

平成30年6月18日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19538

研究課題名(和文)メタボリックシンドローム発症における食事の欧米化による腸内細菌の変化の関与

研究課題名(英文) Involvement of gut microbiota changes induced by a westernized diet in the pathogenesis of metabolic syndrome

研究代表者

大久保 博史 (Okubo, Hirofumi)

広島大学・病院(医)・医科診療医

研究者番号：80770734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：正常耐糖能の男性において、日系米人(J-A)は、日本人(NJ)と比較して、Matsuda Index(MI)が低値であった。そして、J-AとNJは腸内細菌叢が異なることを認めた。その中でも、Bacteroidetes門に属する腸内細菌は、NJと比較して、J-Aでその割合が低く、両群において、MIと正相関を認めた。高脂肪高蔗糖食負荷マウスにミグリトールを投与すると、腸内細菌叢の変化や腸管炎症の一部是正を伴い、非アルコール性脂肪肝炎の発症が抑制された。これらの結果は、食事の欧米化により腸内細菌叢は変化すること、そして、腸内環境は、メタボリックシンドロームの治療標的となる可能性があることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Matsuda index (MI) was lower in Japanese-American (J-A) than in Native-Japanese (NJ) men with normal glucose tolerance. The gut microbiota composition in J-A men is different, i.e., lower abundance of genera within the phylum Bacteroidetes, from that in NJ men. Furthermore, the ratio between this gut microbiota and MI was positively correlated between the two groups. These results suggested that a westernized diet induces gut microbiota changes, which might be involved in insulin resistance.

High-fat high-sucrose diet (HFHSD)-fed mice showed gut microbiota changes and colon inflammation. Miglitol treatment partially corrected these changes in the gut environment and showed a protective effect against the development of HFHSD-induced non-alcoholic steatohepatitis. Thus, gut environment might be a therapeutic target for metabolic syndrome.

研究分野：代謝学

キーワード：腸内細菌 メタボリックシンドローム インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム (MetS) は、内臓脂肪蓄積型肥満、高血圧、耐糖能異常、脂質代謝異常が集積した状態で、2 型糖尿病発症、心血管疾患発症および心血管疾患死のリスク上昇に關与しているため、治療介入が必須と考えられる。しかしながら、現在、食事運動療法による生活習慣への介入を含めて、様々な治療法が試みられているが、我が国を含めて、世界中で増加している。

腸内細菌は、食物の消化や栄養吸収だけでなく、宿主の免疫や代謝に關与しており、MetS を含む多くの疾患に關係があると考えられている。実際に、健常者と比較して、肥満者や糖尿病患者、MetS の肝臓での表現である非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 患者は、腸内細菌叢が異なるという報告がある。我々は、これまでに、マウスにプロバイオティクスや腸管運動改善薬を投与し、腸内細菌を一部是正することによって、腸管炎症の抑制や血中エンドトキシン濃度上昇の抑制を介して、NASH の発症が抑制されることを報告している (Okubo H, et al. *AJP-GI*. 305, 2013, Okubo H, et al. *AJP-GI*. 308, 2015)。このことから、腸内細菌は、MetS 発症に關与し、有用な治療標的になりうると考えている。

我々のグループは、1970 年より在米日系人医学調査を継続しており、遺伝素因は同一でありながら、欧米の生活環境で暮らす日系米人が日本人と比較して、単純糖質および動物性脂質の摂取量が多く (Egusa G, et al. *Atherosclerosis*. 100, 1993, *J atheroscler Thromb*. 9, 2002)、MetS の有病率が高率である (Yoneda M, et al. *DRCP*. 79, 2008) ことを報告している。

食事内容は、腸内細菌および腸管分泌タンパクの発現を変化させる。よって、欧米化した食事は、腸内細菌および腸管分泌タンパクを変化させ、これらはお互いに相互作用を示すことにより、腸内環境を変化させた結果、MetS の発症に關与しているのではないかと考えている。これまでに、同一人種で生活習慣の異なる 2 群での腸内細菌を含めた腸内環境の比較をした研究はこれまでにない。食事の欧米化が腸内細菌を含めた腸内環境に与える影響を明らかにすることは、MetS 発症の病態を解明するために重要であると考えている。

2. 研究の目的

日本人と日系米人間の腸内細菌叢の違いを明らかにし、食事内容および代謝パラメータとの関連を検討する。

通常食 (NCD) 負荷マウスと欧米食のモデル食である高脂肪高蔗糖食 (HFHSD) 負荷マウス間における腸管分泌タンパク発現を比較する。

において、発現差を認めたタンパクが、

実際に日本人と日系米人間の血中あるいは便中において差を認め、代謝パラメータと関連があるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

日本人と日系米人の腸内細菌叢の比較および代謝パラメータ、食事内容との関連の解析

1) 調査対象

45 歳以上 75 歳以下で、炎症性腸疾患の既往がなく、3 ヶ月以内に腸内細菌に影響を与える抗生物質や経口糖尿病薬の内服をしていない、75g 経口ブドウ糖負荷試験 (75gOGTT) および栄養調査を施行した者。

2) サンプル採取

日系米人については、2015 年 8 月のロサンゼルス検診において、上記の条件を満たす対象者から、同意を得た上で、血液および便サンプルを入手する。対照となる日本人については、関連病院による広島在住の一般住民検診において、ロサンゼルス検診と同様の条件をみたと、同意を得られた検診受診者から、血液および便サンプルを採取する。

3) 腸内細菌叢解析

便サンプルについては、キットを使用して、DNA を抽出し、次世代シーケンサー-Miseq を使用して、腸内細菌を解析し、比較検討する。そして、日本人と日系米人の腸内細菌の違いと身体所見、血液サンプルより得られた代謝パラメータ、栄養摂取状況との関連を統計学的に検討する。

欧米食負荷によるマウス腸管分泌タンパク発現の変化の解析

5-6 週齢のオスの C57BL/6 マウスに NCD あるいは HFHSD を 12 週間与え、解剖する。採取した腸管から RNA を抽出し、RNA-Seq にて網羅的に遺伝子発現解析をする。発現に差を認めた遺伝子のうち、ヒトにおいても発現が確認されている腸管分泌タンパクをウエスタンブロットングし、タンパク発現量の差を検討する。

日本人と日系米人の腸管分泌タンパク発現解析

において、NCD と HFHSD 負荷マウス間で発現量に差を認めた腸管分泌タンパクが、日本人と日系米人の便および血液において、発現量に差があるかどうかを、ELISA やウエスタンブロットングで検討する。そして、発現を認めた腸管分泌タンパクと代謝パラメータとの関連を統計学的に検討する。

4. 研究成果

正常耐糖能の男性において、ロサンゼルス在住日系米人と、対照となる広島在住日本人を比較した。日系米人は日本人に比し、年齢が高く、総エネルギーに対する飽和脂肪酸の割合が高い傾向がある一方で、多価不飽和脂肪酸の割合は低かった。両群において、BMI

および便中短鎖脂肪酸濃度に差を認めなかった。糖代謝に関しては、両群において75gOGTT中の血中グルコース濃度は差を認めなかったが、日系米人は日本人に比し、負荷後60分の血中インスリン濃度が大きく、75gOGTT中の血中インスリン濃度の曲線下面積が大きく、インスリン抵抗性の指標であるMatsuda Index(MI)が低値であった。これらの結果は、日系米人は日本人に比し、インスリン抵抗性が高いことを示唆した。腸内細菌叢に関しては、両群において、多様性の指数であるShannon Indexに差を認めなかった。主座標分析の結果、日系米人と日本人は腸内細菌叢が異なることを認めた。門レベルにおいては、日系米人は日本人に比し、Bacteroidetes門の割合が低かった(図1)。更に属レベルにおいても、両群で割合の異なる腸内細菌を認めた。その中でも、Bacteroidetes門に属するある腸内細菌は、日系米人と比し、日本人でその割合が高く、日本人および日系米人において、MIと正相関を認めた。これらの結果は、日本人において、生活習慣の欧米化により腸内細菌叢は変化し、その中でも、ある特定の腸内細菌が、インスリン抵抗性の増大に関与している可能性があることを示唆した。

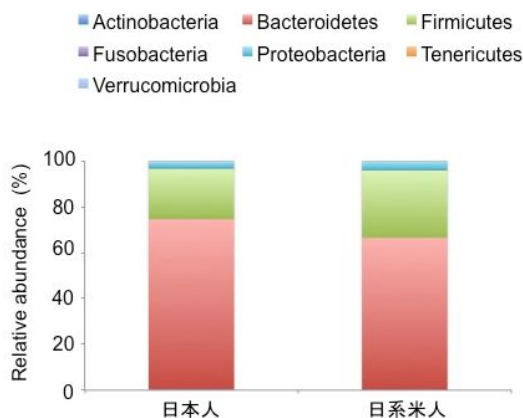


図1 門レベルにおける日本人と日系米人の腸内細菌叢

HFHSD 負荷マウスは、NCD 負荷マウスと比較して、肥満を呈し、インスリン抵抗性およびNASHを発症した。腸内環境については、HFHSD 負荷マウスはNCD 負荷マウスに比し、Coriobacteriaceae や Erysipelotrichaceae の割合の増加といった腸内細菌叢の変化や、腸管炎症が惹起されることを認めた。-グルコシダーゼ阻害薬であるミグリトール(M)の投与は、HFHSD 負荷によるこれらの腸内環境の変化の一部を正を伴い(図2、3) NASHの発症が抑制することを報告した(Kishida Y, et al. *J Gastroenterol.* 52, 2017)。この結果からも、腸内環境は、MetSの有用な治療標的になりうると思われる(Okubo H, et al. *Curr Med Chem.* 25, 2018.)。

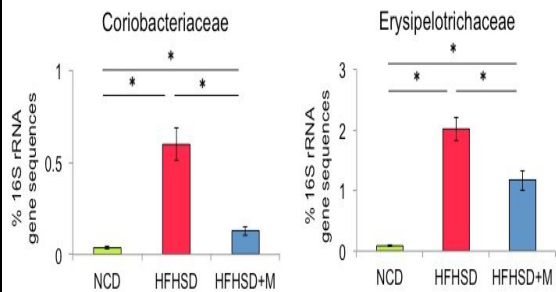


図2 HFHSD 負荷マウスへのミグリトール(M)投与による腸内細菌の変化 (* $p < 0.05$)

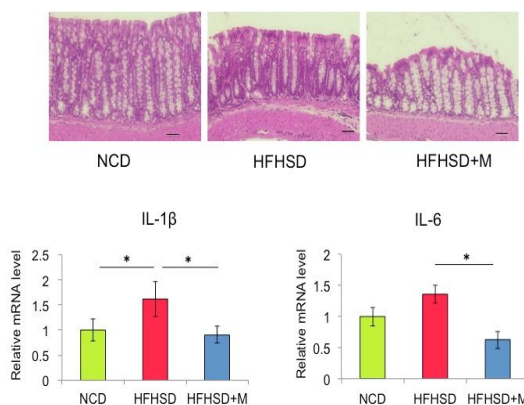


図3 HFHSD 負荷マウスへのミグリトール(M)投与による腸管炎症の抑制 (* $p < 0.05$)

RNA-SeqでNCD 負荷マウスとHFHSD 負荷マウスの腸管の遺伝子発現を網羅的に解析した。免疫や各種トランスポート関連遺伝子の発現が変化していることを認めた。これらの変化は、ヒトにおいても、欧米食による腸内環境の変化として認められ、MetS発症に関与している可能性がある。しかしながら、その中に、腸管特異的に発現する分泌蛋白で、ヒトの便や血液において測定可能であるものを見出すことができなかった。ヒトにおけるMetS発症に関する便や血液で測定可能な腸管由来メディエーターの探索には、異なるアプローチが必要であると考えている。

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)

1. Kishida Y, Okubo H, Ohno H, Oki K, Yoneda M: Effect of miglitol on the suppression of nonalcoholic steatohepatitis development and improvement of the gut environment in a rodent model. *J Gastroenterol.* 52(11): 1180-1191, 2017. 査読有
2. Okubo H, Nakatsu Y, Kushiya A, Yamamoto T, Matsunaga Y, Inoue MK,

Fujishiro M, Sakoda H, Ohno H, Yoneda M, Ono H, Asano T. Gut microbiota as a therapeutic target for metabolic disorders. *Curr Med Chem.* 25(9): 984-1001, 2018. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 岸田祐美, 大久保博史, 前田修作, 大野晴也, 沖健司, 米田真康. Miglitol 投与による腸内細菌を含めた腸内環境の変化を介した非アルコール性脂肪肝炎発症抑制機構の検討. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2016/5/19-21, 京都, 日本
2. 山本 祐太郎, 大久保 博史, 大野晴也, 沖 健司, 米田 真康. 日本人と日系米人における腸内細菌叢の違いと肥満の関連. 日本糖尿病学会中国四国地方会第 55 回総会. 2017/11/10-11, 岡山, 日本
3. Hirofumi Okubo, Yumi Kishida, Haruya Ohno, Kenji Oki, Masayasu Yoneda. Gut microbiota as a therapeutic target for non-alcoholic steatohepatitis. World conference on prebiotics and probiotics 2017. 2017/11/20-22, Genève, Switzerland.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
特記事項なし

〔その他〕
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大久保 博史 (OKUBO HIROFUMI)
広島大学・病院・医科診療医
研究者番号 : 80770734

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし