hagio M, Lee JY, Baba  
N, Fukiya S, Yokota A, Hara H, Ishizuka S,  
Skatole, an intestinal bacteria-derived dietary  
protein metabolite, increases concentration  
of fecal deoxycholic acid-related bile acids  
and ileal taurocholic acid, 12th Asian  
Congress of Nutrition, 2015 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.staffsearch.shimane-u.ac.jp/kenkyu/s  
earch/d4ae96846437182bdb2ef3e1ce13f859/deta  
il](http://www.staffsearch.shimane-u.ac.jp/kenkyu/search/d4ae96846437182bdb2ef3e1ce13f859/detail)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 英寿 (SHIMIZU, Hidehisa)  
島根大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号: 10547532

### (2) 研究分担者

吹谷 智 (FUKIYA, Satoru)  
北海道大学・大学院農学研究院・講師  
研究者番号: 10370157

萩尾 真人 (HAGIO, Masahito)  
東洋大学・生命科学部・助教  
研究者番号: 00623927

岡野 邦宏 (OKANO, Kunihiro)  
秋田県立大学・生物資源科学部・助教  
研究者番号: 30455927

### (3) 連携研究者

宮崎 均 (MIYAZAKI, Hitoshi)  
筑波大学・生命環境系・教授  
研究者番号: 40183636

石塚 敏 (ISHIZUKA, Satoshi)  
北海道大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号: 00271627