

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K14018

研究課題名(和文)概日時計と腸内細菌叢の観点からみた食欲調節メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of appetite from the Perspective of circadian clock system and Intestinal Microbiota

研究代表者

原口 敦嗣(Haraguchi, Atsushi)

早稲田大学・理工学術院・講師(任期付)

研究者番号：80834671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、水溶性食物繊維摂取による腸内環境の改善が食欲に与える影響に関して、腸内環境と概日時計の観点から検証した。マウスに対して水溶性食物繊維である難消化性デキストリン含有の高脂肪食を給餌することで、摂食量の低下や腸内環境の改善が確認された。さらに、上記のマウスの糞便を別マウスに移植したところ、移植されたマウスの高脂肪食に対する摂食量が低下することも確認された。嗜好性に対する食欲と概日時計との関連までは見いだせなかったが、水溶性食物繊維の摂取が過剰な食欲の抑制に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果は、腸内細菌叢・腸内環境の改善が嗜好性の高い食べ物に対する過剰な食欲(本研究では高脂肪食に対する過剰な食欲)の抑制につながる可能性を示唆する基礎的データであり、今後のヒト栄養を考える上での基礎的情報となり得ると考えている。今後さらなる検証が必要ではあるが、本研究ではヒト応用の部分も踏まえて水溶性食物繊維の含有量を決定していることから、ダイエットが必要な肥満患者などに対して食欲を抑制するための新たなターゲットとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of improvement of the intestinal environment by soluble fiber intake on appetite. We confirmed that a high-fat diet containing resistant maltodextrin (RM-HFD), a soluble dietary fiber, decreased food intake and improved the intestinal environment. Furthermore, when fecal microbiota from the mice feeding with RM-HFD were transplanted into other mice, the transplanted mice showed low HFD intake. Although we observed no effects of RM-HFD on appetite from the viewpoints of circadian clock system, the results suggest that soluble fiber intake may be involved in the suppression of excessive appetite.

研究分野：時間栄養学

キーワード：腸内細菌叢 糞便移植 水溶性食物繊維 マウス 食欲

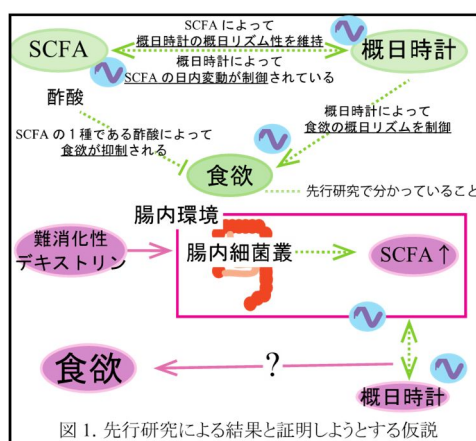
1. 研究開始当初の背景

概日時計と腸内細菌叢は生理機能の恒常性維持に関与しており、代謝機能や免疫機能だけではなく、食欲の調節にも関与していることが報告されている。概日時計はグレリンやレプチン、オレキシンなどの食欲制御に関わるホルモン分泌を介して、また腸内細菌叢は食物繊維を代謝発酵することで生成される短鎖脂肪酸(特に酢酸や酪酸)を介して食欲抑制に関与していることが報告されている。しかしこれらの先行研究では、概日時計の中核である視交叉上核の破壊や短鎖脂肪酸の直接投与(i.p.やp.o.など)によって検証されているが、概日時計や腸内細菌叢(特に腸内細菌叢)は食事内容の影響を受けることから、通常の食事レベルにおける食物繊維の含有量の変化が食欲制御に影響を及ぼすのかは不明であった。また先行研究では、概日時計と腸内細菌叢がそれぞれ独立した状態で食欲への影響について言及されているが、概日時計と腸内細菌叢が相互関係にあることから、本研究では概日時計と腸内細菌叢による複合的な観点から食欲調節に関わる新たな作用因いや経路の同定を行う必要があると考えた。

2. 研究の目的

体内の酢酸や酪酸濃度が増加することで食欲抑制が生じることが報告されているが、実際に腸内細菌叢改善作用を有する食品素材を用いて腸内細菌叢と食欲の関連について検証されていない。そこで本研究では実際に摂取されている食品素材である難消化性デキストリン(RM: Resistant Maltodextrin)を給餌することで腸内細菌叢のバランスの改善を介して食欲調節が生じるか調べる。また食欲に関係のあるバイオマーカーの概日リズムや腸内細菌叢の構成に関する日内変動について調べることで、食欲調節に関する新たな作用因子や経路の同定を行うことを目的とした。

動物を対象とした実験により、概日時計や腸内細菌叢による食欲調節のメカニズムに関する報告はされているが、概日時計と腸内細菌叢が相互作用することを考慮した研究や実際にそれらの結果をヒトに応用した研究はほとんど報告されていない。本研究の特色は、ヒトへの応用できるようにRMの給餌量を設定して、食欲への影響の確認や概日時計と腸内細菌叢による複合的な観点から食欲調節のメカニズム解明を目指すという点である(図1参照)。



3. 研究の方法

(1) 実験1: 難消化性デキストリン摂取が摂食量・リズムなどに与える影響について

腸内細菌叢の栄養源となる水溶性食物繊維である難消化性デキストリンを用いて、難消化性デキストリンの摂取が腸内細菌叢・腸内環境の改善を介して、食欲の抑制(高脂肪食の摂食量の抑制)が生じるのか検証した。通常食であるAIN-93M(不溶性食物繊維であるセルロースのみ含有)を給餌した対象群、高脂肪食(セルロースのみ含有)を給餌するセル群と高脂肪食に難消化性デキストリンを5%混餌した高脂肪食を給餌するデキ群を用意し、8週間飼育した。飼育期間中は、1週間ごとに体重・摂食カロリー量の測定を行った。また8週間飼育後、もう腸内容物を採取し、もう腸内容物のpHや内容物に含まれるSCFA量の測定を行った。

(2) 実験2: 腸内細菌叢の変化が摂食量・リズムに与える影響について

実験1の結果をもとに、実験1で得られた結果が難消化性デキストリン摂取自体によるものなのか、難消化性デキストリン摂取による腸内細菌叢の活性化が要因なのか検証することを目的とした。実験1と同様の条件でセル群とデキ群を用意し、それらのマウスから得られる糞便を他のマウスに移植する糞便移植(fecal microbiota transplantation; FMT)を実施し、移植されたマウス(FMT-セル群とFMT-デキ群)の高脂肪食の摂食量を毎日調べた。

FMTの方法を簡単に説明すると、糞便を提供するドナーマウスと提供されるレシピエントマウスを用意する。ドナーマウスからは移植する直前に糞便を採取する。レシピエントマウスは、ポリエチレングリコール投与による腸管洗浄を行い、糞便を溶解させた溶液を経口投与することで糞便を用いた腸内細菌叢の移植を行った。

(3) 実験3: 腸内細菌叢の改善が食欲を抑制するメカニズム解明

実験3では、腸内細菌叢の改善がなぜ食欲抑制を引き起こすのか、そのメカニズム解明を目指す。実験2と同様の条件でドナーマウスとレシピエントマウスを用意する。ドナーマウスは各給餌条件下で8週間飼育後、糞便移植を移植してから、レシピエントマウスは糞便移植をされて2日後にサンプリングを実施し、血清と食欲制御の中核である視床下部を採取した。ELISAやリア

ルタイム RT-PCR を行い、食欲関連ホルモンや遺伝子の発現量の変化について検証した。

4. 研究成果

(1) 実験 1: 難消化性デキストリン摂取が摂食量・リズムなどに与える影響について

腸内細菌叢の改善が食欲制御に関与するのか検証するために、対象群とセル群、デキ群を用意し、摂食カロリー量の測定を行った。その結果、難消化性デキストリンを長期間(4週間)飼育することで、高脂肪食を給餌しているにもかかわらず、デキ群の摂食カロリー量が通常食を給餌している対象群まで低下した。また、セル群とデキ群の摂食量を活動期である暗期と非活動期である明期に分けて測定したところ、セル群では活動期と非活動期の摂食量が同程度であったのに対して、デキ群では非活動期と比較して活動期の摂食量が多く、摂食量に関する日内変動がしっかり保たれていることが確認できた。

各給餌条件下で8週間以上飼育した後、もう腸内容物の pH およびガスクロマトグラフィーによる短鎖脂肪酸量の測定を行ったところ、デキ群でのみもう腸内容物の pH が有意に低いこと、各短鎖脂肪酸(酢酸と酪酸、プロピオン酸、乳酸)の存在量がデキ群で多くなっていることが確認された。

以上の結果から、水溶性食物繊維の一つである難消化性デキストリンを摂取することで嗜好性の高い高脂肪食に対する食欲が抑制されること、また腸内細菌叢が難消化性デキストリンを餌として短鎖脂肪酸を生成したこともしくは腸内細菌叢の構成が変化したことが原因である可能性が示唆された。

(2) 実験 2: 腸内細菌叢の変化が摂食量・リズムに与える影響について

実験 2 では、糞便移植を用いて摂食量抑制効果が腸内細菌叢の変化によるものなのか、それとも生成された短鎖脂肪酸によるものなのかについて検証を行った。その結果、セル群から糞便を移植された FMT-セル群で確認された高脂肪食給餌による摂食量の増加が、デキ群から糞便を移植された FMT-デキ群では確認されなかった(糞便移植後 2~4 日目までは有意差あり)。ただし、このような差は、FMT-セル群の摂食量が落ち着いてくるため、糞便移植 1 週間後にはなくなっている。また、詳しく活動期と非活動期に分けたところ、非活動期ではなく活動期の摂食量が抑制されていることが確認された。

別のレシピエントマウス(FMT-セル群と FMT-デキ群)を用意し、糞便移植 2 日後にもう腸内容物を採取して短鎖脂肪酸量を測定したところ、ドナーマウス(セル群とデキ群)で確認されていた短鎖脂肪酸量の差(デキ群で多い)がレシピエントマウスでは確認できなかった。

また、糞便移植の際に使用する溶液中に難消化性デキストリンが含まれている可能性も考えられた。糞便中の難消化性デキストリンを除去するのは困難なため、糞便移植 1 週間前から腸内細菌叢を減らすために抗生物質水を飲む群を準備し(抗セル群と抗デキ群)、糞便移植を行った。その結果、FMT-デキ群で確認されていた摂食量増加の抑制効果が FMT-抗デキ群では確認されなかった。

以上の結果から、難消化性デキストリン摂取による摂食量の抑制効果は、腸内細菌叢の構成の変化が関与している可能性が示唆された。

(3) 実験 3: 腸内細菌叢の改善が食欲を抑制するメカニズム解明

実験 3 では、ドナーマウス(セル群とデキ群、抗セル群、抗デキ群)とレシピエントマウス(FMT-セル群と FMT-デキ群、FMT-抗セル群、FMT-抗デキ群)を用意し、ドナーマウスは各給餌条件下で 8 週間以上飼育後(抗セル群と抗デキ群は最後 1 週間のみ抗生物質水を投与)、ドナーマウスは糞便移植 2 日後にサンプリングを行い、血清やもう腸内容物、視床下部の採取を行った。

血清を用いて食欲制御に関わるホルモン(レプチンやグレリンなど)分泌量を測定したところ、PYY や GLP-1 に関してセル群や FMT-セル群と比較してデキ群や FMT-デキ群で有意に増加していることが確認された。この有意差は抗セル群と抗デキ群の間や FMT-抗セル群と FMT-抗デキ群の間では確認されなかった。

もう腸内容物を用いて各種短鎖脂肪酸量を測定したところ、ドナーマウスではセル群と比較してデキ群で増加しているが、抗セル群や抗デキ群ではほとんど確認されなかった。一方、レシピエントマウスでは FMT-デキ群で多少高い値を示したが、全群同程度の値を示しており、有意差などは確認されなかった。

視床下部のサンプルを用いて、食欲制御に関わる神経ペプチドである *Npy* や *Pomc* の mRNA レベルの発現量をリアルタイム RT-PCR を用いて測定したところ、セル群や FMT-セル群に対してデキ群や FMT-デキ群で摂食量を抑制する方向に発現量が変化していた。このような変化は抗セル群や抗デキ群、FMT-抗セル群、FMT-デキ群では確認されなかった。

以上の実験結果から、短鎖脂肪酸量の変化ではなく、血中ホルモンの分泌量や視床下部における神経ペプチドの mRNA 発現量の変化が要因となり、難消化性デキストリン摂取による摂食量抑制効果が発揮されたことが示唆された。

(4) まとめ

以上の結果から、難消化性デキストリンなどの水溶性食物繊維を摂取することで、腸内細菌叢

の構成が変化し、食欲に関わる血中ホルモンの分泌量や視床下部における神経ペプチドの mRNA 発現量が変化することで、嗜好性の高い高脂肪食に対する過剰な食欲を抑制できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Haraguchi A, Saito K, Tahara Y, Shibata S.	4. 巻 60
2. 論文標題 Polygalae Radix shortens the circadian period through activation of the CaMKII pathway.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharm Biol.	6. 最初と最後の頁 689-698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13880209.2022.2048863.	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 -
1. 著者名 Oneda S, Cao S, Haraguchi A, Sasaki H, Shibata S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Wheel-running facilitates phase advances in locomotor and peripheral circadian rhythm in social jet lag model mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Physiol.	6. 最初と最後の頁 821199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2022.821199.	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 -
1. 著者名 Haraguchi Atsushi, Du Yao, Shiraishi Rena, Takahashi Yuki, Nakamura Takahiro J., Shibata Shigenobu	4. 巻 20
2. 論文標題 Oak extracts modulate circadian rhythms of clock gene expression in vitro and wheel-running activity in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sleep and Biological Rhythms	6. 最初と最後の頁 255 ~ 266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s41105-021-00365-2	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 -
1. 著者名 Haraguchi Atsushi, Sato Shuhei, Kusano Shuichi, Ito Kaede, Yamazaki Tomohiro, Ryan Conn, Sekiguchi Masataka, Shibata Shigenobu	4. 巻 5
2. 論文標題 4'-demethylnobiletin-rich fermented Citrus reticulata (ponkan) attenuated the disturbance in clock gene expression and locomotor activity rhythms caused by high-fat diet feeding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological Rhythm Research	6. 最初と最後の頁 1 ~ 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09291016.2021.1968609	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 -

1. 著者名 Haraguchi A, Nishimura Y, Fukuzawa M, Kikuchi Y, Tahara Y, Shibata S.	4. 巻 38
2. 論文標題 Use of a social jetlag-mimicking mouse model to determine the effects of a two-day delayed light- and/or feeding-shift on central and peripheral clock rhythms plus cognitive functioning.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chronobiol Int.	6. 最初と最後の頁 426-442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07420528.2020.1858850.	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 -

1. 著者名 Motohashi H, Tahara Y, Whittaker DS, Wang HB, Yamaji T, Wakui H, Haraguchi A, Yamazaki M, Miyakawa H, Hama K, Sasaki H, Sakai T, Hirooka R, Takahashi K, Takizawa M, Makino S, Aoyama S, Colwell CS, Shibata S.	4. 巻 97
2. 論文標題 The Circadian Clock Is Disrupted in Mice With Adenine-Induced Tubulointerstitial Nephropathy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney Int.	6. 最初と最後の頁 728-740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2019.09.032.	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 該当する

1. 著者名 Yasuda S, Iwami S, Tamura K, Ikeda Y, Kamagata M, Sasaki H, Haraguchi A, Miyamatsu M, Hanashi S, Takato Y, Shibata S.	4. 巻 36
2. 論文標題 Phase resetting of circadian peripheral clocks using human and rodent diets in mouse models of type 2 diabetes and chronic kidney disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chronobiol Int.	6. 最初と最後の頁 851-869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07420528.2019.1594245.	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 -

1. 著者名 Motohashi H, Tahara Y, Whittaker DS, Wang HB, Yamaji T, Wakui H, Haraguchi A, Yamazaki M, Miyakawa H, Hama K, Sasaki H, Sakai T, Hirooka R, Takahashi K, Takizawa M, Makino S, Aoyama S, Colwell CS, Shibata S.	4. 巻 94
2. 論文標題 The Circadian Clock Is Disrupted in Mice With Adenine-Induced Tubulointerstitial Nephropathy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney Int.	6. 最初と最後の頁 728-740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2019.09.032.	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 -

1. 著者名 Haraguchi A, Komada Y, Inoue Y, Shibata S.	4. 巻 36
2. 論文標題 Correlation among clock gene expression rhythms, sleep quality, and meal conditions in delayed sleep-wake phase disorder and night eating syndrome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chronobiol Int.	6. 最初と最後の頁 770-783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07420528.2019.1585366.	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 -

1. 著者名 Orihara K, Haraguchi A, Shibata S.	4. 巻 21
2. 論文標題 Crosstalk Among Circadian Rhythm, Obesity and Allergy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E1884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21051884.	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 原口 敦嗣, 関口 優崇, 伊東 楓, 柴田 重信
2. 発表標題 腸内細菌叢改善が高脂肪食誘発性食欲促進に与える影響
3. 学会等名 第8回日本時間栄養学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原口敦嗣, ライアン弧音, 関口優崇, 尾根田諭, 伊東楓, 曹思遠, 田原優, 柴田重信
2. 発表標題 High-fat diet feeding at lunch or dinner lead to increase HFD calorie intake, to increase body weight, and to disrupt recognition function.
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原口敦嗣, 斉藤恵祐, 田原優, 柴田重信
2. 発表標題 The effects of Polygalae Radix on clock gene expression rhythm and free-running period
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2020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

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