

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15276

研究課題名(和文)短鎖脂肪酸による宿主行動変化の全容とそのメカニズム

研究課題名(英文)How do short-chain fatty acid affect host behaviors?

研究代表者

朝野 泰成 (Asano, Yasunari)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：30572945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸管腔内の短鎖脂肪酸濃度を上昇させるために、酢酸、プロピオン酸、酪酸がエステル結合された澱粉を含む飼料を作成して、実験を行った。その結果、作成した飼料はマウスの成育を妨げることなく、盲腸内の酢酸、プロピオン酸、酪酸濃度を上昇させた。我々は、その飼料をSPFマウスに与えて、短鎖脂肪酸が宿主の生理機能に及ぼす影響を調べた。しかし、短鎖脂肪酸を含む飼料もしくは含まない飼料を与えたマウスを比較したところ、行動特性に差異を認めなかった。本研究で作成した飼料は、今後、腸内細菌から生成された短鎖脂肪酸が宿主の生理機能に作用するメカニズムを調べるために有用である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used the diet containing acetylated, propionylated or butyrylated starches in order to increase the level of short-chain fatty acids (SCFA) in the intestinal lumen. As a result, the diet was good for the growth of mice and resulted in the creation of SCFA such as acetic acid, propionic acid or butyric acid in the cecum. We fed SPF mice with the diet and investigated physiological function. However, no definite behavior change was found between the mice group which did have SCFA containing diet and did not. In conclusion, this diet is considered to be useful for elucidating the mechanism by which SCFA derived from gut microbe affect host physiology.

研究分野：内科学一般(含心身医学)

キーワード：短鎖脂肪酸 食物繊維 腸内細菌 行動特性

1. 研究開始当初の背景

<食>は、健康の維持・増進ばかりでなく様々な身体疾患の予防や治療において中核を成すことは言うまでもないが、精神健康および精神疾患の予防や治療における重要性については明らかではない。一方、<食>と密接に関係している腸内細菌に関しては、近年、宿主の精神機能の発達や制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。申請者らのグループは、無菌マウスや人工菌叢マウスを駆使して、腸内細菌が宿主の中枢神経機能へ及ぼす影響について研究を進めてきた。その結果、腸内細菌は宿主のストレス反応・行動特性の発達に密接に関与していることを明らかにしてきた。

本研究では、腸内細菌による情動・ストレス反応の変容をもたらす原因物質として食物繊維およびその代謝産物である短鎖脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸）に着目した。短鎖脂肪酸は、腸内細菌が食物繊維などの栄養成分を発酵分解することで生成され、エネルギー源として利用されるが、近年、他の様々な生理機能に関与していることが報告されている。しかし、腸管で生成された短鎖脂肪酸が宿主の情動・精神機能に如何なる影響を及ぼしているかについては不明である。

2. 研究の目的

本研究は、大腸管腔内において短鎖脂肪酸濃度が上昇するような特殊飼料を用いて管腔内の短鎖脂肪酸濃度を調整し、酢酸、プロピオン酸、酪酸がそれぞれ宿主の行動特性（多動性、不安関連行動、攻撃性）の発現にどのように関与しているかについて、無菌マウスや人工菌叢マウスを駆使して明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物

実験には、アイソレーター内で維持、飼育

されている無菌マウス（GF：germ free）および GF マウスに通常の specific pathogen free（SPF）環境下で生育したマウスの腸内細菌叢を移入したマウス（EX-GF）を用いた。EX-GF マウスは、母マウス（GF マウス）に腸内細菌叢を経口的に投与し、その母マウスから出生した子マウスを用いた。

(2) 処置

GF マウス、EX-GF マウスをそれぞれ5群に分け、①普通飼料 ②食物繊維抜き飼料 ③酢酸飼料 ④プロピオン酸飼料 ⑤酪酸飼料を与えた。大腸管腔内に特定の短鎖脂肪酸が存在する（もしくはいずれも存在しない）状態を生じさせ、経時的な行動特性の変化を評価した。GF マウスでは短鎖脂肪酸の生成に関与する腸内細菌が存在しないため大腸管腔内の短鎖脂肪酸濃度はゼロである。一般に、短鎖脂肪酸は経口投与すると速やかに吸収され、大腸まで到達しない。そこで、申請者らは、でんぷんを酢酸、プロピオン酸、酪酸と別個にエステル結合させ、そのでんぷんを飼料内のでんぷんと一部置換することによって、大腸管腔内でこれらの濃度が高値となるよう工夫した。

(3) 行動特性

マウスの行動特性は、高架式十字迷路試験（EPM：elevated plus maze test）、ガラス玉覆い隠し試験（MBT：marble-burying test）により評価した。EPM は、多動性や不安を評価する試験として用いた。壁のある走行路（closed arm）と壁のない走行路（open arm）が十字に交差する迷路を床から高いところに設置した。マウスが5分間に移動した距離およびclosed arm、open armに滞在した時間を自動行動解析装置（カラービデオ・トラッキング・システム）で解析した。MBT は、不安を評価する試験として用いた。床敷の上に配したガラス玉を30分間に床敷内に埋めた数を解析した。

以上の行動解析を10週齢、16週齢の時点で行った。なお、実験に用いるGF マウスの

糞便を行動試験前後に採取して培養することにより、無菌状態であったことを確認した。また、行動試験後に各マウスの大腸管腔内の短鎖脂肪酸濃度をガスクロマトグラフィ法で解析して、酢酸、プロピオン酸、酪酸の濃度が宿主の行動特性に及ぼす影響を比較した。

4. 研究成果

研究当初、自作した飼料を GF マウスに投与したところ発育障害を認めた。腸内細菌の有無が、障害の発生に関与している可能性を検証するため、SPF マウスに自作飼料を投与した。SPF マウスは順調に発育したが、胃腸障害を認めたため、飼料を改良した。飼料の改良により、マウスの発育及び胃腸機能に支障なく研究を進めることが可能となった。

短鎖脂肪酸をエステル結合させたでんぷんを含む飼料をマウスに与えると、Control 飼料と比べて盲腸内における特定の短鎖脂肪酸濃度の上昇を認めた。具体的な結果は以下の通りである。盲腸内の【酢酸】濃度 (mmol/L) は、Control 飼料: 2.4±0.7、酢酸飼料: 19.9±7.1、プロピオン酸飼料: 7.2±4.6、酪酸飼料: 17.9±5.1。盲腸内の【プロピオン酸】濃度 (mmol/L) は、Control 飼料: 2.3±0.2、酢酸飼料: 5.5±1.7、プロピオン酸飼料: 10.5±4.3、酪酸飼料: 3.7±2.1。盲腸内の【酪酸】濃度 (mmol/L) は、Control 飼料: 20.2±1.4、酢酸濃度: 62.9±7.4、プロピオン酸飼料: 22.8±6.4、酪酸飼料: 38.0±9.9 であった。

次に、GF マウスではなく、SPF マウスを対象に自作飼料を与え、行動特性の解析を行った。行動特性の評価は、ガラス玉覆い隠し試験と、オープンフィールド試験の代わりに高架式十字迷路試験を行った。飼料の別で行動特性に有意な差は認めなかった。具体的な結果は以下の通りである。【MBT の隠したビー玉数 (個)】は、Control 飼料: 10.1±5.0、酢酸飼料: 6.4±5.1、プロピオン酸飼料: 12.6±5.2、酪酸飼料: 13.8±2.5。【EPM の総移動距離 (m)】

は、Control 飼料: 83.2±25.6、酢酸飼料: 75.3±31.0、プロピオン酸飼料: 89.5±20.8、酪酸飼料: 73.2±25.6。【EPM の open arm 滞在時間 (sec)】は、Control 飼料: 166.6±58.3、酢酸飼料: 158.4±45.8、プロピオン酸飼料: 157.0±56.7、酪酸飼料: 166.8±80.6 であった。

今後、腸管管腔内の各種短鎖脂肪酸が、脳内モノアミン関連遺伝子発現および神経伝達物質濃度に及ぼす影響を調べる予定である。

本研究では、自作飼料により特定の短鎖脂肪酸濃度を腸管管腔内で上昇させることに成功した。腸内細菌が宿主の生理機能に作用するメカニズムを解明するためにも、今回作成した飼料は有用である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) Rooks MG, Asano Y, Yoshihara K, Sudo N, et al., QseC inhibition as an antivirulence approach for colitis-associated bacteria., Proc Natl Acad Sci USA., 査読有, 114(1), 2016, 142-147

(2) Koga Y, Sudo N, et al., Age-associated effect of kestose on Faecalibacterium prausinizzii and symptoms in the atopic dermatitis infants., Pediatr Res., 査読有, 80(6), 2016, 844-851

〔学会発表〕(計4件)

(1) 朝野泰成, 腸管管腔内の遊離型カテコラミン生成における腸内細菌の役割, プロバイオティクスシンポジウム'16, 2016年5月21日, 東京

(2) Hata T, Asano Y, Yoshihara K, Sudo N, The role of the gut microbiota in the production of monoamines in the gut lumen, The 17th Asian Congress on Psychosomatic Medicine, 2016年8月20日, Fukuoka, Japan

(3) 波多伴和, 須藤信行, 他., 神経性やせ症患者における腸内フローラの異常, 2016年9月3日, 東京

(4) 波多伴和, 朝野泰成, 須藤信行., 腸内細菌による腸管管腔内カテコラミン・セロトニンの制御, 日本ADHD学会第8回総会, 2017年3月3日, 横浜

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

朝野 泰成 (ASANO YASUNARI)

九州大学病院・医員

研究者番号：30572945

(2)研究分担者

吉原 一文 (YOSHIHARA KAZUFUMI)

九州大学病院・講師

研究者番号：20444854

須藤 信行 (SUDO NOBUYUKI)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：60304812

波多 伴和 (HATA TOMOKAZU)

九州大学病院・助教

研究者番号：10535983

(3)連携研究者

なし