

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：35309

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04213

研究課題名(和文)腸内細菌叢を標的とした網羅解析による身体活動不足パンデミックへの挑戦

研究課題名(英文) Exploring the improvement of gut microbiota on the resolution of physical inactivity pandemic.

研究代表者

矢野 博己 (Yano, Hiromi)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号：20248272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病の発症は、先進工業国に限らず大きな社会問題であり、その原因の1つとして腸内細菌叢の関与が指摘されるようになった。全世界で年間530万人が身体活動不足が原因で死亡している。運動習慣の獲得の有無もまた、腸内細菌叢に依存しており、腸内細菌叢の改善を促すことで、不活動予防効果が期待できることになる。本研究では、腸内細菌叢の変化によって高い活動性を示すようになるToll-様受容体5(Tlr5)遺伝子欠損マウスを用いて網羅的解析技術を駆使した解明に挑んだ。「どうすれば私たちの身体活動性を維持向上させることができるのか。」、身体活動性を左右する要因としての腸内細菌叢をターゲットに追求を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、明らかな腸内細菌叢の身体活動性への影響を観察するために、TLR5遺伝子欠損マウスを用いた実験を組むことで学術的独自性を担保しつつ、腸内細菌叢の変化を制御することの重要性、その結果として不活動を解消できる可能性が見えてきたものと考え。運動の必要性は理解しつつも、なかなか習慣化できない理由が腸内細菌叢にあるとする仮説に迫ることができたとするならば、プロバイオティクスや食生活改善、あるいは腸内細菌叢改善プログラムの実践によって、行動変容が誘導され、より積極的な運動習慣の獲得、身体活動性の向上、そして健康寿命の延伸へとつながる。非常に意義深いものであり、様々な波及効果を今後も期待する。

研究成果の概要(英文)：The development of lifestyle-related diseases is a major social problem in the worldwide. One of the reasons might be involvement of the gut microbiota. On the other hand, 5.3 million people die annually due to physical inactivity in the world. The regular exercise also might depend on the gut microbiota, which means that promoting improvement of the gut microbiota can be expected to have a preventive effect on inactivity. This study attempted to elucidate the mechanism of inactivity in Toll-like receptor 5 (Tlr5) gene-deficient mice, which show high inactivity due to changes in the gut microbiota, using comprehensive analytical techniques. How can we maintain and improve our physical activity?" We attempted to target the gut microbiota as a factor that influences physical activity.

研究分野：Exercise Immunology

キーワード：TLR5

## 1. 研究開始当初の背景

健康は人生を豊かに生きるために重要であり、健康づくりの3本柱は、運動と栄養と休養とされる。そのひとつである運動のアンバランス、特に運動不足は、わが国では喫煙、高血圧について、第3位の非感染性死因とされ、その死者数は毎年5万人 (Lancet 日本特集号, 2011)、全世界規模では530万人 (Lancet, 2016) とされる。WHO (2014) は、まさにパンデミック現象であると危機感を募らせる。運動・身体活動は、生活習慣病(循環器疾患、糖尿病、大腸ガンなど)や自立能力障害の予防、結果として死亡リスクの低下に効果があることは周知の事実である (ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription, 2000)。しかしながら、多くの人々が、運動・身体活動の重要性を理解しているにもかかわらず、行動に移せない現実がある(2000年度 - 2012年度健康日本21最終評価)。すなわち、知識の普及までは成功するが、実際の行動を変える(運動実施率の向上)には至っていない。介入研究は、一過性の効果を生むものの、定着には至らず (Dishman, Its impact on public health.1988; Dunn, et al., JAMA, 1999) 個人の置かれている環境や地域・職場における社会支援の改善などが今日的課題として注目されている。一方で、「わかっているけどできない、あるいは継続できない根本的な理由」があるのではないかという疑問が生じる。脳の健康づくりという観点から、脳のはたらきが37兆2千億のヒト体細胞の振る舞いを決定し、その結果が運動・身体活動の有無を左右すると言いたげではあるが、実はその脳を制御している存在として、人体にはヒト全細胞数の2.7倍、約100兆個の細胞集団、腸内細菌叢が共生していることも事実である。腸内細菌はそのコミュニティ、腸内細菌叢を形成し、腸脳相関の関係性(Grenham et al., Front Physiol, 2011)の中で、性格や心の状態に影響を与える要因として指摘されるようになり、サイコバイオティクスと呼ばれるようになった。自閉症や注意欠陥・多動性障害(ADHD)など、心や精神あるいは脳の病とされてきた病気と腸内細菌叢との関連性が次々と報告されるようになり、我々の行動に影響を及ぼしている可能性は高い (Cryan, et al., Nat Rev Neurosci, 2012)。実際、うつ病患者の腸内細菌叢は、多様性が低く (Jiang, et al., BBI, 2015; Kelly, et al., J Psychiatr Res, 2016)、Bacteroidetes、Proteobacteria、Prevotellaの増加、Firmicutes、Faecalibacterium、Ruminococcusの減少 (Jiang et al., BBI, 2015; Lui, et al., Clin Gastroenterol Hepatol, 2016)、さらにはLactobacillusやBifidobacteriumの減少が報告されている (Aizawa, et al., J Affect Disord, 2016)。動物実験でも、類似の変化 (Park, et al., Neurogastroenterol Motil. 2013; Omahony, et al., Biol Psychiatry, 2009; Yu, et al., J Pharm Biomed Anal, 2017) が報告され、腸内細菌と脳の関連が間接的に示唆される。

脳と免疫センサーToll-様受容体ファミリー (Toll-like receptors: TLRs) との関係性 (Hanke & Kielian, Clin Sci, 2011) は、TLRsと統合失調症 (Kesteren, et al., Transl Psychiatry, 2017) やうつ (Lisboa, et al., Front Neurol, 2016)、さらには自殺の病態 (Pandey, et al., BBI, 2018) との関連報告へと続く。その一方で、研究代表者らは、運動による疲労困憊状態と腸管上皮TLR5 (TLRsの中でも腸内細菌鞭毛を認識する受容体)の発現増強とに関連性があることを観察し (Uchida, et al., Immun Lett, 2014)、腸管免疫機能を介した運動制御機構の可能性を示唆する結果を得てきた。また、運動トレーニングによる腸内細菌叢の変化とともに、便移植法によって、運動経験の無いマウスでも、骨格筋や心臓の量的・質的变化を伴わず、高い活動性を示すようになる現象を観察している (Oyanagi, et al., JPFSM, 2018)。すなわち腸内細菌叢の変化は、身体活動性と関連する脳機能の変化をもたらす可能性が示唆されるのである。これらの学術的背景から、腸内細菌叢と脳機能とを結びつける経路として、腸管から吸収される腸内細菌細胞内毒素等が血液循環を介して脳に作用する液性因子仮説と、腸管に分布する自律神経系に腸内細菌が直接あるいは間接的に働きかけることによって脳に伝達される神経伝達経路仮説の2つの学説、あるいはその双方の作用によるという考え方が存在する (Cryan, et al., Nat Rev Neurosci, 2012)が、詳細の究明は現在進行形である。

## 2. 研究の目的

運動・身体活動を左右する新規の要因として近年注目されつつある腸内細菌叢をターゲットに追求を試みる。すなわち、本研究の目的は、運動・身体活動を左右する新規の要因として腸内細菌叢が影響する可能性について検討することであった。

## 3. 研究の方法

*Tlr5* 遺伝子欠損マウスの運動パフォーマンス解析: 実験動物には、4週齢、雄のC57BL/6J野生型 (wild type: WT, n=24) マウスと、同じバックグラウンドの*Tlr5* 遺伝子欠損型 (*Tlr5* knock out: KO5, n=24) マウスを使用した。飼育は20週間、安静 (Ctrl: C) または個別飼育で24時間アクセス可能な回転輪を設置した自発運動を負荷した (Wheel running: W)。糞便の回収は、0、4、10、20週目とし、糞便からのDNA抽出後、次世代シーケンス法で腸内細菌メタゲノム解析を実施した。また、20週間の飼育期間終了後、盲腸内容を回収し、HPLC法を用いて、コハク酸、乳酸、および短鎖脂肪酸 (酢酸、プロピオン酸、酪酸) 含量を測定した。

#### 4. 研究成果

TLR5 が感染時の身体活動性に深く関与し(Matsumoto, et al., EIR, 2008)、運動時の腸管からの初期感染防御にとって非常に重要な受容体であると考えられた。同時に、運動を制御している可能性についても示唆してきた(Uchida, et al., Immunol Lett, 2014)。そして、自発運動が *Tlr5* 欠損マウスで生じる肥満や糖代謝異常、脂質代謝異常、全身性の慢性低炎症を予防する可能性を明らかにする経緯の中で、WT マウスよりも高い活動性を維持し続けること、そしてこのマウスの腸内細菌叢は、極めて特殊な構成や多様性を示すようになるという知見を得たのである。さらに、FMT を試みると、体重や脂肪重量の増加、慢性炎症状態の惹起を抑制する。すなわち、運動によって変化した腸内細菌叢そのものが、運動が持つ抗肥満および抗炎症効果を発揮する可能性が見出された。TLR5 の腸内細菌叢の変化を介した運動への強い影響力を感じざるを得なかった。さらに、トレーニングマウスからの FMT による高い身体活動量の水平伝播を実現し(Oyanagi, et al., JPFMS, 2018)。

今回、自発運動開始 10 週目以降から、KO5W マウスは、WTW マウスと比較して高い活動性を維持していた ( $p < 0.01$ )。KO5 マウスの腸内細菌叢の $\alpha$ -多様性は (OTUs, Chao 1 Index, Shannon Index いずれも) WT マウスと比較して有意に高く、顕著な変化が観察されたが、自発運動の有無による影響は観察されなかった。また、腸内細菌叢 $\beta$ -多様性も、PC1(寄与率 35.98%)で遺伝的影響のみが示された。この結果は、腸内細菌叢の多様性レベルでは、高活動性を示す KO5W マウスの特徴は示されないことになる。

門のレベルでは、Bacteroidetes が、自発運動量との間に最も高い正の相関関係を示した。さらに、Bacteroidetes の説明変数として、*Odoribacter*, S24-7 (Muribaculaceae)、Bacteroides, Bacteroidales が採用された ( $R^2 = 0.941$ )。 *Odoribacter* は、酪酸産生能を有し、宿主の炎症を抑制する。Muribaculaceae は、マウスの消化管に高度に局在し、腸内細菌叢の数的優位なメンバーとして知られている。宿主との相互作用の性質については、現在までほとんど知られてはいないが、KO5W マウスで Muribaculaceae の存在量が増加すると、肥満の抑制に寄与する可能性があることを我々は既に示してきた。また、自発運動の有無で ROC 曲線を用いて AUC を算出すると、Bacteroidetes は、AUC: 0.9506、Muribaculaceae では、AUC: 0.9259 となり、高い有効性が示された。一方、Firmicutes では Clostridiales と *Turicibacter*, *Lactobacillus* が抽出され、Firmicutes は、AUC: 0.8395 であったが、Clostridiales + *Turicibacter* では、AUC: 0.9021 と高い有効性が示された。KO5W マウスの腸内細菌叢の特徴を、KO5C マウスとの比較から示す妥当な指標として、Muribaculaceae に対する Clostridiales + *Turicibacter* 比 (M/C+T) を提唱することができる。属、あるいは種レベルでの絞り込みを試みたが、KO5C では、*Turicibacter* のほか、*Bifidobacterium pseudolongum*, Coriobacteriaceae など複数の菌が有意な高値を示した。一方で、KO5W マウスでは、*Blautia* と *Candidatus Arthromitus* の 2 菌のみが KO5C と比較してわずかに高値を示すのみであった。

そこで、W 条件間の比較から、KO5W マウスの腸内細菌叢の特徴を探索したところ、*Parabacteroides distasonis* や *Helicobacter flexispira* が顕著な増加を示し、WTW マウスでは、*Bacteroides caccae* が高値であった。*P. distasonis* には、抗炎症性サイトカインの誘導、炎症性サイトカインの分泌抑制、腸内細菌叢の安定化に関与する (Kverka, et al., Clin. Exp. Immunol., 2011)。また、T reg の誘発 (Li, et al., PNAS, 2016)、TLR4/Akt シグナル伝達の抑制 (Koh, et al., Int. J. Cancer, 2018)、さらには、肥満患者で少ないとされる報告 (Cekanaviciute, et al., PNAS, 2017; Del Chierico, et al., Hepatology, 2017; Verdum, et al., Obesity, 2013) に加えて、動物実験でも肥満を軽減させるとされている (Wang, et al., Cell Rep., 2019)。一方、*B. caccae* については、肥満のバイオマーカーとなりうることで、近年指摘された (Liu, et al., Microbes Infect., 2022)。KO5W マウスの活動性に対する positive な腸内細菌として *P. distasonis*、逆に *B. caccae* は negative に作用する可能性が考えられる。

腸内細菌叢由来の短鎖脂肪酸に関連する菌の絞り込みが必要である。腸内細菌叢の変化による宿主への直接的な影響をもたらす重要な因子であるからである。KO5 マウスの盲腸内容物の酢酸は、WT マウスのそれよりもわずかに高かった ( $p = 0.05$ )。また、自発運動により酢酸の有意な低値が観察された ( $p < 0.05$ )。プロピオン酸も KO5 マウスの盲腸内容物では有意に高く ( $p < 0.01$ ) 運動により減少した ( $p < 0.05$ )。酪酸の有意な変化は、示されなかった。KO5 マウスにおいて、自発運動を負荷することで変動した腸内細菌と腸内細菌由来の短鎖脂肪酸との関係性について検討した結果、KO5W で顕著に高かった 5 つの菌種が抽出された。そしてそれぞれ、*Parasutterella* と *Parabacteroides* は、プロピオン酸との正の相関関係を示した。*Anaeroplasma* は、コハク酸と正の相関関係が示された。Bacteroidales は、コハク酸、酢酸、プロピオン酸と正の相関関係、*Mucispirillum* は、プロピオン酸とコハク酸との間に正の相関関係が示された。このように *Anaeroplasma* を除く 4 菌種ともにプロピオン酸との正の相関関係が示された。Scheiman ら (Nat. Med., 2019) は、マウスの直腸内にプロピオン酸を注入することで、トレッドミル走のパフォーマンス向上を報告している。加えて *Mucispirillum* は、運動性を制御する鞭毛 (flagella) を備えた菌であり、その構成タンパク flagellin は TLR5 によって認識されることを考慮するならば、KO5 マウスの腸管内での生存が担保される代表的な菌であると思われる。*Mucispirillum* が直接的に、宿主の活動性を制御する菌であるとは言えなが、複数の研究報告は、宿主の機能に貢献する菌であると報告されている (Loy, et al., mSystems, 2017; Herp, Cell Host Microbe, 2019; Song, et al., J. Sci. Food Agric., 2022)。

どうすれば、私たちの身体活動性を維持向上させることができるのか、との「問い」に対して、運動・身体活動を左右する新規の要因として腸内細菌叢の追求を試みた。驚異の小宇宙の中で生じる腸内細菌の生存戦略を解き明かすことで、身体活動不足パンデミックへの挑戦が実現できるものとする。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 宮川健, 青木孝文, 松生香里, 矢野博己	4. 巻 30
2. 論文標題 腸内フローラと健康	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 川崎医療福祉学会誌	6. 最初と最後の頁 15-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Chihiro Watanabe, Nanako Kobiki, Takafumi Aoki, Michael J. Kremenik, Takao Nagano, Hiromi Yano, Eri Oyanagi	4. 巻 9
2. 論文標題 Effects of voluntary exercise on plasma and urinary metabolites and gut microbiota in mice fed with a high-fat-diet	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Physical Fitness and Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 205-215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7600/jpfsm.9.205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 矢野博己	4. 巻 16
2. 論文標題 運動と免疫のpitfall	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アンチ・エイジング医学 - 日本抗加齢医学会 -	6. 最初と最後の頁 299-305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 矢野博己	4. 巻 138
2. 論文標題 生活習慣と腸内細菌叢	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 イルシー	6. 最初と最後の頁 34-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokogawa YI, Oyanagi E, Aoki T, Watanabe C, Miura S, Kremenik MJ, Yano H.	4. 巻 101
2. 論文標題 LPS-induced TNF- production is attenuated by intake with PHGG via gut microbial fermentation in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrition	6. 最初と最後の頁 111705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nut.2022.111705	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yano, H., Kobiki, N., Watanabe, C., Kremenik, M.J., Aoki, T., Uchida, M., Iemitsu, M., Oyanagi, E.
2. 発表標題 Voluntary wheel running influences on dynamics of gut microbiota F/B ratio in TLR5 deficient mice.
3. 学会等名 24th Annual Congress of the European College of Sport Science (Prague) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野博己, 内田昌孝, 渡邊知央, 小引菜々子, 三浦鈴夏, 横川由佳, 青木孝文, 家光素行, 小柳えり.
2. 発表標題 Tlr5遺伝子欠損マウスの腸内細菌叢と身体活動性.
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会 (茨城)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野博己, 三浦鈴夏, 小引菜々子, 渡邊知央, 横川由佳, 青木孝文, 小柳えり.
2. 発表標題 TLR5 ノックアウトマウスの腸内細菌叢形成パターンと自発運動習慣.
3. 学会等名 第84回日本体力医学会中国・四国地方会 (愛媛)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yano, H., Watanabe, C., Hamada, H., Kawashima, M., Aoki, T., Kremenik, M.J., Oyanagi, E.
2. 発表標題 Gut microbiota and short-chain fatty acids in TLR5 gene-deficient mice
3. 学会等名 The 15th Symposium of the International Society of Exercise and Immunology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢野博己
2. 発表標題 食事と運動が腸内フローラに及ぼす効果と健康
3. 学会等名 2022年度日本食品科学工学会中部支部シンポジウム及び支部大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢野博己, 渡邊知央, 青木孝文, 小柳えり, 長野隆男
2. 発表標題 食物繊維に運動で腸内細菌叢を・・・
3. 学会等名 日本食物繊維学会第27回学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中井 雄治 (Nakai Yuji) (10321788)	弘前大学・地域戦略研究所・教授  (11101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	長野 隆男  (Nagano Takao)  (20304660)	石川県立大学・生物資源環境学部・教授     (23303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関