

平成 29 年 4 月 26 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18981

研究課題名(和文)腸内環境が宿主の概日時計に与える影響解析

研究課題名(英文)Gut Microbiota-Derived Short Chain Fatty Acids Accelerate Food-Induced Circadian Clock Entrainment in Mouse Peripheral Tissue

研究代表者

田原 優 (Tahara, Yu)

早稲田大学・高等研究所・助教

研究者番号：80707399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス末梢臓器の概日時計の同調について、腸内細菌が代謝・産生する酢酸等の短鎖脂肪酸との関わりを調べた。盲腸内の短鎖脂肪酸濃度には日内リズムが見られ、夜間の活動期に高かった。明期の短鎖脂肪酸投与は腎臓などの末梢時計を前進させ、培養細胞への短鎖脂肪酸投与も、濃度依存적かつ投与時刻依存的に時計遺伝子発現の位相シフトを示した。さらに、短鎖脂肪酸の産生を促す水溶性食物繊維を多く含む餌は、末梢時計の食餌同調を増強させた。よって、腸内細菌叢を介した時間栄養学的な効果を見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated the effect of microbiota-derived short-chain fatty acid (SCFA) on the circadian clock system in mouse peripheral clocks. Cecal pH was lower and amount of cecal SCFA was higher in the beginning of dark period. Oral injection of SCFA in the daytime caused phase-advance of peripheral clocks. SCFA also caused phase entrainment of cellular clocks in fibroblasts with dose- and time-of-day dependency. In addition, fiber rich diet enhanced food-induced peripheral clock entrainment. Thus, our study revealed first application of chrono-nutrition using microbiota-derived SCFA.

研究分野：生物リズム

キーワード：体内時計 腸内細菌 末梢臓器

## 1. 研究開始当初の背景

概日時計とは、約 24 時間のリズム性をもった生理機構であり、睡眠・覚醒、ホルモン分泌、体温変動など、様々な機能を制御することで、恒常性維持に重要な役割を担っている。近年、次世代シーケンサーの登場により、腸内細菌叢の網羅的な解析技術が開発され、研究が加速しており、腸内細菌が、宿主の生理機能や病態変化に大きな影響を与えていることが分かってきた。また、免疫系を介した腸内細菌叢と腸管細胞の時計遺伝子について Cell に報告されたところであった (Mukherji et al., *Cell*, 2013)。その後、当研究費の申請直後から、腸内細菌叢の構成や機能に日内変動が見られることが立て続けに報告された。しかし、腸内細菌が肝臓などの臓器の体内時計にどのような影響を与えているかはまだよく分かっていない。

イヌリンなどの水溶性食物繊維は、腸内細菌により腸内で代謝され、腸内細菌は酢酸、酪酸、プロピオン酸などの短鎖脂肪酸を生成する。短鎖脂肪酸は、腸内の pH を変化させることで、腸管吸収を助けたり、さらに腸管細胞の免疫機能にも役立つ。また、短鎖脂肪酸の受容体 Gpr41, 43 を介した宿主の心機能、代謝機能などの制御も近年報告されている。これらの作用は、インスリン分泌や交感神経系を介するが、末梢臓器の体内時計もまたこれらの経路により影響を受ける。よって、短鎖脂肪酸が宿主の概日時計に何らかの影響を与える可能性が考えられるが、報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスを用いて、腸内細菌叢が代謝・産生する短鎖脂肪酸に着目し、宿主の概日時計に与える影響を解明することとした。

## 3. 研究の方法

実験 1 : 短鎖脂肪酸投与による末梢時計の位相変化

PER2::LUCIFERASE (PER2::LUC) knock-in マウスと in vivo imaging 装置 (住商ファーマ) を用いて、腎臓、肝臓、顎下腺の PER2::LUC 発光リズムを生体マウスで測定した。通常の明暗環境下にて、抗生物質水を 1 ヶ月間飲水投与した PER2::LUC マウスで、ZT5 に短鎖脂肪酸 (酢酸、酪酸、プロピオン酸、乳酸の混合液、それぞれ 400mM) の経口投与を 3 日間行い、その後 ZT7 から 4 時間おきに末梢臓器の発光を撮影し、解析した。さらに、抗生物質水を 1 ヶ月間飲水投与した C57/BL6J マウスでも同様の実験を行い (ZT7, 11, 15, 19, 23, 3 それぞれで n = 4) 腎臓における時計遺伝子発現リズムを RT-PCR にて解析した。また、投与時刻を ZT0, 12, 17 に変えて同様の実験を行った。さらに、それぞれの短鎖脂肪酸を投与し、同様の変化が起きるのか検討した。

実験 2 : 短鎖脂肪酸による培養細胞の時計遺伝子発現リズムの変化

PER2::LUC ノックインマウスから作成した胎児由来線維芽細胞を用いて、PER2::LUC の発光リズムをモニターしながら、培地への短鎖脂肪酸投与の影響を調べた。濃度依存性、さらに投与タイミング依存性を調べた。

実験 3 : 盲腸内短鎖脂肪酸濃度、pH の日内変動

高食物繊維食、低食物繊維食を自由摂取させたマウスの盲腸内容物を採取し、HPLC にて短鎖脂肪酸濃度を、pH メーターにて pH を測定した。盲腸内容物は、1 日 4 時間おきに採取し、日内変動を調べた。

実験 4 : 高食物繊維食の再給餌による末梢時計の位相変化

PER2::LUC マウスを一晩絶食させ、ZT4 に 1 g の餌を再給餌させた。その後、ZT7 より末梢時計の PER2::LUC 発光リズムを測定した。再給餌の餌は、高食物繊維食と低食物繊維食の 2 群を設定した。2 日間再給餌させる群もさらに追加した。

実験 5 : 腸内細菌叢の有無が、末梢時計のストレス応答に及ぼす影響

PER2::LUC マウスに抗生物質水を 1 ヶ月投与し腸内細菌叢を減少させた群、または水道水を飲ませるコントロール群を設定し、さらに ZT4-6 に 3 日間拘束ストレス負荷を行った。その後、末梢時計の発光リズムを測定することで、ストレスによる位相変動を解析した。

## 4. 研究成果

実験 1 : 短鎖脂肪酸投与による末梢時計の位相変化

短鎖脂肪酸の混合液を ZT5 に投与することで、末梢時計が有意に前進することが分かった。また、その応答は ZT5 の投与のみで見られ、他の時刻の投与では見られなかった。ZT5 投与による末梢時計の前進作用は、RT-PCR により、腎臓の他の時計遺伝子発現でも確認された。さらに、それぞれの脂肪酸を投与して同様の解析を行った結果、酢酸、乳酸で同様の傾向が見られた。これらの結果から、短鎖脂肪酸が末梢時計の位相リセット効果を持つこと、そこには投与時刻依存性があること、さらに酢酸や乳酸が主に時計を動かしている可能性があること、が分かった。

実験 2 : 短鎖脂肪酸による培養細胞の時計遺伝子発現リズムの変化

PER2::LUC 線維芽細胞を用いて、30 分間の培地への短鎖脂肪酸投与を行い、その後の位相変動を見た。その結果、100 $\mu$ M の投与で一番位相変化が見られ、特に CT (CT0 を発光値の一番低い時刻、CT12 を発光値の一番高い時刻に設定) 1, 22 で後退、CT8, 15 で前進する結果を得た。しかし、これまでの我々の他

の化合物を用いた結果と比べると、短鎖脂肪酸による位相変化は小さかった。よって、個体レベルでは、短鎖脂肪酸が直接末梢時計の位相シフトをもたらしたのではなく、何か別の経路により位相シフトしたのではと考えた。

#### 実験 3：盲腸内短鎖脂肪酸濃度、pH の日内変動

盲腸内 pH は、ZT15 に低い日内変動を認めた。さらに、pH の変動に対応して、盲腸内短鎖脂肪酸量は ZT15 に高くなった。特に酢酸、酪酸でその傾向が強く、濃度では酢酸が一番濃度が高かった。また、低食物繊維食の摂食マウス、または抗生物質水の飲水マウスでは、短鎖脂肪酸産生量が有意に低下し、pH も高かった。これらの結果から、暗期の活動期に、短鎖脂肪酸の産生量が増えることが分かる。実験 1 では暗期の半ばに短鎖脂肪酸を投与することで位相シフトが見られたが、その時刻は短鎖脂肪酸量が少ない時刻だからより刺激となったと考えた。

#### 実験 4：高食物繊維食の再給餌による末梢時計の位相変化

高食物繊維食の再給餌は、低食物繊維食群に比べ、腎臓、肝臓、顎下腺共に、大きく位相前進をもたらした。さらに、高食物繊維食再給餌後、酢酸、酪酸の産生量が増え、pH も有意に低下していた。つまり、高食物繊維食は、食餌性の末梢時計応答を強める効果あることが分かった。

#### 実験 5：腸内細菌叢の有無が、末梢時計のストレス応答に及ぼす影響

腸内細菌叢を減少させたマウスでは、拘束ストレス後のコルチコステロン分泌が、通常マウスと比べて大きく、その結果末梢時計の位相変化も大きかった。

#### 考察

本研究では、高食物繊維食が、腸内細菌叢による短鎖脂肪酸産生を促すことで、末梢時計の同調効果を強める結果を示した。つまり、プレバイオティクスが宿主の体内時計の時差ボケ防止に役立つ結果であった。培養細胞を用いた実験から、これらの作用は直接的ではない可能性が示された。短鎖脂肪酸はその受容体を介して、交感神経系の活性化、インスリン分泌増加などをもたらすことから、これらが時計リセットに関わっている可能性があるため、今後さらに解析を進めていく。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. **Tahara Y** and Shibata S, Abnormal tuning of the hepatic circadian metabolic rhythms in lung

cancer. *Hepatology*, 2016, 65:1061-1064. doi: 10.1002/hep.28982.

2. Shinozaki A, Misawa K, Ikeda Y, Haraguchi A, Kamagata M, **Tahara Y**, Shibata S, Potent Effects of Flavonoid Nobiletin on Amplitude, Period, and Phase of the Circadian Clock Rhythm in PER2::LUC Mouse Embryonic Fibroblasts. *PLoS One*. 2017, 12:e0170904. doi: 10.1371/journal.pone.0170904.
3. **Tahara Y**, Takatsu Y, Shiraishi T, Kikuchi Y, Yamazaki M, Motohashi H, Muto A, Sasaki H, Haraguchi A, Kuriki D, Nakamura TJ, Shibata S, Age-related circadian disorganization caused by sympathetic dysfunction in peripheral clock regulation, *npj Aging and Mechanisms and Disease*, 2017, 3:16030. doi:10.1038/npjamd.2016.30
4. Takahashi M, Haraguchi A, **Tahara Y**, Aoki N, Fukuzawa M, Tanisawa K, Ito T, Nakaoka T, Higuchi M, Shibata S, Positive association between physical activity and PER3 expression in older adults. *Scientific Reports*, 2017, 7:39771. doi: 10.1038/srep39771.
5. Sasaki H, Hattori Y, Ikeda Y, Kamagata M, Iwami S, Yasuda S, **Tahara Y**, Shibata S, Forced rather than voluntary exercise entrains peripheral clocks via a corticosterone/noradrenaline increase in PER2::LUC mice. *Scientific Reports*, 2016, 6:27607. doi: 10.1038/srep27607.
6. **Tahara Y**, Yokota A, Shiraishi T, Yamada S, Haraguchi A, Shinozaki A, Shibata S, In vitro and in vivo Phase

Changes of the Mouse Circadian Clock by Oxidative Stress, *Journal of Circadian Rhythms*, 2016, 14:1-7. DOI: <http://doi.org/10.5334/jcr.136>

7. **Tahara Y**, Shiraishi T, Kikuchi Y, Haraguchi A, Kuriki D, Sasaki H, Motohashi H, Sakai T & Shibata S. Entrainment of the mouse circadian clock by sub-acute physical and psychological stress. *Scientific Reports*, 2015, 5:11417. doi:10.1038/srep11417

〔学会発表〕(計11件)

1. 田原 優, 体内時計の食事・運動による時刻合わせー老化による影響ー, 時間栄養科学研究会, 東京農業大学, 2016/8/26
2. 田原 優, 体内時計から考える健康科学とは, SCJSF Meeting, UCLA, 2016/11/20
3. 田原 優, マウスの体内時計の老化と食・運動との関係, SAM 研究協議会, 京都大学, 2016/7/9
4. Yu Tahara, Entrainment ability of the peripheral circadian clocks by light, food, stress, and exercise in aged mice, SRBR Meeting 2016, Florida, 2016/5/21-26
5. 田原 優, 今年のトレンドとなるか「時間栄養学」の最新研究, 2016 健食原料・OEM 展, 東京国際フォーラム, 2016/4/18-19
6. 田原 優, 末梢臓器の時間栄養学研究, 日本生理学会年会, 札幌, 2016/3
7. 田原 優, 時間栄養学による健康科学, 日本薬理学会年会, 横浜, 2016/3
8. Yu Tahara, Circadian clock system in peripheral tissues of mice, UBIAS, 早稲田大学, 2016/3
9. Yu Tahara, Physical and psychological stress-induced entrainment of

- peripheral circadian clocks, Cold Spring Harbor Asia, 中国、蘇州, 2015/10
10. 田原 優, 食と体内時計, 第53回全国大学保健管理協会 関東甲信越地方部会研究集会, 東京女子医大, 2015/7
  11. 田原 優, 時間栄養学による機能性食品開発, 第42回日本毒性学会学術年会, 金沢, 2015/6

〔図書〕(計2件)

1. 柴田重信、田原優、マウス表現型解析スタンダード、羊土社、2016年、6ページ
2. 田原優、「連載～概日時計研究を健康に活かす～」, 全7回、体育の科学、杏林書院、2015、11月号～5月号

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田原 優 (TAHARA, Yu)

早稲田大学 高等研究所 助教

研究者番号: 25893265