

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09821

研究課題名(和文) 糖代謝を悪化させる腸内細菌由来代謝産物の特定とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of gut microbiota-derived metabolites and the mechanisms that impair glucose metabolism

研究代表者

藤坂 志帆 (Fujisaka, Shiho)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：30512082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食事や抗菌薬で腸内細菌叢を変化させたときの血中代謝産物を網羅的に解析し、インスリン抵抗性と相関のある代謝産物を見出し報告した(Fujisaka et al. Cell Reports. 22: 3072-3086, 2018)。肥満や便秘の治療に用いられる漢方薬、防風通聖散を高脂肪食負荷マウスに投与すると糖代謝が改善することを見出した。そのメカニズムとして、防風通聖散が腸内細菌叢を変化させ、腸管のバリア機能を回復させてインスリン抵抗性を改善することを明らかにし報告した(Fujisaka et al. Sci. Rep. 10: 5544, 2020)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満やメタボリック症候群の人口は近年世界的に増加しており、その合併症を引き起こすインスリン抵抗性の病態を克服することは喫緊の課題である。本研究を通じ、腸内細菌叢が血中の代謝産物の量に大きな影響を及ぼし、それがインスリン抵抗性の病態に大きく関与することを見出した。また、漢方薬である防風通聖散が、腸内細菌叢を変化させることでインスリン抵抗性の病態を改善しうる多面的作用があることを見出した。インスリン抵抗性を制御する上での腸内細菌叢の新たな役割を明らかにできたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed plasma and cecal metabolomics data of genetically different mice treated with a high fat-diet and/or antibiotics and identified several metabolites that correlated with insulin resistance of the host (Fujisaka et al. Cell Reports. 22: 3072-3086, 2018). We also reported that Bofutsushosan (BFT), a Japanese herbal medicine which has been clinically used for constipation in Asian countries, ameliorates glucose metabolism in mice with diet-induced obesity. As the mechanism, we found that BFT modified the gut microbiota, which may contribute to improving gut barrier function and preventing metabolic endotoxemia, leading to attenuation of diet-induced inflammation and glucose intolerance (Fujisaka et al. Sci. Rep. 10: 5544, 2020).

研究分野：糖代謝

キーワード：インスリン抵抗性 腸内細菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、メタ 16S 解析やメタゲノム解析の確立により腸内細菌叢の研究は飛躍的に進展した。2007 年米国 NIH で立ち上がった Human Microbiome Project ではヒトの体の部位ごとに特有の細菌構成パターンがあることが示された (Nature. 486; 207-214, 2012)。中でも腸管は圧倒的に細菌数の多い部位であり、健康ヒト腸管には約 1000 種類、100 ~ 1000 兆個の腸内細菌が生息している。食事由来栄養素の分解、消化、ビタミンの生成、供給など宿主の生理機能に大きな役割を担っている。さらにこれら腸内細菌の組成変化が、自己免疫疾患やアレルギー性疾患、炎症性腸疾患や自閉症、癌などありとあらゆる疾患と深く関連していることが近年報告されている。さらに、肥満や糖尿病、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) やインスリン抵抗性の状態のヒトの腸内細菌叢は健康者と異なることが知られる。

申請者らは腸内細菌組成の変化が糖代謝に与える影響とそのメカニズムについて、マウスを用いた研究を行ってきた。様々な遺伝的、環境的背景のマウスに高脂肪食や抗生剤投与を行い、腸内細菌叢の変化とそれともなう血中代謝産物の変化を網羅的に解析した。その結果、腸内細菌叢の変化に伴って、血中代謝産物がダイナミックに変動することを見出した。でも、腸内細菌由来代謝産物 Indoxylsulfate などの代謝産物はインスリン抵抗性と正の相関が認められた。

### 2. 研究の目的

上述した Indoxylsulfate (IS) やその他の腸内細菌由来代謝産物が糖代謝異常を惹起するメカニズムを解明すること、さらに腸内細菌叢の変化を介した糖代謝制御機構を明らかにすること。また、近年、日常診療で使用されている様々な薬剤が腸内細菌叢に影響をおよぼし、多面的な作用を有することが報告されていることから、腸内細菌叢を介して糖代謝に多面的作用を及ぼす薬剤とその作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 3-1.

腸内細菌叢と IS 濃度、さらに糖代謝異常と IS 濃度との関係を明らかにするため、抗生剤高脂肪食負荷あるいは高脂肪食負荷マウスの尿中 IS 濃度を測定した。

高脂肪食負荷マウスに IS を添加し糖代謝、肝脂肪組織の遺伝子発現を解析した。

IS の糖代謝異常への関与を明らかにするため、普通食あるいは高脂肪食負荷マウスに IS あるいは IS+IS 吸収阻害剤を投与し検討を行った。

#### 3-2.

上述した腸内細菌叢の変化に伴い変化する血中メタボローム解析の結果を詳細に解析し、糖代謝異常、インスリン抵抗性を関連のある代謝産物を抽出した。

#### 3.3

日本で肥満や便秘の患者に使われている漢方薬、防風通聖散を高脂肪食負荷マウスに投与し、糖代謝や腸内細菌叢に与える影響とその作用メカニズムについて検討した。

### 4. 研究成果

#### 3-1.

抗生剤を投与中には糞便中の菌叢由来 DNA 量が著明に減少し、中止後に回復してくる。尿中 IS 量は、便中の DNA 量の変化と平行なパターンを示した。このことから、腸内細菌由来の IS が個体の血中 IS 量を決定づける主な因子と思われた。高脂肪食投与マウスでは、普通食投与マウスと比較して尿中 IS 量は約 25% 程度優位に増加しており、高脂肪食群に IS を飲水投与した群では約 5 倍に増加していた。

生後 6 週齢のオス C57BL6 マウスに高脂肪食のみ投与する群、および高脂肪食に IS を飲水に混じり摂取させる群、また高脂肪食にトリプトファンから産生される別の代謝産物である Indole-3 Acetic Acid を投与する群を用意し、8 週間飼育を継続し、糖負荷試験やインスリン負荷試験で糖代謝を評価後、血液や脂肪組織、肝などを採取し遺伝子発現解析や血中インスリン濃度測定を行った。体重には有意差は認めなかった。糖負荷試験およびインスリン負荷試験では、IS 投与群において耐糖能の悪化と血中インスリン濃度の上昇、インスリン抵抗性を認めた。また肝および脂肪組織の炎症性サイトカイン (F4/80, TNF $\alpha$ , CD11c, IL-1 $\beta$ ) の発現量は有意に亢進していた。この作用は、同じトリプトファン由来の代謝産物 indole-3-acetyl acid を投与した場合には認めなかった。高脂肪食のみまたは高脂肪食に IS を投与したマウスの腹腔マクロファージを採取培養し LPS 刺激を行い TNF $\alpha$  などの炎症マーカーを qPCR で検討した。この結果は両群に有意差は見られず IS が免疫細胞を直接炎症性に誘導する可能性は低いことが示唆された。

普通食、高脂肪食それぞれに IS のみを投与する群、および IS に吸収阻害剤である AST-120 を投与する群を比較した。普通食、高脂肪食両群で IS は糖代謝を悪化させた。AST-120 はとくに普通食群において、内臓脂肪量を顕著に減少させ、耐糖能を有意に改善させた。遺伝子発現解析では肝において IS により増加したマクロファージ関連遺伝子が AST-120 により低下させた。

結論：腸内細菌由来の IS は肝、脂肪組織の慢性炎症を惹起し、高脂肪食による肥満インスリン抵抗性の増悪因子となる。AST-120 はとくに肝において肥満によるマクロファージ浸潤を軽減し、耐糖能を改善させる可能性が示唆された。

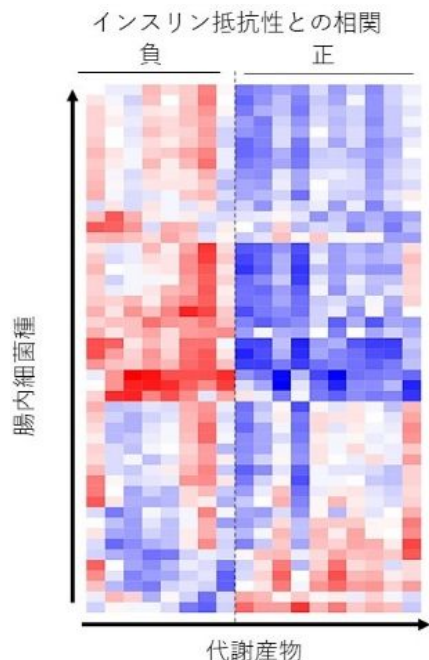


図1 インスリン抵抗性と相関のある代謝産物が特定の腸内細菌種と量的に相関がある

### 3-2.

上述した腸内細菌叢を変化させたときにみられる血中網羅的メタボローム解析と菌叢解析、個体のインスリン抵抗性などの相関を詳細に解析し、新規のインスリン抵抗性と相関のある18個の血中代謝産物を抽出した。その代謝産物の血中濃度と、特定の腸内細菌種との間に少なからず相関関係があることを見出し(図1) これらの結果を報告した(Fujisaka et al. Cell Rep 2018)

### 3-3.

防風通聖散が、高脂肪食負荷マウスの腸内細菌叢を変化させ、耐糖能が改善することを見出した(図2)。当初、腸内細菌由来代謝産物の変化を介した作用を考え、代表的腸内細菌由来代謝産物である短鎖脂肪酸の測定をしたが、両群で有意な差が認められなかった。防風通聖散が代謝産物を介する以外のメカニズムによって耐糖能を改善するものと考えられた。とくに腸内細菌叢の解析では、防風通聖散により、腸内細菌 *Akkermansia muchiniphila* が増加していた(図3)。*Akkermansia muchiniphila* は肥満により脆弱化した腸管のバリア機能を高める作用があることが知られている。防風通聖散が *Akkermansia muchiniphila* を代表とする腸内細菌組成に変化を誘導し、腸管のバリア機能が改善し、肥満による全身の慢性炎症が軽減して糖代謝が改善することを見出し、Scientific Reports 誌に掲載された(Fujisaka et al. Sci Rep. 2020, Mar 26;10(1):5544. )

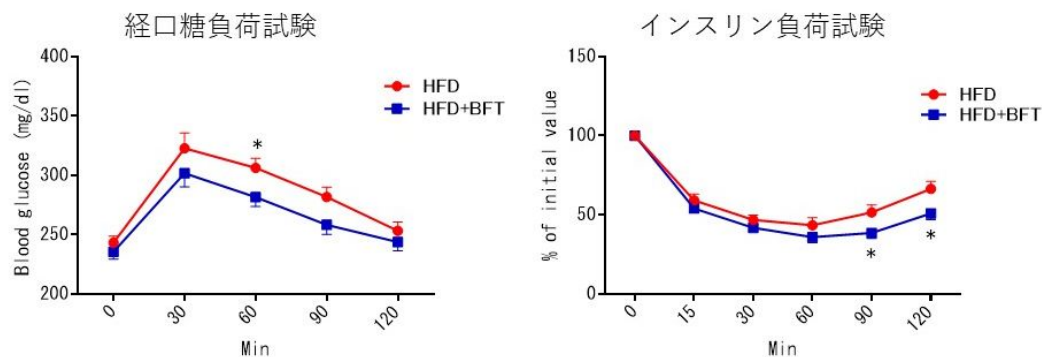


図2 防風通聖散は糖代謝を改善する  
HFD=高脂肪食 BFT=防風通聖散

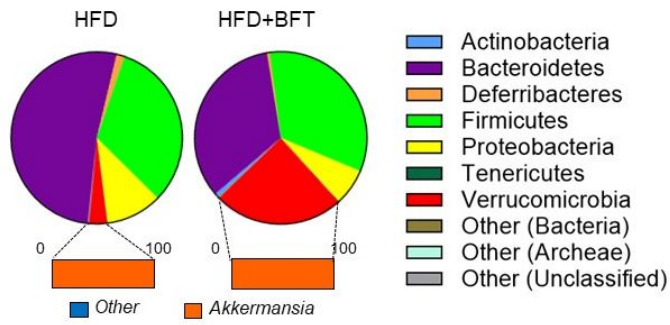


図3 防風通聖散による腸内細菌叢の変化  
HFD=高脂肪食 BFT=防風通聖散

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Soto M, Herzog C, Pacheco JA, Fujisaka S, Bullock K, Clish CB, Kahn CR.	4. 巻 23
2. 論文標題 Gut microbiota modulate neurobehavior through changes in brain insulin sensitivity and metabolism.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Psychiatry	6. 最初と最後の頁 2287-2301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41380-018-0086-5	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 Fujisaka S, Avila-Pacheco J, Soto M, Kostic A, Dreyfuss JM, Pan H, Ussar S, Altindis E, Li N, Bry L, Clish CB, Kahn CR.	4. 巻 22
2. 論文標題 Diet, Genetics, and the Gut Microbiome Drive Dynamic Changes in Plasma Metabolites.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3072-3086
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2018.02.060.	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 Softic S, Gupta MK, Wang GX, Fujisaka S, O'Neill BT, Rao TN, Willoughby J, Harbison C, Fitzgerald K, Ilkayeva O, Newgard CB, Cohen DE, Kahn CR.	4. 巻 127
2. 論文標題 Divergent effects of glucose and fructose on hepatic lipogenesis and insulin signaling.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 4059-4074
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI94585. Epub 2017 Oct 3.	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 Ussar S, Haering MF, Fujisaka S, Lutter D, Lee KY, Li N, Gerber GK, Bry L, Kahn CR.	4. 巻 66
2. 論文標題 Regulation of Glucose Uptake and Enteroendocrine Function by the Intestinal Epithelial Insulin Receptor.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 886-896
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/db15-1349. Epub 2017 Jan 17.	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 Iwata M, Hara K, Kamura Y, Honoki H, Fujisaka S, Ishiki M, Usui I, Yagi K, Fukushima Y, Takano A, Kato H, Murakami S, Higuchi K, Kobashi C, Fukuda K, Koshimizu Y, Tobe K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Ratio of low molecular weight serum adiponectin to the total adiponectin value is associated with type 2 diabetes through its relation to increasing insulin resistance.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0192609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0192609.	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 Nawaz A, Aminuddin A, Kado T, Takikawa A, Yamamoto S, Tsuneyama K, Igarashi Y, Ikutani M, Nishida Y, Nagai Y, Takatsu K, Imura J, Sasahara M, Okazaki Y, Ueki K, Okamura T, Tokuyama K, Ando A, Matsumoto M, Mori H, Nakagawa T, Kobayashi N, Saeki K, Usui I, Fujisaka S, Tobe K.	4. 巻 8
2. 論文標題 CD206+ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-00231-1.	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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Shiho Fujisaka, Isao Usui, Allah Nawaz, Yoshiko Igarashi, Tomonobu Kado, Okabe Keisuke, Kunimasa Yagi, Takashi Nakagawa, Kazuyuki Tobe
2. 発表標題 Bofutsushosan improved gut barrier function with a bloom of Akkermansia muciniphila and improves glucose metabolism in diet-induced obese mice
3. 学会等名 78th Scientific Sessions of American Diabetes Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujisaka S, Soto M, Kahn CR
2. 発表標題 Interaction between the gut microbiota and metabolites in insulin resistance and metabolic syndrome
3. 学会等名 43rd Symposium on Hormones and Cell Regulation. European Society of Endocrinology (Symposium) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤坂 志帆, Kahn CR, 戸邊 一之
2. 発表標題 腸内細菌叢、食事、遺伝背景による代謝産物の変化と糖代謝
3. 学会等名 第36回内分泌代謝サマーセミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤坂 志帆, Kahn CR, 戸邊 一之.
2. 発表標題 腸内細菌叢と糖代謝異常
3. 学会等名 第52回糖尿病学の進歩(シンポジウム)(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤坂 志帆, Kahn CR, 戸邊 一之.
2. 発表標題 腸内細菌叢による代謝産物の劇的变化と糖代謝.
3. 学会等名 第23回アディポサイエンス・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤坂 志帆, 戸邊 一之, Kahn CR.
2. 発表標題 腸内細菌叢を介した糖代謝制御
3. 学会等名 日本薬学会第138年会(シンポジウム)(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤坂 志帆、CR Kahn、戸邊 一之
2. 発表標題 腸内細菌叢を介した糖代謝制御
3. 学会等名 日本薬学会第138年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤坂 志帆、薄井 勲、Allah Nawaz、五十嵐 喜子、角 朝信、古澤 之裕、八木邦公、戸邊 一之
2. 発表標題 防風通聖散は腸内細菌Akkermansia muciniphilaを増加させ、高脂肪食負荷マウスの糖代謝を改善する
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤坂 志帆、CR. Kahn、戸邊 一之
2. 発表標題 腸内細菌叢と糖代謝異常
3. 学会等名 第52回糖尿病学の進歩（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shiho Fujisaka, Isao Usui, Allah Nawaz, Yoshiko Igarashi, Tomonobu Kado, Okabe Keisuke, Kunimasa Yagi, Takashi Nakagawa, Kazuyuki Tobe
2. 発表標題 Bofutsushosan improved gut barrier function with a bloom of Akkermansia muciniphila and improves glucose metabolism in diet-induced obese mice
3. 学会等名 78th Scientific Sessions of American Diabetes Association (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 藤坂 志帆、薄井 勲、古澤 之裕、Allah Nawaz、五十嵐 喜子、角 朝信、戸邊 一之
2. 発表標題 防風通聖散は腸内細菌Akkermansia muciniphilaを増加させ、高脂肪食負荷マウスの耐糖能を改善する
3. 学会等名 第22回日本肥満学会アディポサイエンス・シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shiho Fujisaka, Isao Usui, Yukihiro Furusawa, Allah Nawaz, Yoshiko Igarashi, Tomonobu Kado, Kazuyuki Tobe
2. 発表標題 Bofutsushosan, an Oriental Herbal Medicine, induces Akkermansia muciniphila and improves glucose metabolism in diet-induced obese mice.
3. 学会等名 77th Scientific Sessions of American Diabetes Association (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤坂 志帆、C. Ronald Kahn、戸邊 一之
2. 発表標題 腸内細菌叢が糖代謝に与える影響
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤坂 志帆、Jonathan Dreyfuss、Clary Clish、Lynn Bry、戸邊 一之、C.Ronald Kahn
2. 発表標題 腸内細菌叢の変化は血中代謝産物を劇的に変化させ耐糖能を制御する
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤坂 志帆
2. 発表標題 腸内細菌叢を規定する遺伝背景と代謝異常
3. 学会等名 CVMW2017 心血管代謝週間（招待講演）
4. 発表年 2017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	戸辺 一之 (Tobe Kazuyuki)  (30251242)	富山大学・学術研究部医学系・教授  (13201)	
研究分担者	薄井 勲 (Usui Isao)  (50377272)	獨協医科大学・医学部・教授  (32203)	