

令和元年6月11日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K12911

研究課題名(和文) タンパク質を中心とした栄養バランスと質の違いによる胆汁酸-腸内細菌相互作用解明

研究課題名(英文) Different Amino Acids Quality and Quantity and Metabolic Syndrome: Interaction between Bile Acids and Microbiota

研究代表者

横山 葉子 (YOKOYAMA, Yoko)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・特任助教

研究者番号：10617244

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)：エネルギー源となる栄養素の最適なバランスは明らかになっていない。ヒトの臨床研究のメタアナリシスではタンパク質増加による顕著な代謝疾患改善効果は確認されなかった。実験動物での研究の結果、タンパク質低下により代謝疾患改善効果が確認された。メカニズム解明のため、胆汁酸組成、腸内細菌叢、腸内細菌叢代謝産物、網羅的遺伝子発現解析を実施した。タンパク質低下群では腸内細菌叢解析および代謝産物解析の結果、腸内細菌叢の変動および盲腸内容物中に抗老化物質の増加が見られ、栄養バランスの変動により約30種類胆汁酸組成・腸内細菌叢・胆汁酸シグナル応答性における差異および複雑な関連性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、タンパク質の量および質の違いのエビデンスを構築することを目標に、栄養疫学研究および基礎医学研究の融合研究により栄養バランスの代謝疾患への影響を明らかにした。動物実験だけではなくヒトでも結果をメタアナリシスで示し、さらにそのメカニズムを明らかにできれば説得力を持ってリアルワールドにダイレクトに還元可能である。近年の低炭水化物ダイエットの広がりを考慮すれば科学的エビデンス構築は喫緊の課題であり、本研究結果は日常生活での食選択を行う際の強力なエビデンスのひとつとなりうる。

研究成果の概要(英文)：The optimal balance of nutrient sources of energy has not been clarified. The meta-analysis did not confirm the metabolic disease improvement effect by higher protein diet. As a result of research on experimental animals, metabolic diseases were improved by lower protein diet. Bile acid composition, intestinal microbiota, metabolites, and microarray were performed to clarify the mechanism. In the lower protein group, brown adipose tissue function were improved. In the lower protein group, as a result of microbiota and metabolite analysis, anti-aging substance in cecal contents were increased. Differences and complex associations between 30 kinds of bile acids composition and microbiota by nutrient balance were clarified.

研究分野：栄養疫学

キーワード：胆汁酸 栄養バランス 腸内細菌 糖尿病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、世界的に広がりを見せている低炭水化物ダイエットは、タンパク質の全体に占める量が増加することから、尿酸値の上昇や腎臓への負担増加に伴う慢性腎臓病の進行など健康障害の可能性が指摘されており、Noto らの複数のコホート研究のメタアナリシスでは死亡リスクが増加した (Plos One 2013:e55030)。しかし現状では学会レベルでも見解が分かれており、長期的な代謝への影響は不明である。これまで脂肪のバランス (脂肪のエネルギー比) については比較的研究が進んできたが、タンパク質・炭水化物のバランスはここ数年に重要な研究が散見され、現在エビデンスが蓄積されつつある段階である。例えばSolon-Bien らの研究では、マウスに3大栄養素のバランスを変化させた餌を投与し、低タンパク質食を摂取した群が最もメタボリックシンドローム (MS) 発症リスクが低く、寿命が延長した (Cell Metab 2014: 418-430)。さらにヒトの研究でもLevin らは米国国民健康栄養調査を用いた疫学研究的解析の結果、60 - 65 歳の成人では高タンパク質摂取群で低タンパク質摂取群と比較して、がんによる死亡リスクが4倍に増加し (Cell Metab 2014: 407-417)、マウスだけではなくヒトでも同様の傾向が指摘されている。さらに興味深いことにLevin らの研究では、この傾向はタンパク質源が動物性タンパク質であった場合にのみ有意な差がみられ、植物性タンパク質の場合、タンパク質の量を変えてもがんの死亡リスクは有意に増加せず、タンパク質源の違い (質) が何らかの影響を与えていることを示唆している。本研究ではアミノ酸 - 腸内細菌 - 胆汁酸組成の変化の相互作用が疾患発症と関与する可能性に着目し、これらを明らかにする目的で胆汁酸組成および腸内細菌叢に注目したメカニズムの検討を行う。

### 2. 研究の目的

食は健康に直結する環境要因として疑いないが、個々の栄養素をどのバランスで摂取すべきかという食事パターンレベルのエビデンスは圧倒的に不足している。ここ数年、3大栄養素のタンパク質のバランスが寿命や代謝疾患に関与することを示唆する研究がいくつか発表されたがそのメカニズムは明らかになっていない。本研究では、栄養素のバランスを変化させた場合の1) ヒトでの代謝疾患への影響をメタアナリシスにより解析し、2) 実験動物でのメカニズム解明とを組み合わせた融合研究を目的とする。メカニズム解明では、予備検討で差が示唆され、かつ論理的にも関与が予測されるアミノ酸・胆汁酸・腸内細菌の相互作用に焦点をおく融合研究を実施し、リアルワールドの食選択に直結するエビデンスを構築することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 栄養疫学研究による臨床研究のメタアナリシス

高タンパク質摂取群と低タンパク質摂取群とを比較した介入研究を系統的にレビューし、糖尿病関連指標である血中グルコース、HbA1c との関連をメタアナリシスにより解析する。参入基準は介入研究、介入期間が4週間以上、対象者20歳以上の男女、脂質の量はコントロールされていることとした。抽出したデータはRandom Effect Modelを用いて統合した平均値の差を算出する。加えてサブグループ解析、出版バイアスの検討も行う。

#### (2) 実験動物による基礎医学からのメカニズム解明

実験動物 (マウス) に22週間の介入試験を実施する (各群6匹)。蛋白質の量 (エネルギー比8%、15%、30%) と種類 (大豆、カゼイン) を調整した餌を作成する。介入後、1週間ごとに体重測定を行い、経口糖負荷試験および腹腔内インスリン投与試験を実施する。投与

後は解剖し、血漿および臓器のサンプルを採取する。

血漿中・肝臓でのアミノ酸分画測定を行う。

遺伝子発現解析：肝臓・脂肪・骨格筋のエネルギー代謝関連の中間代謝物、酵素、転写調節因子の mRNA 発現を qPCR および DNA マイクロアレイにより検討する。

血中のインスリンおよび GLP-1 測定：経口糖負荷試験時の血漿を用いて投与後 0、10、30、60 分値のインスリンおよび GLP-1 濃度を測定する。

血中の脂質 (Total Cholesterol、Triglyceride、Free Fatty Acid) やケトン体の測定を行う。

胆汁酸組成分析：糖・脂質代謝やエネルギー代謝を制御するシグナル分子でもある胆汁酸の組成との関連を検討するため、肝臓と糞中の胆汁酸組成を測定する。胆汁酸組成解析は東京医科大学教授本多彰先生の協力のもと実施した。

腸内細菌叢の分析：腸内細菌叢解析のため、新鮮な糞便を採取し直ちに液体窒素で冷却・凍結する。このサンプルを用いて分析を行う。腸内細菌分析は慶應義塾大学特任教授福田真嗣先生の協力のもと得られたデータは 16S rRNA 系統解析を行う。具体的には QIIME (Quantitative Insight Into Microbial Ecology) を用いて Operational Taxonomic Unit (OTU) を作成し、Ribosomal Database Project (RDP) の配列をリファレンスとして各 OTU の細菌種の推定を行う。

血中メタボライトの分析：代謝産物機能解析のため、CE-TOF/MS を用いたメタボローム分析を慶應義塾大学教授富田勝先生の協力のもと実施しターゲット分子を抽出する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 栄養疫学研究による臨床研究のメタアナリシス

複数のデータベースから、食事中のタンパク質の量を変更した臨床研究を検索し (N=3,542)、参入・除外基準を満たした 29 論文のメタアナリシスを実施した。タンパク質低下群に関しては倫理的問題からヒトにおける介入試験で参入・除外基準に合致するものは存在せず、タンパク質低下群のヒトにおけるメタアナリシスは実施できなかった。タンパク質増加群では標準タンパク質群と比較して血糖値は  $-1.046 \text{ mg/dL}$  ( $p=0.598$ ) であり、タンパク質増加による血糖値抑制効果は見られなかった。体重抑制効果は統計学的有意差は見られたものの、 $-1.487\text{kg}$  と効果量は少なかった。

##### (2) 実験動物による基礎医学からのメカニズム解明

経口糖負荷試験の結果、タンパク質の量が減少するほど血糖コントロール改善効果が見られた。最も血糖コントロールが悪化したタンパク質増加群では、タンパク質量は同じでも動物性タンパク質を植物性タンパク質に置き換えると改善が見られ、栄養素バランスとタンパク質の質の両者がメタボエイジングの調節に関与していた。メカニズム解明のため栄養シグナル伝達物質胆汁酸と、その組成の決定因子である腸内細菌叢との相互作用に着目した。胆汁酸組成解析の結果、糞便中胆汁酸のうち二次胆汁酸量が低タンパク質群および植物性タンパク質群で低下した (図 1)。二次胆汁酸は腸内細菌により代謝されることからタンパク質の量および質の変化により腸内細菌叢が変動し、腸内細菌による代謝産物である二次胆汁酸量に差が生じた可能性が示唆された。

次に腸内細菌叢の解析の結果、食事中的タンパク質の量の変動により腸内細菌叢に差異が生じ、タンパク質の量と質により成分が分かれた (図 2)。腸内細菌叢の差異が代謝疾患に与える

影響を明らかにするため、腸内細菌代謝産物の解析を行った。盲腸内容物のメタライト解析の結果、抗老化物質が低タンパク質群で上昇した。

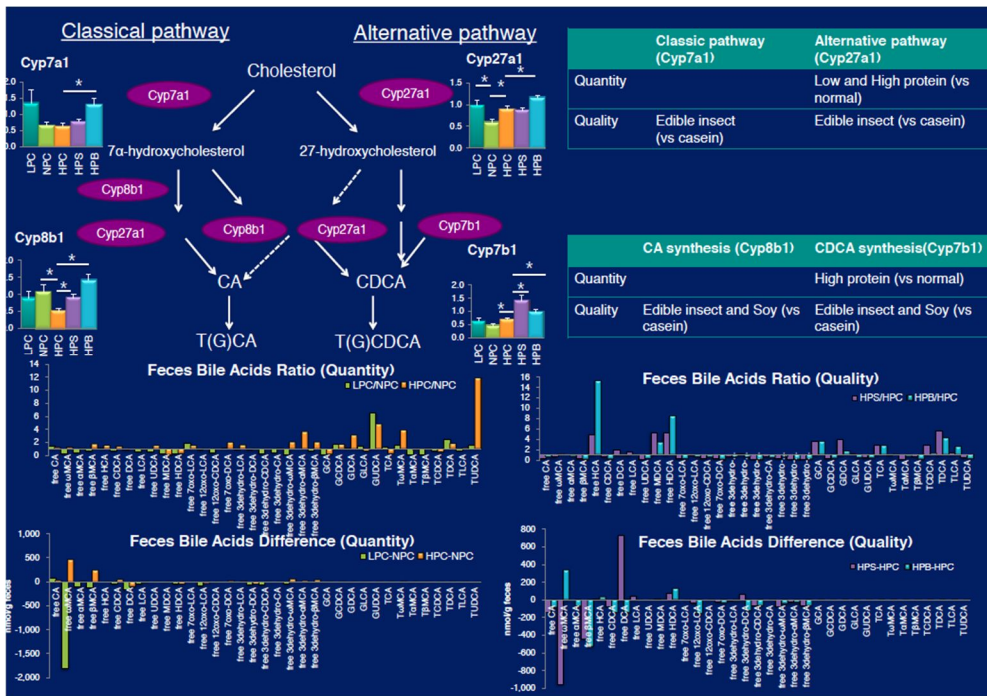


図1. 胆汁酸組成と代謝経路の解析

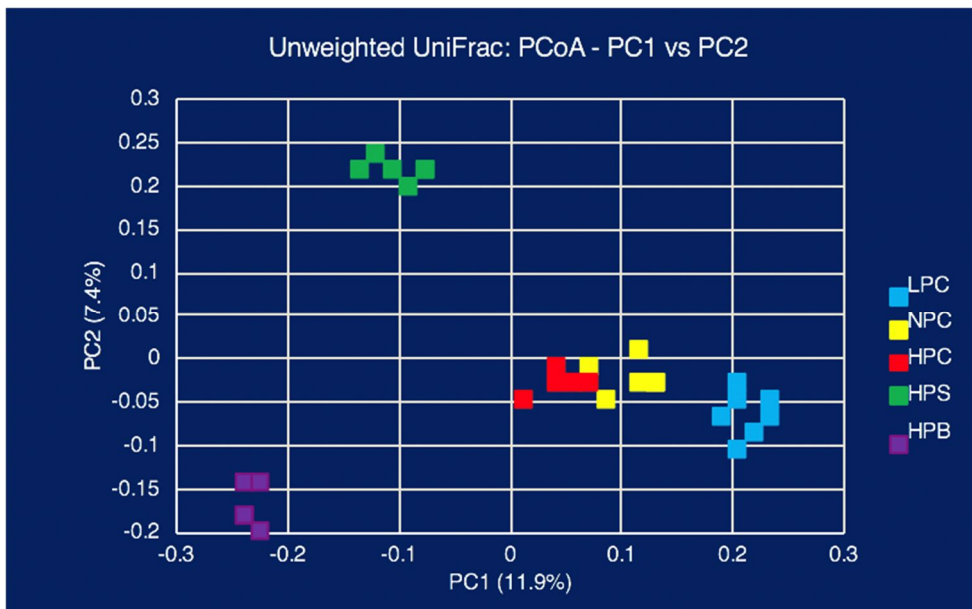


図2. 腸内細菌叢解析

本研究の結果、ヒトにおいてタンパク質増加群(低炭水化物食)の血糖コントロール抑制効果は見られなかった。基礎研究の結果、動物モデルでも同様の傾向でタンパク質の量が減少するほど血糖コントロールが抑制された。タンパク質量の変化に伴い腸内細菌叢の変動が確認され、腸内細菌叢の代謝産物の一つである二次胆汁酸量にも差異が見られ、タンパク質の量および質が、腸内細菌叢と二次胆汁酸の相互作用を変化させ、その下流のシグナル伝達に影響を与えていることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Yokoyama Y, Levin SM, Barnard ND. Association between plant-based diets and plasma lipids: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev.* 2017 Sep 1;75(9):683-698. doi: 10.1093/nutrit/nux030. (査読有)

Taoka H, Yokoyama Y, Morimoto K, Kitamura N, Tanigaki T, Takashina Y, Tsubota K, Watanabe M. Role of bile acids in the regulation of the metabolic pathways. *World J Diabetes.* 2016 Jul 10;7(13):260-70. doi: 10.4239/wjd.v7.i13.260. (査読無)

横山葉子, 中村杏菜, 横江亮, 田岡広樹, 渡辺光博. 栄養による胆汁酸代謝遺伝子制御からの代謝疾患へのアプローチ. *実験医学* 34(15): 2468-2474, 2016. (査読無)

〔学会発表〕(計2件)

Yokoyama Y, Tanaka K, Fukuda S, Hanazato N, Shinohara K, Ijyuin H, Yoshimoto K, Honda A, Tsubota K, Watanabe M. Dietary protein quality and quantity changed energy metabolism via liver and intestine interactions signals. XXV International Bile Acid Meeting: Bile Acids in Health and Disease 2018, Dublin, Ireland.

Kitamura N, Taoka H, Tanigaki T, Kawashima E, Yokoyama Y, Nakamura A, Watanabe M. Difference between two mice strains changes their bile acid composition, gut microbiota, and metabolic regulation system. XXV International Bile Acid Meeting: Bile Acids in Health and Disease 2018, Dublin, Ireland.

〔図書〕(計1件)

Yokoyama Y, Nishimura K, Barnard ND and Miyamoto Y. Blood pressure and vegetarian diets. Edit by Mariotti F. *Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention*, Academic Press, 2017.

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：渡辺 光博

ローマ字氏名：WATANABE, Mitsuhiro

研究協力者氏名：福田 真嗣

ローマ字氏名：FUKUDA, Shinji

研究協力者氏名：富田 勝

ローマ字氏名：TOMITA, Masaru

研究協力者氏名：本多 彰

ローマ字氏名：HONDA, Akira