

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00820

研究課題名(和文) 食生活のスタイルが腸内菌と生活習慣病の発症リスクに及ぼす影響について

研究課題名(英文) The timing of high-fat high-sucrose diet intake affects gut microbiota and fatty liver disease in mice

研究代表者

片岡 佳子 (KATAOKA, Keiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：40189303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウスに高脂肪高シヨ糖食(HFHSD)を与えると一部のClostridiumの増加とBacteroidesやBifidobacteriumの減少等の腸内菌叢の変化が起こり、空腹時血糖値が上昇し、やがて脂肪肝から脂肪肝を発症する。腸内菌叢の形成される幼少期からこの食餌を開始した場合にその影響は大きく、実験群の全個体の肝疾患バイオマーカー値が上昇し、腸内菌叢も同じ方向に変化した。しかしながら、食餌内容への発酵玄米の添加やHFHSD摂取期間中に通常食を取り入れる等の介入により、脂肪性肝疾患のリスクを低減できる可能性があること、そこに腸内環境の変化が関わっている可能性があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：High-fat high-sucrose diet (HFHSD) induced changes of gut microbiota composition including increase of a kind of Clostridium and decrease of Bacteroides and Bifidobacterium, followed by increasing fasting blood glucose and fatty liver disease. Feeding HFHSD from weaning period easily affected gut microbiota composition and increased serum biomarkers of the disease in all mice of the group, while wide inter-individual variation was observed in matured and aged mice. However, intervention such as an addition of fermented brown rice to the HFHSD or alternate feeding between HFHSD and normal diet have lowered the serum biomarkers of liver damage, and also affected gut microbiota composition. These results suggest the serious effect of HFHSD on the risk of fatty liver disease if it started from weaning period, and that intervention to the diet component or the style of diet intake have the possibility to decrease the disease risk via microbiota modification.

研究分野：細菌学

キーワード：高脂肪高シヨ糖食 脂肪性肝疾患 マウス生育時期 食餌スタイル 糞便菌叢 腸内環境 Clostridium Bifidobacterium

## 1. 研究開始当初の背景

高脂肪の食事やエネルギーの過剰摂取による肥満は、2 型糖尿病や脂質代謝異常へとつながる危険因子である。肥満はインスリンの効きにくい状態(インスリン抵抗性)を引き起こし、過剰にインスリンを分泌していた膵臓が疲弊すると血糖のコントロールが難しくなる。また、肝臓には脂肪が蓄積し(脂肪肝)、食生活の改善などが行われない場合には慢性肝炎(非アルコール性脂肪肝炎; NASH)を発症し、さらに腫瘍を誘発することもある。近年これらの生活習慣病は増加傾向にあり、正しい食生活についての知識の普及と積極的な予防対策が重要である。

糖尿病や脂質代謝異常などの場合、インスリン分泌能や脂質代謝に関わる遺伝的因子が発症の背景のひとつであるが、過食や脂肪の摂取過多などの食生活要因も大きく関与している。さらにそこに腸内環境の変化が関わっているとの報告が増えている(Albenberg LG and Wu GD, Gastroenterol, 2014; Laugrette F *et al.*, Biochimie, 2011)。われわれは以前に、潰瘍性大腸炎患者では通常の優勢菌種が減少して腸内菌構成の多様性が低下しアンバランスな状態であることを報告した(Nemoto *et al.*, Dig Dis Sci, 2012)。糖尿病関連でもヒトでもマウスでも腸内菌叢が異なっていることが報告されている。脂質豊富な食事による腸内菌叢の構成の変化や腸内菌由来代謝産物の増減を含めた腸内環境の変化が、インスリン抵抗性の出現や宿主のエネルギー代謝に影響するとの報告がある。しかしながら、腸内環境の変化が疾病発症の感受性、進展あるいは抑制とどのように関連するのか、詳細は明らかではない。

ヒトの腸内菌叢の構成は、母親から受け継ぐ菌種に加えて、出生以降の環境、食事、加齢、運動、ストレス、抗菌薬の使用など

様々な要因により影響を受ける。いったん確立されると安定に保たれるが、幼少期の食生活はその後の腸内環境に非常に大きな影響を与える可能性がある。また、不定期な食事のとり方も腸内環境に影響を及ぼす可能性がある。

食生活の内容は、腸内環境に影響を与え、腸管免疫系にも影響し、ヒトの健康に大きな影響を及ぼすと考えられているが、どのような食生活をすればよいのか、どのように腸内環境を整えればよいのかについてはまだ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究ではマウスの様々な成育段階において高脂肪高シヨ糖食(HFHSD)、各種の食物繊維を添加した高脂肪高シヨ糖食、あるいは抗菌薬を与えて、食餌内容と腸内環境、および生活習慣病の発症リスク(肥満、インスリン抵抗性の出現、脂肪肝および脂肪肝炎)との関連を検討した。どの時期の食生活が生活習慣病の発症リスクを低減する上で重要なのか、食餌内容の改善や食餌摂取のスタイル(絶食や通常食との交互切り替え)によりそのリスクを低減できるのか、を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

C57BL/6J マウス(雄、日本チャールズリバー)の離乳期3~4週齢、成熟期(8週齢)、高齢(9~11か月齢)の個体を実験に用いた。実験期間中に、高脂肪高シヨ糖食(HFHSD; オリエンタル酵母工業 F2HFHSD、30%脂肪 20%シヨ糖)、陰性対照コントロール用の通常食(MF, オリエンタル酵母工業) または HFHSD に玄米発酵食品を 0.5%~10%添加した HFHSD を自由摂取させた。食餌スタイルの影響を検討する場合には、8週齢のマウスを用い、HFHSD 投与群と、1回/週の絶食日を設

定する群、HFHSD と通常食を 8 日ごとに交互に摂取させる群、実験開始 4 週間後から抗菌薬バンコマイシンを飲料水に混じて (500mg/L) 投与する群の間の比較を行った。動物実験は徳島大学動物実験委員会の細則に従い、苦痛をできる限り排除しつつ行った。

#### (1) 肥満、インスリン抵抗性、脂肪肝炎の評価

実験期間中、体重を週 1 回測定した。また、一定期間ごとに 14 時間絶食後の空腹時血糖値を測定し、必要時にグルコース負荷試験を行って、インスリン抵抗性を評価した。実験食の投与期間終了時に、肝臓、精巣周囲脂肪組織の重量を測定し、麻酔下に眼窩静脈から採血し、血清を分離して、肝臓機能の指標として ALT, AST, コリンエステラーゼ (ChE), 総胆汁酸 (TBA) を測定した (長浜ライフサイエンスラボラトリーに委託)。肝臓の一部をホルマリン固定し HE 染色標本を作製し、脂肪滴の量を観察した。残りの肝臓全てを凍結保存し、肝臓内脂質の定量に用いた (スカイライト・バイオテックに委託)。

#### (2) 腸内環境の変化の解析

マウス糞便菌叢の解析は、糞便から抽出した DNA を用い、腸内菌の 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅し、Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 法により菌叢の経時的な変化を解析した。菌種ごとにサイズの異なる制限酵素切断 DNA 断片の出現パターンを GeneMapper 解析ソフトウェアで解析しクラスタリングすることにより、高脂肪高ショ糖食投与や抗菌薬による菌叢への影響を検討した。さらに一部のマウスについては、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域について NGS によりシーケンスおよび相同性検索による菌種

同定を行い (タカラバイオに委託)、菌種ごとのクローン出現頻度をもとに各群の菌叢構成比を明らかにした。また、菌種特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR により、*Clostridium* cluster XI の定量を行った。

腸管の頑健性を比較するため、腸管上皮細胞が傷害された場合に漏れ出すジアミンオキシダーゼ酵素 (Takagi K *et al.* の方法、自然免疫応用技研 (株) に委託) の血清中の活性を測定した。

## 4. 研究成果

まずマウスに高脂肪高ショ糖食 (HFHSD) を開始した場合の経時的な菌叢構成比率の変化を T-RFLP 法により調べた。通常食投与マウスでは開始 1 週間後までに *Bacteroides* 属および *Clostridium* XIVab の増加が見られたが、離乳直後から HFHSD 投与マウスではこれらの増加が抑制され、*Clostridium* IX の比率が増加した。この菌叢構成の相違は 4~5 か月齢でも持続しており、HFHSD 投与群では便中有機酸濃度が低かった。7 週齢以降には HFHSD 投与群に体重と空腹時血糖値の有意な増加が起こり、HOMA-IR 値の上昇およびインスリン感受性の低下、すなわちインスリン抵抗性が生じた。さらに長期に HFHSD を投与したマウスでは、肝臓重量が増加し血清中コリンエステラーゼ値の上昇が見られ、血清中 AST, ALT, LDH, 血清鉄、総胆汁酸が有意に高値で脂肪肝炎を発症していた。

次に、幼少期の食餌内容が生活習慣病の発症リスクにおよぼす影響を検討した。離乳期 (3 週齢) から 8 週齢まで HFHSD または通常食で飼育し、8 週齢以降に餌を継続またはもう一方に切り替えた。幼若期に通常食を与え 8 週齢時に HFHSD に切り替

えると、体重の増加度が上がり、空腹時血糖が上昇する傾向が見られた。これは、幼若期から実験期間中 HFHSD を継続した場合よりもむしろ高い傾向にあった。一方、幼若期に HFHSD を与え 8 週齢時に通常食に切り替えたマウスでは、8 週齢以降に体重や空腹時血糖の上昇は見られなかった。これらのマウスを 48 週間後まで長期に飼育し、グルコース負荷テスト、血清中 AST, ALT, コリンエステラーゼ(ChE), 総胆汁酸の測定、肝臓内の脂質の定量を行った。いずれも、幼若期(3 週齢から 8 週齢までの 5 週間)の食餌が通常食か HFHSD による差は見られず、8 週齢以降に HFHSD を摂取させた場合に、通常食コントロールより高い値を示した。この餌の切り替えによる糞便菌叢の変化について T-RFLP 法で調べたところ、切り替えて 3 日~1 週間後には、先述の HFHSD パターン、あるいは通常食の菌叢に変化していた。

同じマウスモデルを用いて、HFHSD を開始する週齢の違いや食餌摂取のスタイルが、肥満や脂肪肝の血清マーカー値および肝臓内脂質量と腸内菌叢に及ぼす影響を検討した。4 週齢(離乳直後), 8 週齢(成熟)老齢のマウスに HFHSD、または通常食(対照群)を自由摂取させ 16 週間飼育したところ、全ての開始週齢において、HFHSD 摂取により体重がより増加し、空腹時血糖値が上昇し、飼育終了時の肝臓内脂質量と血清中の肝障害マーカーも上昇した。成熟および老齢マウスでは群内の個体差が大きく、対照群とほとんど変わらない個体があったが、4 週齢から HFHSD を開始した群では全個体のマーカー値が上昇していた。マウス糞便菌叢の構成比について、主成分分析およびロジスティック回帰分析を行ったところ、HFHSD 開始の週齢によって菌叢構成は異なっていた。成熟および老齢マウスでは

HFHSD 摂取後も通常食摂取群に近い菌叢を持つ個体があったが、4 週齢から HFHSD を開始した群では全個体の菌叢が通常食摂取マウスの菌叢とは異なる集団をつくっていた。菌叢構成の相違と脂肪性肝疾患のマーカー値には相関がみられ、菌叢形成の重要な時期である 4 週齢では HFHSD の影響を受けやすいものと考えられる。

成熟マウスに HFHSD を与える際の食餌スタイルを変えた場合の影響についても上記と同様に検討した。HFHSD 開始から 4 週間後以降にバンコマイシンを投与した群では、菌叢の多様性が大きく減少し、肝疾患マーカーの減少は見られず、むしろ肥満や肝疾患が促進される傾向がみられた。1 週間に 1 日絶食日を設けた群, HFHSD と通常食を交互に切り替えた群では、肝臓内脂質量が減少傾向となった。HFHSD と通常食の交互投与群では肝障害マーカー AST 値が減少傾向、ALT 値が対照群と同レベルとなった。T-RFLP 法および各群の一部マウスについての 16S rDNA V3-V4 領域のシーケンスから解析した菌叢構成比を用いて主成分分析を行った結果、HFHSD 群とこれらの群の腸内菌叢の構成は異なっていた。HFHSD 群と比べると、絶食群では一部の構成菌種の比率が減少し、通常食との交互摂取群では通常食対照群に近づく菌叢となった。実験期間中の摂食量や摂取エネルギー量を丁寧に考慮すべきであるが、HFHSD 摂取期間に通常食を取り入れるような食餌方法によって腸内菌叢の構成が影響を受け、脂肪肝のような生活習慣病の発症リスクが抑えられる可能性がある。

さらに、食餌内容への介入によりそのリスクを低減できるのかを、食物繊維を豊富に含む玄米発酵食品を HFHSD に混餌して検討した。混餌投与群では、混餌濃度に従

った ALT, AST 等の肝疾患マーカー値の有意な減少傾向 (Jonkheere-Terpstra の検定) がみられた。糞便菌叢の解析を行った結果、混餌投与群では HFHSD 投与による *Clostridium* cluster IX の増加が抑制され、*Bifidobacterium* が増加した。*Clostridium* cluster IX の菌量と脂肪肝の指標である ChE や F-CHO との間には有意な正の相関があった。今回用いた玄米発酵食品が、腸内菌叢の構成への影響を介して脂肪肝疾患に抑制的に働いた可能性がある。また、*Bifidobacterium* はマウスの主要構成菌種ではなく、実験前の個体ごとの菌数が大きく異なることが、抑制効果の個体差に関係している可能性がある。食物繊維を豊富に含む食品と *Bifidobacterium* を組み合わせて投与すればより確実な抑制効果がみられたのではないか。

以上の研究成果から、菌叢の形成される幼少期に高脂肪高シヨ糖食を摂取すると、腸内菌叢も肝疾患のリスクも食餌の影響を受けやすいこと、しかしながら、食餌内容への介入により、また高脂肪高シヨ糖食摂取期間中でも通常食を取り入れることにより、そのリスクを低減できる可能性があること、リスクの低減に腸内環境の変化が関わっている可能性があることを明らかにした。

#### 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 1 件)

1. Keiko Kataoka The intestinal microbiota and its role in human health and disease. Journal of Medical Investigation 63:27-37 (2016) 査読有

[学会発表](計 7 件)

森木美里、森本悠里、櫻井明子、片岡佳子 マウスにおける高脂肪高シヨ糖食の摂取のタイミングが腸内菌叢と脂肪性肝

疾患のリスクに及ぼす影響. 第 22 回腸内細菌学会 (2018 年 5 月 31 日、東京)

妹尾成美、森本悠里、森木美里、櫻井明子、片岡佳子 高脂肪高シヨ糖食摂取マウスの脂肪組織および肝臓細胞での遺伝子発現に対する玄米発酵食品の影響. 第 41 回徳島県医学検査学会 (2017 年 12 月 10 日、徳島大学)

松田千秋、森本悠里、森木美里、櫻井明子、片岡佳子 1 型糖尿病に対する玄米発酵食品の発症抑制効果 モデルマウスにおける膵臓遺伝子発現レベルの検討. 第 41 回徳島県医学検査学会 (2017 年 12 月 10 日、徳島大学)

郷司麻佑子、小松景子、森本悠里、櫻井明子、片岡佳子 1 型糖尿病に対する玄米発酵食品の発症抑制効果 モデルマウスにおける膵臓 PDX-1 発現レベルの検討. 第 40 回徳島県医学検査学会 (2016 年 12 月 11 日、徳島大学)

小松景子、郷司麻佑子、森本悠里、櫻井明子、片岡佳子 高脂肪高シヨ糖食摂取マウスの血中レジスチン濃度に対する玄米発酵食品の影響. 第 40 回徳島県医学検査学会 (2016 年 12 月 11 日、徳島大学)

森本悠里、櫻井明子、片岡佳子 高脂肪食により誘導される生活習慣病のリスクに対する玄米発酵食品の影響. 第 11 回日本臨床検査学教育学会学術大会 (2016 年 9 月 1 日、神戸常盤大学)

森本悠里、片岡佳子 高脂肪高シヨ糖食投与マウスの糞便菌叢に対する玄米発酵食品の影響. 第 89 回日本細菌学会総会 (2016 年 3 月 23~25 日、大阪国際交流センター)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

片岡 佳子 (KATAOKA, Keiko)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号: 40189303

##### (2) 研究分担者

櫻井 明子 (SAKURAI, Akiko)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教  
研究者番号: 70707900

##### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号:

##### (4) 研究協力者

森本悠里 (MORIMOTO, Yuuri)  
徳島大学院生  
森木美里 (MORIKI, Misato)  
徳島大学院生