

令和元年6月7日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05292

研究課題名(和文)胆汁酸-腸内細菌-生体シグナル伝達相互作用解明による生活習慣病個別化医療の推進

研究課題名(英文)Promotion of personalized medicine for lifestyle-related diseases by revealing bile acids, microbiota and cell signaling interaction

研究代表者

渡辺 光博(WATANABE, Mitsuhiro)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・教授

研究者番号：10450842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、胆汁酸は単に脂質の消化吸収を促進するだけでなく、生体内シグナル分子として代謝を調節していることが明らかになった。胆汁酸応答性の異なる2種系統マウスに胆汁酸を投与した際の代謝の差異に加えて、腸内細菌の影響を解析する目的で、抗生物質を投与し腸内細菌叢を変化させ、胆汁酸組成、マイクロアレイ、腸内細菌叢解析などオミックス解析を行った。その結果、2種系統マウスの胆汁酸による肥満・糖尿病抑制効果の有無には遺伝的背景による胆汁酸・脂質・コレステロール代謝の差異に加え、腸内細菌から代謝される胆汁酸組成の変化がそれぞれ相互的に作用し、複雑に影響を与えていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2系統マウスを用いた研究はR.Khanらによって精力的に行われ、PKC- など糖尿病を誘発する原因遺伝子の同定が行われてきたが、根本的なメカニズム解明には至っていない。しかしながら、我々が見出した2系統マウスにおける胆汁酸応答性による生活習慣病発症差異に加えて、胆汁酸代謝-腸内細菌-宿主遺伝的背景という新たな視点から本研究を推進することで、人の個人的発症差異が存在する生活習慣病誘発の根本的な原因を抽出することができ、全く新しい戦略に基づく個別化予防・治療法の提唱に結びつけることができると考えている。

研究成果の概要(英文)：In recent years, it has been clarified that bile acids not only promote digestion and absorption of lipids, but also regulate metabolism as signal molecules. Bile acids were administered to two strains of mice with different bile acids responsiveness, with and without antibiotics. Multi-omics analysis such as bile acids composition, DNA microarray, microbiota analysis were performed. In addition to the difference in bile acids, lipid and cholesterol metabolism due to genetic background, the change in bile acid composition metabolized by microbiota was different depending on the presence or absence of obesity / diabetes suppression effect by bile acid in two strain mice. It turned out that they interact and affect intricately.

研究分野：分子生物学

キーワード：胆汁酸 腸内細菌 糖尿病 肥満 消化器 代謝

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

1. 研究開始当初の背景

食事性刺激により、腸管へ分泌された胆汁酸の多くは回腸末端で吸収され腸肝循環により再利用されるが、吸収されなかった残りの胆汁酸は大腸に存在する腸内細菌によって二次胆汁酸や脱抱合された胆汁酸が生成される。近年、腸内細菌による胆汁酸組成の差異が腸管 TGR5, FXR 活性に影響し、宿主の体重減少や脂質代謝、癌など多くの疾患に影響を与えることを示唆する論文が複数報告されている。これらの研究進捗により、胆汁酸組成が様々な疾患発症に重要であることが認識され始めているが、これまでの研究では約 30 種の胆汁酸が関与する代謝・シグナル経路の複雑性から腸内細菌-胆汁酸-疾患発症機構相互関連性について十分に解明されていないのが現状である。

本研究では 2 系統マウスの約 30 種胆汁酸組成-腸内細菌菌叢-胆汁酸シグナル応答性の相互関係解明を推進し、肥満・糖尿病をはじめとする生活習慣病発症原因を宿主遺伝的背景を含め解明することにより、新たな研究領域を創生し、人類に新たな個別化予防・治療戦略を提供することを目的とする。

2. 研究の目的

肝臓でコレステロールから合成される胆汁酸は、生活習慣病を予防する手段として注目されているが、胆汁酸は単に脂質の消化吸收を促進するだけでなく、生体内シグナル分子として全身の代謝を調節していることが近年明らかになった。高脂肪食誘発性の肥満や糖尿病は胆汁酸を混餌投与することで抑制できることが知られており¹、我々は 2 系統のマウスを使用し、胆汁酸による肥満・糖尿病抑制効果を検討した。その結果 A マウスでは胆汁酸の効果が認められたのに対し B マウスでは認められなかった。この 2 系統のマウスの遺伝的背景の違いによる生活習慣病発症差異に関する研究はハーバード大学ジョスリン糖尿病センター所長 R. Kahn らにより取り組まれているが²³、現在も決定的な原因は明らかにされていない。しかし、我々はこの 2 系統の胆汁酸応答性が異なることを既に見出し、これにより 2 系統マウスの肥満・糖尿病発症差異には胆汁酸代謝が密接に関連していることが示唆される。そこで腸内細菌叢と胆汁酸シグナル応答性の相互作用解明を推進し、肥満・糖尿病をはじめとする生活習慣病発症原因を宿主遺伝的背景も含め解明することにより、新たな研究領域を創生し、人類に新たな個別化予防・治療戦略を提供することを目的として本研究を行った。本研究では胆汁酸応答性の異なる 2 系統のマウスに胆汁酸を投与した際の代謝の差異に加えて、抗生物質を投与し腸内細菌叢を変化させることで胆汁酸による肥満抑制効果にどのような影響があるかを検討した。

3. 研究の方法

6 週齢の 2 系統マウス (n=6) に通常食、高脂肪食、胆汁酸混餌食 (0.5%CA) を与え、胆汁酸に加えて抗生物質を投与した群も作成し腸内細菌叢を変化させた。投与 8 週、10 週で OGTT (経口糖負荷試験) 及び IP-ITT (腹腔内インスリン負荷試験) を行い血清サンプルを採取した。投与 14 週で解剖を行い糞便、血液、臓器を採取し脂質測定や胆汁酸組成解析、腸内細菌解析、qPCR を用いた遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 胆汁酸による肥満糖尿病抑制効果の差異

A マウスでは投与 2 週目で胆汁酸による有意な体重抑制効果が確認されたのに対して、B マウスでは有意な差は確認されなかった (Fig. 1 A-B)。経口糖負荷試験の結果、A マウスでは随時血糖及び AUC において有意に耐糖能が改善したのに対して B マウスでは変化が見られなかった (Fig. 1 C)。

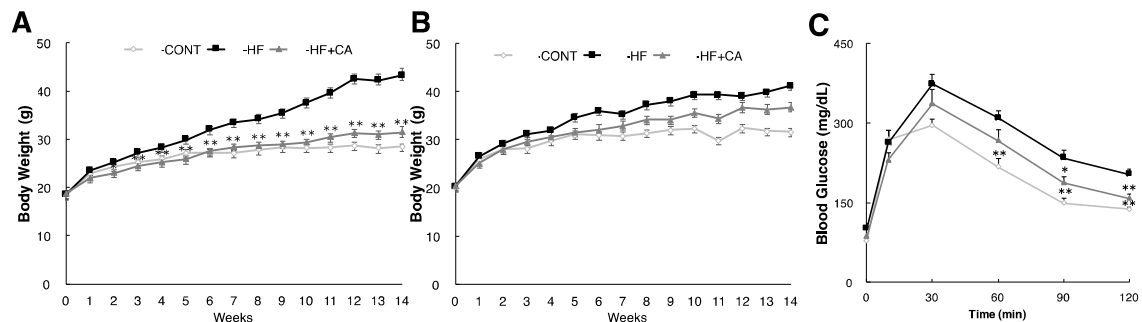


Fig. 1 2 系統マウスにおける胆汁酸による肥満・糖尿病抑制効果

(A) A マウス体重推移 (B) B マウス体重推移 (C) A マウス経口糖負荷試験 (OGTT) 結果 * : p<0.05 ** : p<0.01 vs. HF

(2) 2系統マウスの胆汁酸代謝の差異

肝臓及び糞便中の胆汁酸分析を行った結果、胆汁酸投与時の2系統の総胆汁酸量が大きく異なっておりAマウスではBマウスの約2倍となっていた。加えて肝臓中のTDCA（タウロデオキシコール酸；図中赤色）や糞便中のDCA（デオキシコール酸；図中紫色）などの二次胆汁酸がBマウスのみで顕著に増加していた(Fig. 2)。

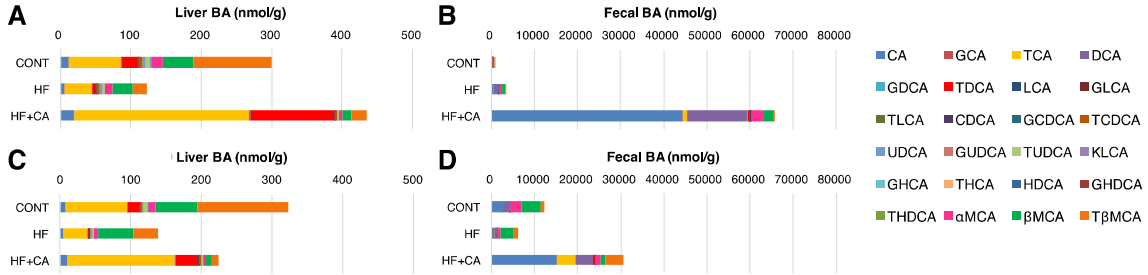


Fig. 2 肝臓・糞便中の胆汁酸分析結果

(A) Aマウス肝臓中胆汁酸量 (B) Aマウス糞便中胆汁酸量 (C) Bマウス肝臓中胆汁酸量 (D) Bマウス糞便中胆汁酸量

(3) 腸内細菌が胆汁酸の肥満抑制効果に与える影響

Aマウスではバンコマイシンを投与することで胆汁酸による体重抑制効果が有意に減少したがBマウスでは抗生物質による影響は確認されなかった(Fig. 3 A-B)。胆汁酸による耐糖能改善効果においてもバンコマイシンの投与により減少した(Fig. 3 C)。一次胆汁酸を二次胆汁酸に代謝する菌として知られるクロストリジウム科⁴の細菌はグラム陽性菌をターゲットとするバンコマイシンを投与することで有意に減少していた(Fig. 3 D)。

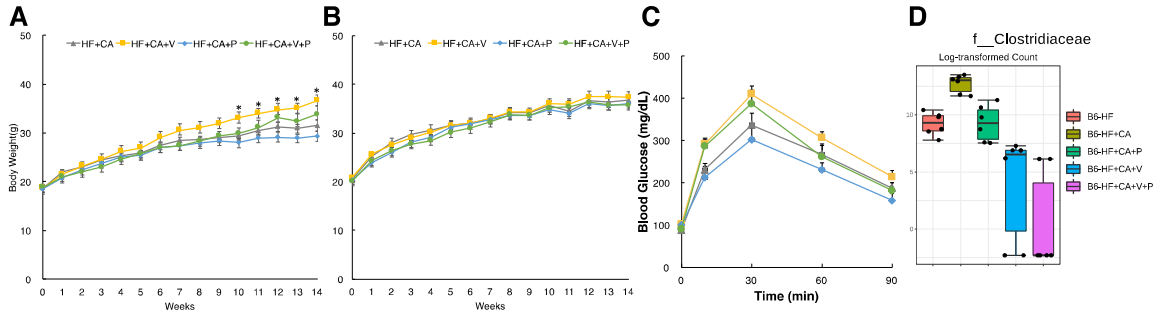


Fig. 3 抗生物質投与が胆汁酸の肥満抑制効果に及ぼす影響

(A) Aマウス体重推移 (B) Bマウス体重推移 (C) Aマウス経口糖負荷試験(OGTT)結果 (D) 腸内細菌 単変量解析結果

*: $p < 0.05$ vs. HF+CA

腸内細菌叢の変化により胆汁酸組成がどのように変化したのかを検討した結果、バンコマイシンを投与し二次胆汁酸産生菌を殺菌することで、両系統において肝臓及び糞便中のTDCAやDCAなどの二次胆汁酸が消失した。また、抗生物質投与群においてもBマウスでは肝臓、糞便の両方における二次胆汁酸量がAマウスと比較してかなり少ないことが明らかになった(Fig. 4)。

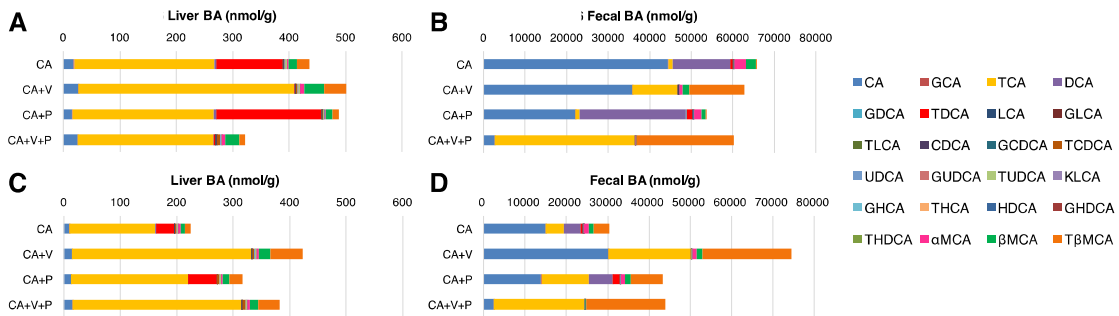


Fig. 4 肝臓・糞便中の胆汁酸分析結果

(A) Aマウス肝臓中胆汁酸量 (B) Aマウス糞便中胆汁酸量 (C) Bマウス肝臓中胆汁酸量 (D) Bマウス糞便中胆汁酸量

(4) 総括

胆汁酸による肥満抑制効果がAマウスでは認められ、Bマウスでは認められない大きな理由は腸内細菌叢の差異による胆汁酸代謝の違いであることが示唆された。Aマウスでは胆汁酸を投与することで肝臓や糞便中の二次胆汁酸量が増加するのに対してBマウスではあまり変化が見られなかった。二次胆汁酸はTGR5の強力なリガンドとして褐色脂肪細胞(BAT)においてエネルギー

ー代謝を亢進し¹、腸管においてGLP-1の分泌を促進しインスリン抵抗性を改善する⁵。BATにおけるエネルギー代謝関連遺伝子発現を測定した結果B6マウスでは胆汁酸投与で代謝が亢進するのに対してBマウスでは変化がなく胆汁酸解析の結果と一致した(Fig. 5 A)。つまり、2系統のマウスの腸内細菌叢の差異が胆汁酸組成に変化をもたらし、肥満抑制効果の有無に影響している可能性が示唆された。また、バンコマイシンにより二次胆汁酸産生菌を殺菌することで胆汁酸による肥満抑制効果が減少することを示したが、BATにおける遺伝子発現解析でもエネルギー代謝が抑制されていることがわかる(Fig. 5 B)。Bマウスで腸内細菌叢を変化させても胆汁酸の効果に影響がなかったのは、Bマウスでは元から胆汁酸を代謝する腸内細菌が少なく二次胆汁酸量が少なかったからであると考えられる。

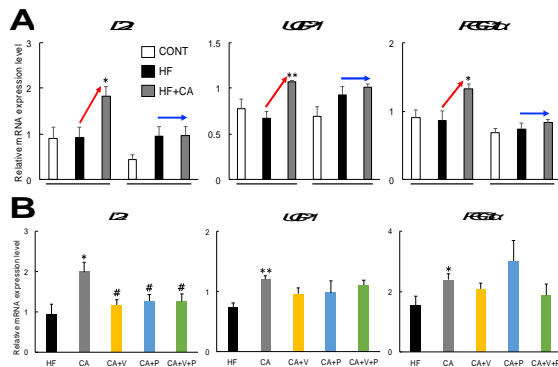


Fig. 5 褐色脂肪細胞(BAT)におけるエネルギー代謝と本研究の要約 (A) 2系統マウスのBATエネルギー代謝関連遺伝子発現 (B) AマウスのBATエネルギー代謝関連遺伝子発現 (C) 本研究の要約 *: p<0.05 **: p<0.01 vs. HF, #: p<0.05 vs. CA

このように2系統のマウスの腸内細菌叢の差異による胆汁酸組成の違いやコレステロール代謝の違いが胆汁酸による肥満抑制効果の有無に寄与している可能性が示唆された。また、Aマウスにおいて胆汁酸の効果が見れるには胆汁酸代謝菌による二次胆汁酸の産生が必須であるということも明らかになった。つまり、20年以上のゲノムからのアプローチでは明らかにならなかったこの2系統のマウスの表現型の違いには、環境因子であるが”第二のゲノム”と言われる腸内細菌叢が胆汁酸組成の変化を介して関与していることが示唆された。今後はAマウスとBマウスを同一環境で飼育するCohousingモデルの試験や、BマウスへのDCA投与試験、FXRやTGR5など胆汁酸をリガンドとする受容体のアゴニスト・アンタゴニストやKOマウスを用いた検討により、本研究をさらに深めることで人類の生活習慣病個別化治療に応用することが期待出来る。

参考文献

1. Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*. 2006 Jan 26;439(7075):484-9.
2. Almind K, Kahn CR. Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes*. 2004 Dec;53(12):3274-85.
3. Ussar S, Griffin NW, Bezy O, Fujisaka S, Vienberg S, Softic S, et al. Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metab*. 2015 Sep 1;22(3):516-30.
4. Jia W, Xie G, Jia W. Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018 Feb;15(2):111-28.
5. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab*. 2009 Sep;10(3):167-77.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計21件)

胆汁酸代謝調節によるメタボリックシンドロームの予防. 川島えり, 上野碧葉, 渡辺光博. アンチエイジング医学 - 日本抗加齢医学会雑誌. 査読無. Vol.15 No.2: 49-55. 2019

Claudin-3 regulates bile canalicular paracellular barrier and cholesterol gallstone core formation in mice. Tanaka H, Imasato M, Yamazaki Y, Matsumoto K, Kunimoto K, Delpierre J, Meyer K, Zerial M, Kitamura N, Watanabe M, Tamura A, Tsukita S. *J Hepatol*. 査読有. 2018.12.;69(6):1308-1316. doi: 10.1016/j.jhep.2018.08.025. Epub 2018. 9.

「胆汁酸 - 臨床への新たな展開」胆汁酸に着目した新たな病態解析 胆汁酸とエネルギー代謝 (解説/特集). 中村杏菜, 渡辺光博. 肝胆脾. 査読無. 77(1): 15-23, 2018.7.

Lithocholic acid, a bacterial metabolite reduces breast cancer cell proliferation and aggressiveness. Mikó E, Vida A, Kovács T, Ujlaki G, Trencsényi G, Márton J, Sári Z, Kovács P, Boratkó A, Hujber Z, Csonka T, Antal-Szalmás P, Watanabe M,

Gombos I, Csoka B, Kiss B, Vigh L, Szabó J, Méhes G, Sebestyén A, Goedert JJ, Bai P. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 査読有. 2018 Sep;1859(9):958-974. doi: 10.1016/j.bbabi. 2018.04.002. Epub 2018.4.

「エイジング研究」胆汁酸代謝調節による抗加齢研究 (解説/特集). 中村杏菜、渡辺光博. 細胞. 査読無. 49(10): 495-499. 2017.9.

胆汁酸によるエネルギー代謝調節(解説). 北村奈穂, 高科庸子, 田岡広樹, 渡辺光博. *BIO Clinica.* 査読無. 32(9): 939-943. 2017.8

「糖尿病と消化器疾患 Update-意外に近い両者の関係-」胆汁酸代謝調節と糖尿病治療(解説/特集). 査読無. 川島えり, 渡辺光博. *プラクティス* 34(4): 372-379. 2017.7.

Bile acid binding resin prevents fat accumulation through intestinal microbiota in high-fat diet-induced obesity in mice. Kusumoto Y, Irie J, Iwabu K, Tagawa H, Itoh A, Kato M, Kobayashi N, Tanaka K, Kikuchi R, Fujita M, Nakajima Y, Morimoto K, Sugizaki T, Yamada S, Kawai T, Watanabe M, Oike Y, Itoh H. *Metabolism.* 査読有. 2017 Jun;71:1-6. doi: 10.1016/j.metabol.2017.02.011. Epub 2017.2.

「糖尿病研究の“いま”と治療の“これから”」(第4章)新しい治療薬・治療法は何か開発されているのか? 新たな創薬標的 治療標的としての胆汁酸シグナル(解説/特集). 北村奈穂, 渡辺光博. *実験医.* 査読無. 35(2):258-265. 2017.2

くらしと胆汁酸 肥満と胆汁酸(解説). 平木稜太, 渡辺光博. *たんじゅうさん.* 査読無. 15(2):14-15. 2017.1

治療標的としての胆汁酸シグナル. 北村奈穂, 渡辺光博. *実験医学.* 査読無. 35(2): 258-265, 2017.

胆汁酸代謝調節と糖尿病治療. 川島えり, 渡辺光博. *プラクティス* 34(4): 372-379, 2017.

「胆汁酸と肝疾患」胆汁酸による代謝調節(解説/特集). 北村奈穂, 渡辺光博. 細胞. 査読無. 48(10):470-474. 2016.9.

「遺伝子制御の新たな主役 栄養シグナル 糖、脂質、アミノ酸による転写調節・生体恒常性機構と疾患をつなぐニュートリゲノミクス」(第1章)新たに見えてきた、栄養・代謝物シグナルによる遺伝子制御メカニズム 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(解説/特集). 横山葉子, 中村杏菜, 横江亮, 田岡広樹, 渡辺光博. *実験医学.* 査読無. 34(15):2468-2474. 2016.9

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

胆汁酸研究の進歩と展望-これからのbreakthroughを目指して-. 胆汁酸代謝異常に対する治療 胆汁酸代謝調節によるメタボリック症候群の予防・治療 Rationale(解説/特集). 中川直哉, 渡辺光博. *肝胆膵.* 査読無. 72(5):859-867. 2016.5.

「腸内細菌と脂質」腸内細菌とその代謝産物の網羅的検討 腸内細菌とFXR・胆汁酸シグナル(解説/特集). 谷垣龍哉, 渡辺光博. *The Lipid.* 査読無. 27(2):152-158. 2016.4

腸内細菌とFXR・胆汁酸シグナル. 谷垣龍哉, 渡辺光博. *The Lipid.* 査読無. 27(2): 152-158, 2016.

胆汁酸代謝調節によるメタボリック症候群の予防・治療-Rationale-. 中川直哉, 渡辺光博. *肝胆膵.* 査読無. 72(5): 859-867, 2016.

胆汁酸シグナルによる代謝調節. 高科庸子, 田岡広樹, 渡辺光博. *実験医学.* 査読無. 34(2): 236-243, 2016.

- ⑭ 胆汁酸研究の進歩と展望-これからのbreakthroughを目指して-. 胆汁酸研究の進歩と展望 これからのbreakthroughを目指して(座談会/特集). 市田隆文, 渡辺光博, 加川建弘, 松崎靖司. *肝胆膵.* 査読無. 72(5): 935-950, 2016.

[学会発表](計11件)

川島えり, 本多彰, 宮崎照雄, 福田真嗣, 滝川一, 松崎靖司, 渡辺光博. 胆汁酸から見た代謝機構解明による生活習慣病個別化治療へのアプローチ. 第40回胆汁酸研究会. 2018. 11 広島.

N. Kitamura, H. Taoka, T. Tanigaki, E. Kawashima, Y. Yokoyama, A. Nakamura, M. Watanabe. 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 2018.7. Dublin, Ireland.

NPC1L1 阻害剤エゼチミブは肥満糖尿病マウスにおいて、肝臓のLXR活性低下を介し、糖・脂質代謝を改善する. 杉崎 太一, 渡辺光博, 森本 耕吉, 宮崎 照雄, 本多 彰, 入江 潤一郎, 伊藤 裕. 第34回日本肥満症治療学会学術集会 2016.7.東京

胆汁酸吸着レジンによるGLP-1分泌促進作用について. 森本耕吉, 渡辺光博, 杉崎太一, 入江潤一郎, 伊藤裕. 第34回日本肥満症治療学会学術集会 2016.7.東京

腸管内胆汁酸代謝を介した腸内細菌制御と体脂肪蓄積抑制の解明. 楠本幸恵, 入江潤一郎, 岩部佳穂, 田川裕恒, 伊藤 新, 加藤 麻里, 田中 久美子, 菊地 理恵子, 藤田真隆, 森本

耕吉, 山田 悟, 河合 俊英, 渡辺 光博, 尾池 雄一, 伊藤 裕. 第 34 回日本肥満症治療学会学術集会 2016.7.東京

異なる系統のマウスにおける胆汁酸と脂質代謝作用機序の比較解析. 高科 庸子, 田岡 広樹, 谷垣 龍哉, 平木 稜太, 中村 杏菜, 本多 彰, 北村 奈穂, 渡辺光博. 第 16 回日本抗加齢医学会総会. 2016.6, 横浜.

代謝・老化改善におけるタウリンの作用機構解明. 高科庸子, 花里奈瑠美, 中村杏菜, 中川直哉, 田岡広樹, 村上茂, 渡辺光博. 第 16 回日本抗加齢医学会総会. 2016.6, 横浜.

杜仲茶配糖体アスペルシドの抗メタボリックシンドローム作用. 高科庸子, 中村杏菜, 花里奈瑠美, 中川直哉, 田岡広樹, 平木稜太, 北村奈穂, 山口康代, 山崎寛生, 平田哲也, 渡辺光博. 第 16 回日本抗加齢医学会総会. 2016.6, 横浜.

グネチンC(レスベラトロール二量体)の薬効効果. 高科庸子, 平木稜太, 渡辺光博, 田岡広樹, 中村杏菜. 第 16 回日本抗加齢医学会総会. 2016.6, 横浜.

難消化性でん粉アミロファイバーの機能性解析と抗肥満機構の解明. 高科庸子, 中川直哉, 花里奈瑠美, 中村杏菜, 渡辺光博. 第 16 回日本抗加齢医学会総会. 2016.6, 横浜.

海苔機能性成分ポルフィランの抗メタボリックシンドローム作用におけるオミックス解析を用いたメカニズム解明. 高科庸子, 石原賢司, 斎藤花華, 谷垣龍哉, 田岡広樹, 渡辺光博. 第 16 回日本抗加齢医学会総会. 2016.6, 横浜.

[図書](計2件)

Bile acids and metabolic syndrome. Taoka H, Watanabe M. Bile Acids in Gastroenterology, Basic and Clinical. 193-209. 2017.4

あなたの健康寿命はもっとのばせる! 渡辺光博. 日本文芸社 2017.3

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 松崎 靖司
ローマ字氏名: (MATSUZAKI, Yasushi)
所属研究機関名: 東京医科大学
部局名: 医学部
職名: 教授
研究者番号(8桁): 50209532

研究分担者氏名: 滝川 一
ローマ字氏名: (TAKIGAWA, Hajime)
所属研究機関名: 帝京大学
部局名: 医学部
職名: 教授
研究者番号(8桁): 70197226

研究分担者氏名: 横山 葉子
ローマ字氏名: (YOKOYAMA, Yoko)
所属研究機関名: 慶應義塾大学
部局名: 政策・メディア研究科
職名: 特任助教
研究者番号(8桁): 10617244