

令和元年6月17日現在

機関番号：35309

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H03102

研究課題名(和文) 運動による腸内細菌叢制御を介したメタボリックシンドローム予防効果

研究課題名(英文) Protective impact of exercise on appearance of metabolic syndrome via changes in gut microbiota

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) 11,000,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームに対する腸内細菌叢の変化を介した運動習慣の予防効果について明らかにするために、メタボリックシンドロームを発症するToll様受容体5 (TLR5) 遺伝子欠損マウスを用いて検討した。安静飼育で生じるこの遺伝子変異マウスのメタボリックシンドロームは自発運動習慣によって減弱され、さらに慢性炎症の抑制と腸内細菌叢の変化が示された。随意運動がメタボリックシンドロームの悪化に対して腸内細菌叢の制御を介して調節できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタボリックシンドローム予防効果を検討した便移植実験例は報告されていない。しかし、運動習慣を有するドナーマウスからの便移植による、レシビエントマウスの体重抑制現象を観察した。便移植による肥満が解消されるという結果は、運動習慣による腸内細菌叢の改善効果を示唆するという点で、意義ある知見かもしれない。今後、アスリートの腸内細菌叢研究、さらにはサプリメントとして健康産業界へ参入してくる将来への可能性を予感させるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：To clarify the possibility of the preventive effects of exercise habits on metabolic syndrome through a change in the intestinal microbiota, exercise-induced changes in intestinal microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5 (TLR5), which develop metabolic syndrome, were investigated. The indicators of metabolic syndrome, which were observed in the gene knockout mice were attenuated by treatment of wheel-running. In addition, the knockout mice treated wheel-running showed both inhibition of chronic inflammation and changes in intestinal microbiota. These results suggest that voluntary exercise may be able to control the regulation of intestinal microbiota via TLR5 associated with deterioration of the metabolic syndrome.

研究分野：運動免疫学

キーワード：自発運動 TLR5遺伝子欠損マウス 高脂肪食 肥満症 F/B比

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

1. 研究開始当初の背景

全世界の肥満人口は 21 億人とも報告され (世界肥満実態[GBD]調査より)、日本も例外ではない。「減量に成功した国はひとつもない。」とさえ言われる現状である。さらに、普通の人と同じくらいの食事量なのにぼっちゃり体型で悩んでいる人も多い。Vijay-Kumar ら (*Science*, 2010) は、太りやすい体質に、腸内細菌叢の異常による感染症の可能性があることを指摘した。腸内細菌の鞭毛を形成するたんぱく質フラジェリンを認識する TLR5 (Akira et al., *Cell*, 2006) の遺伝子欠損 (*Tlr5*^{-/-}) マウスは、腸内細菌叢の変化に由来したメタボリックシンドロームを発症する。これまでも、腸内細菌叢とメタボリックシンドロームの発症について報告され、注目されてきた。実際、Gordon ら (*Nature*, 2006) の研究チームは、肥満型は、やせ型と比較して、腸内細菌 *Firmicutes/Bacteroidetes* 比が高くなるとした。また正常マウスであっても、メタボリックシンドロームを発症した *Tlr5*^{-/-} マウスの便を移植すると、メタボリックシンドロームを発症してしまう (Vijay-Kumaret al., *Science*, 2010)。

一方、我々は、この TLR5 が感染時の身体活動性に深く関与する可能性、さらに高強度運動によってその発現が増強する可能性について報告してきた (Matusmoto et al. *Exerc Immunol Rev*, 2008, Uchida et al., *Immun Lett*, 2014)。周知の事実として、これまで運動は、エネルギー消費量の増大、代謝の亢進による内臓蓄積脂肪の減少をとめない、高脂血・高血糖・高血圧など、種々のメタボリックシンドロームの発症予防・改善効果 (Pitsavos et al., *Rev Diabet Stud*, 2006)、さらに大腸がんの予防効果 (Wolin et al., *Br J Cancer*, 2011) などをもたらす。しかし、メタボリックシンドロームを予防する運動の効果は、腸内細菌叢の変化を介するものなのかどうかについては、未だ解明されてこなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、普通食でメタボリックシンドロームを発症する *Tlr5*^{-/-} マウスを用いて、腸内細菌叢の網羅的解析を行い、運動習慣による腸内細菌叢の変化を明らかにすることとした。さらに、近年関心の高まっている腸内細菌療法である便移植法を用いて、腸内細菌叢の変化を介した運動習慣のメタボリックシンドローム予防効果、および重症化改善効果の可能性を直接的に検討し、明らかにするとともに、運動効果をもたらす腸内細菌叢の中の原因菌の絞込みを目指すこととした。

3. 研究の方法

(1) 自発運動習慣がメタボリックシンドローム予防に及ぼす影響

4 週齢の C57BL/6 雄性野生型 (wild type: WT) マウス、および同週齢の TLR5 遺伝子欠損型 (*Tlr5*^{-/-}) マウスに、それぞれ自発運動条件 (wheel running: WR) と安静条件 (control: Ctrl) を 20 週間負荷する実験を実施した。

(2) 運動習慣マウス便移植が高脂肪食摂取マウスの肥満予防に及ぼす影響

4 週齢の C57BL/6 雄マウスを 5 グループ (Sham 便移植群, WT Ctrl 便移植群, WT WR 便移植群, *Tlr5*^{-/-} Ctrl 便移植群 (n=10), *Tlr5*^{-/-} WR 便移植群) に分けて実験を実施した。高脂肪食摂取による短期間肥満誘導型の飼育を実施し、すべてのマウスは抗生剤による腸内除菌を実施後、実験のマウス (ドナー) から回収した盲腸便、および滅菌 PBS のみ (Sham 便移植群) を、週 1 回 (20 mg / 200 μ l / 匹) の頻度で 3 回、ゾンデ投与を実施した。経過観察 (7 週間) 後、身体活動性の評価、メタボ発症評価、慢性炎症性疾患評価を行うとともに、回収した便の腸内細菌叢解析を行った。

(3) メタボ疾患モデルマウスへの便移植効果実験

高脂肪食摂取による短期間肥満誘導型飼育を実施した 10 週齢の C57BL/6 雄マウス (n=50) を使用し、実験と同様の便移植を実施後、身体活動性の評価、メタボ改善効果等を評価した。

(4) 抗生剤処理による原因菌絞込み実験

4 週齢の C57BL / 6 雄マウスを使用し、2 グループに群分け、それぞれ WR と Ctrl を負荷した。抗生剤処理 (AB) は、アンピシリンとネオマイシンの混合水を飲水させた。

(5) 原因菌絞込み解析

実験、
、
から得られた腸内細菌叢のメタゲノム解析データおよび個々の実験動物から得られた表現型に関するデータ原因から菌絞込みと腸内細菌プロファイル作製によるデータベース化を試みた。

4. 研究成果

(1) 自発運動習慣がメタボリックシンドローム予防に及ぼす影響

Tlr5^{-/-} マウスの自発運動量は、WT と比較しても高値を示した。TLR5 欠損による肥満の予防には、自発的な運動実施の機会を提供すれば、十分な効果が期待できること、同時に、心臓や骨格筋の有意な肥大から、トレーニング効果も観察された。*Tlr5*^{-/-} マウスの体重増加は体脂肪の増加に起因するものであった。*Tlr5*^{-/-} Ctrl マウスの血漿総コレステロール値の増加が観察され、この高値は *Tlr5*^{-/-} WR マウスでは改善され、WT Ctrl および WT WR マウスと同程度であった。*Tlr5*^{-/-} Ctrl で観察された肝脂質蓄積は、自発運動によって明らかに抑制され、空腹時血糖値は、*Tlr5*^{-/-} Ctrl マウスで高値を示し、同時に GTT の結果も *Tlr5*^{-/-} Ctrl で悪化し *Tlr5*^{-/-} WR で改善が観察された。肥満に伴う慢性炎症におよぼす自発運動の影響について、血漿、脂肪組

織および肝の TNF- α の動態から評価した。その結果、*Tlr5*^{-/-} Ctrl で高値を示し、*Tlr5*^{-/-} WR では有意な低下が観察された。このように、*Tlr5*^{-/-}マウスで観察されたメタボリックシンドロームを示す指標の多くが、自発運動によって軽減することが明らかとなった。

糞便 DNA の解析による腸内細菌叢の変化は、実験開始時に鞭毛を有する細菌群の多い *Bacteroidetes* 門の割合が高くなる *Tlr5*^{-/-}マウスの特徴が観察された。しかし、メタボリックシンドロームを発症した *Tlr5*^{-/-} Ctrl では、肥満との関連性が指摘されている *Bacteroidetes* 門の割合が低くなる肥満型の腸内細菌叢に変化していた。一方で、肥満マウスで減少する *Prevotellaceae* は *Tlr5*^{-/-}マウスで運動の有無にかかわらず検出された。このことから、KO5 は本来肥満になりにくい腸内細菌叢を有しているとなるが、実際にはメタボリックシンドロームを発症した。そして、自発運動を負荷すると、*Prevotellaceae* を有する効果が発揮されたかのように、*Firmicutes*/*Bacteroidetes* も改善されているマウスが観察された。

(2)運動習慣マウス便移植が高脂肪食摂取マウスの肥満予防に及ぼす影響

WR を負荷した *Tlr5*^{-/-}ドナーマウスからの便移植により、高脂肪食摂取にもかかわらずレシピエントマウスの有意な体重増加抑制が誘導された。すなわち、肥満予防効果が示された。同様の現象は、WT ドナーマウスからの便移植では観察されなかった。

(3)メタボ疾患モデルマウスへの便移植効果実験

WR を負荷した *Tlr5*^{-/-}ドナーマウスからの便移植により、メタボ症候群発症後の重症化予防（治療効果）をも有するののかについては明らかとならなかった。

(4)抗生剤処理による原因菌絞込み実験

抗生剤投与マウスの自発運動量は、Ctrl 群と比較して有意に低い値であった。体重は Ctrl 群で自発運動による有意な体重抑制が観察されたが、AB 群では、自発運動の影響は観察されなかった。体重当たりの心臓重量も、Ctrl 群では自発運動による有意な増加が観察されたが、AB 群では観察されなかった。自発運動は Ctrl 群の脂肪組重量抑制を誘導したが、AB 群では、SED 条件でも脂肪組重量は抑制されており、自発運動による影響も観察されなかった。一方で、摂食量は、両群ともに自発運動条件で有意に高い値が示された。AB 群では両条件ともに Ctrl 群と比較して明らかな盲腸肥大が観察され、腸内細菌叢の中では *Proteobacteria* の顕著な増加が生じていた。

(5)原因菌絞込み解析

4、8、14、24 週齢ごとの *Bacteroidetes* と *Firmicutes* との関係を比較した。4 週齢の段階では、*Tlr5*^{-/-}の影響は、観察されなかったものの、週齢を重ねるごとに腸内細菌への遺伝子欠損の影響が表れるようになり、24 週齢では、異なる回帰直線上に *Tlr5*^{-/-}および WT がプロットされ、そして相関係数の違いが顕著に表れるようになった。すなわち、*Tlr5*^{-/-}マウスの *Bacteroidetes* と *Firmicutes* は、ほぼ直線回帰上にプロットされ、相互関係性の強さが示された。また、*Tlr5*^{-/-}マウス 24 週齢段階での *Bacteroidetes* と *Firmicutes* の関係性を WR 条件と安静条件とで比較すると、直線回帰上で、WR 条件では *Bacteroidetes* > *Firmicutes*、安静条件では *Bacteroidetes* < *Firmicutes* という顕著な違いが示された。肥満誘導に關与する *Firmicutes*、および痩せに關与する *Bacteroidetes* の強い関係性が、単純に 1 遺伝子の欠損で示されたことは興味深い。また TLR5 の生体にとっての新たな重要性が示されたと言える。運動負荷による腸内細菌叢を介した肥満予防効果を検討する上で意味ある知見である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

- (1) 矢野博己：総説 生活習慣と腸内細菌叢。イルシー, 138: 34-41, 2019. [査読無し]
- (2) Oyanagi, E., Uchida, U., Kremenik, M.J., Yano, H.: Altered gut microbiota by voluntary exercise induces a high physical activity in high-fat diet mice. *J Phys Fitness Sports Med*, 7(1): 81-85, 2018. [査読有り]
- (3) Oyanagi, E., Uchida, M., Kremenik, M.J., Yano, H.: Reduction of voluntary physical activity in mice induced by toll-like receptor 7 agonist R-848. *J Phys Fitness Sports Med*, 7(3): 177-184, 2018. [査読有り]
- (4) Yano, H., Kremenik, M.J., Uchida, M., Oyanagi, E.: 【Review article】Benefits of post-stress immunosuppression: a viewpoint from exercise immunology. *J Phys Fitness Sports Med*, 7(3): 153-159, 2018. [査読有り]
- (5) Yano, H., Uchida, M., Saito, T., Aoki, T., Kremenik, M.J., Oyanagi, E.: Reduction of real-time imaging of M1 macrophage chemotaxis toward damaged muscle cells is PI3K-dependent. *Antioxidants*, 7(10): pii: E138, 2018. [査読有り]
- (6) 矢野博己, 小柳えり, 松生香里, 内田昌孝: 総説 運動と腸管免疫機能(腸内細菌)とのかかわり. *体育の科学*, 68 (1): 32-37, 2018. [査読無し]
- (7) 矢野博己, 内田昌孝, Michael J. Kremenik, 小柳えり: 総説 腸内細菌叢に関する最近の洞察と運動. *岡山体育学研究*, 23: 1-10, 2016. [査読有り]

[学会発表](計 38 件)

- (1) 矢野博己, 小引菜々子, 渡邊知央, 青木孝文, Michael J. Kremenik, 小柳えり: 自発運動による肥満予防効果と腸内細菌叢の変化. 第 8 回日本運動免疫学研究会スプリングセミナー,

2019.

- (2) **矢野博己**, 内田昌孝, 小引菜々子, 渡邊知央, 三浦鈴夏, 横川由佳, 青木孝文, 小柳えり: TLR5 遺伝子欠損マウスの自発運動負荷による腸内細菌叢の変化は高い活動性の獲得より先か? 第 83 回日本体力医学会中国・四国地方会, 2019.
- (3) **矢野博己**, 青木孝文, 小柳えり: 腸内細菌叢が身体活動性そして骨格筋に影響する? サルコペニアにも? 第 5 回大会シンポジウム 3【サルコペニア予防・改善のための運動・栄養効果と新たな分子機序】日本スポーツ栄養学会第 5 回大会, 2018.
- (4) **矢野博己**: 生活習慣と腸内細菌叢. ライフサイエンスシンポジウム【栄養と運動の基礎科学】「健康寿命の延伸につなげる栄養科学と運動科学の融合—基礎研究から応用研究まで—」, 第 9 回 ILSI Japan ライフサイエンスシンポジウム, 2018.
- (5) **Yano, H.**, Horii, N., Kremenik, M.J., Aoki, T., Uchida, M., Iemitsu, M., Oyanagi, E.: Gut microflora diversity is induced by resistance training in aged mice, but its acquired diversity might not be contributed with the high physical performance. 23rd Annual Congress of the European College of Sport Science, 2018 .
- (6) **矢野博己**, 青木孝文, 小柳えり: 老化と腸内細菌叢. 第 7 回日本運動免疫学研究会スプリングセミナー, 2018.
- (7) **矢野博己**, 青木孝文, 小柳えり: 老化促進マウス腸内細菌叢の多様性におよぼす運動の影響. 第 81 回日本体力医学会中国・四国地方会, 2018.
- (8) 青木孝文, 内田昌孝, 小柳えり, **矢野博己**: 腸内細菌叢の変化と骨格筋 *Tnf- α* 発現に及ぼす抗生剤投与の影響. 第 73 回日本体力医学会, 2018.
- (9) **矢野博己**, 内田昌孝, 渡邊知央, 小引菜々子, 青木孝文, 家光素行, 小柳えり: *Tlr5* 遺伝子欠損マウスの腸内細菌叢. 第 73 回日本体力医学会, 2018 .
- (10) **矢野博己**, 内田昌孝, 小引菜々子, 渡邊知央, 青木孝文, 小柳えり: 自発運動マウスの腸内細菌 F/B 比の動態. 第 82 回日本体力医学会中国・四国地方会, 2018.
- (11) **矢野博己**, 青木孝文, 渡邊知央, 小引菜々子, 小柳えり: 生活習慣病と腸内細菌叢. 平成 30 年度 小の月会函西支部会, 2018.
- (12) Oyanagi, E., Uchida, M., Kremenik, M.J., **Yano, H.** Gut microbiota in exercise trained Toll-like receptor 5 deficient mice inhibits fatty liver and hepatic inflammation. The 13th International Society of Exercise and Immunology (ISEI) Symposium, 2017.
- (13) **Yano, H.**, Oyanagi, E., Uchida, M., Kremenik, M.J. Altered gut microbiota by voluntary exercise in donor mice may contribute to high physical activity in recipient mice. The 13th International Society of Exercise and Immunology (ISEI) Symposium, 2017.
- (14) **矢野博己**, 内田昌孝, Michael J. Kremenik, 小柳えり: 腸内細菌叢を介した運動パフォーマンスの水平伝播の可能性を探る. 第 6 回日本運動免疫学研究会スプリングセミナー, 2017.
- (15) 小柳えり, 内田昌孝, 北村裕美, 永見邦篤, **矢野博己**: 運動トレーニングマウスからの糞便移植は肥満マウスの肝脂肪滴蓄積を抑制する. 第 79 回日本体力医学会中国・四国地方会, 2017.
- (16) **矢野博己**, 小柳えり: L-カルニチン代謝に関する腸内細菌への運動の影響. 第 79 回日本体力医学会中国・四国地方会, 2017.
- (17) 小柳えり, 内田昌孝, 北村裕美, 家光素行, 宮地元彦, **矢野博己**: 肥満マウスの肝脂肪滴蓄積に及ぼす TLR5 欠損マウスからの便移植の影響. 第 72 回日本体力医学会, 2017.
- (18) **矢野博己**, 小柳えり, 長野隆男: L-カルニチン代謝産物 TMAO に関する腸内細菌への運動の影響. 第 80 回日本体力医学会中国・四国地方会, 2017.
- (19) **矢野博己**, 内田昌孝, Michael J. Kremenik, 小柳えり: 腸内細菌叢を介した運動パフォーマンスの水平伝播. 平成 29 年度小の月会函西支部会, 2017.
- (20) **Yano, H.**, Uchida, M., Oyanagi, E., Iemitsu, M., Kremenik, M.J., Onodera, S., Miyachi, M.: Voluntary exercise attenuates obesity and systemic inflammation by alteration of gut microbiota in TLR5-deficient mice. 63rd Annual Meeting of the American College of Sports Medicine, 2016.
- (21) Oyanagi, E., Uchida, M., Kremenik, M.J., Iemitsu, M., Miyachi, M., **Yano, H.**: The gut microbiota of TLR5-deficient mice display elevated voluntary physical activity. 63rd Annual Meeting of the American College of Sports Medicine, 2016.
- (22) **矢野博己**, 内田昌孝, Michael J. Kremenik, 小柳えり: 抗生剤長期投与マウスの自発運動. 第 5 回日本運動免疫学研究会スプリングセミナー, 2016.
- (23) **矢野博己**, 内田昌孝, 小柳えり: 12 週間の自発運動習慣と腸内細菌叢. 第 77 回日本体力医学会中国・四国地方会, 2016.
- (24) **矢野博己**, 小柳えり, 内田昌孝: 腸内細菌叢と自発運動 (Gut microbiota collected from *Tlr5*^{-/-} mice does not affect voluntary physical activity in obese mice). 第 71 回日本体力医学会, 2016.
- (25) 小柳えり, 内田昌孝, クレメニック マイケル, 家光素行, 宮地元彦, **矢野博己**: 運動を負荷した TLR5 遺伝子欠損マウスの腸内細菌叢が自発運動量を増加させる. 第 71 回日本体力

医学会, 2016.

- (26) 内田昌孝, 小柳えり, 宮地元彦, 家光素行, **矢野博己**: TLR5 ノックアウトマウスの慢性低炎症に対する自発運動の影響. 第 71 回日本体力医学会, 2016.
- (27) **矢野博己**, 内田昌孝, 小柳えり: 長期抗生剤摂取マウスからの便移植による身体活動量と腸内細菌叢の変化. 第 78 回日本体力医学会中国・四国地方会, 2016.
- (28) 小柳えり, 内田昌孝, 永見邦篤, **矢野博己**: 運動トレーニングマウスの糞便移植が肥満マウスに及ぼす影響. 第 78 回日本体力医学会中国・四国地方会, 2016.
- (29) Uchida, M., Oyanagi, E., Iemitsu, M., Miyachi, M., Kremenik, M.J., Onodera, S., **Yano, H.**: Voluntary physical exercise affects metabolic syndrome by alteration of gut microbiota in TLR5-deficient mice. The 12th International Society of Exercise and Immunology (ISEI) Symposium, 2015.
- (30) Oyanagi, E., Uchida, M., Kremenik, M.J., Iemitsu, M., Miyachi, M., **Yano, H.**: Flagellin receptor TLR5-deficient mice display elevated voluntary physical activity associated with changes in gut microbiota. The 12th International Society of Exercise and Immunology (ISEI) Symposium, 2015.
- (31) **矢野博己**, 内田昌孝, 小柳えり: 自発運動が抗生剤長期投与マウスの腸内細菌プロテオバクテリアに及ぼす影響. 第 75 回日本体力医学会中国・四国地方会, 2015.
- (32) 内田昌孝, 小柳えり, 小野寺昇, **矢野博己**: マウスの腸内細菌叢の多様性に及ぼす抗生剤長期投与と自発運動の影響. 第 75 回日本体力医学会中国・四国地方会, 2015.
- (33) 小柳えり, 内田昌孝, 永見邦篤, 山口英峰, **矢野博己**: 自発運動がマウス腸内細菌叢に及ぼす影響. 第 75 回日本体力医学会中国・四国地方会, 2015.
- (34) **矢野博己**, 内田昌孝, 小柳えり: 抗生剤長期投与による腸内細菌叢の変化と自発運動. 第 70 回日本体力医学会大会, 2015.
- (35) 内田昌孝, 小柳えり, 佐藤幸治, 家光素行, 宮地元彦, 小野寺昇, **矢野博己**: TLR5 遺伝子欠損マウスのメタボリックシンドローム発症におよぼす自発運動の予防効果. 第 70 回日本体力医学会大会, 2015.
- (36) 小柳えり, 内田昌孝, Kremenik Michael, 佐藤幸治, 家光素行, 宮地元彦, **矢野博己**: TLR5 が自発運動に及ぼす影響. 第 70 回日本体力医学会大会, 2015.
- (37) 北村裕美, 内田昌孝, 小柳えり, **矢野博己**: 自発運動がオートファジー関連分子におよぼす影響. 第 70 回日本体力医学会大会, 2015.
- (38) **矢野博己**, 内田昌孝, 小柳えり: 自発運動マウスの盲腸便移植が活動性に及ぼす影響. 第 76 回日本体力医学会中国・四国地方会, 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。