

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750356

研究課題名(和文)腸内細菌叢の変動に伴う食品由来スカトール量の変化と肝機能との関係性について

研究課題名(英文) Analysis of relationships between the changing amount of skatole, an enterobacterium-derived dietary protein metabolite, and liver functions.

研究代表者

清水 英寿 (Shimizu, Hidehisa)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：10547532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまず、肝臓に対するスカトールの効果について検討を行った。ラットに28日間スカトール含有食を摂取させた結果、主に肝臓で制御されている胆汁酸代謝に異常が生じた。しかし、肝臓、回腸、結腸において、TNF α の発現量に変化がなかったことから、この摂取期間では炎症反応が惹起されない事が示唆された。また、胆汁酸代謝の変動が動脈硬化の発症・進展に対して影響を与えるのか解析を行った。代表的な二次胆汁酸であるデオキシコール酸が、血管平滑筋細胞の増殖能・遊走能を亢進させていた。以上から、消化管内でのスカトールの濃度上昇は胆汁酸代謝を変化させ、動脈硬化の発症・進展を導く可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we analyzed the effect of skatole on the liver functions. Male SD rats were fed a diet supplemented with or without skatole for 28 days. The ingestion of skatole modulated bile acid metabolism, which is mainly regulated in the liver. However, inflammatory response may be not initiated during this ingestion period because the expression level of TNF α , one of the inflammatory cytokine genes, in the liver, ileum, and colon was not changed between control and the Skatole-fed rats. Furthermore, the present study also examined whether modulated bile acid metabolism influences the initiation and progression of atherosclerosis. Deoxycholic acid, a representative secondary bile acid, enhanced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. Taken together, it is possible that change of bile acid metabolism by increased skatole concentration in gastrointestinal tract is involved in the pathogenesis of atherosclerosis.

研究分野：病態生理学

キーワード：スカトール 回腸 タウロコール酸 抱合型胆汁酸 デオキシコール酸 二次胆汁酸 動物性タンパク質 腸内細菌代謝物

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国では、生活習慣病患者の増加が深刻な社会問題となっているが、その原因の1つとして、食生活の欧米化に伴う高脂肪食摂取による摂取カロリーの過剰が挙げられている。そのため、エネルギー消費と生活習慣病の発症機構の関係性について非常に注目を集めているが、腸内細菌とその代謝産物との関係性について、その重要性の認識とは相反し、詳細なメカニズムは明らかとなっていない。これまでに、高脂肪食を摂取すると、脂肪を効果的に吸収するために、胆汁酸の分泌量が増加する事が知られている。また、肥満状態においては、糞中の総胆汁酸量の上昇、加えて、腸内細菌叢の構成バランスの変化が報告されている。このような現象から、申請者が所属しているグループは、この「胆汁酸」と「腸内細菌叢」の關係に着目し、生体内で存在する詳細な胆汁酸種及び胆汁酸濃度を見出し、胆汁酸量を増加させると腸内細菌叢の構成を変化させ、俗に言う、悪玉細菌の割合を増やす事を報告している (*Gastroenterology* 141:1773-1781, 2011)。

一方、申請者はこれまでに、食品タンパク質に含まれる「トリプトファン」と「腎不全進行」に注目して研究を行ってきた。腎不全の進行遅延の手段の1つとして、低タンパク食摂取が推奨されているが、その理由として、腎不全の進行促進に食品タンパク質由来のトリプトファン代謝物が関与しているためである。このトリプトファン代謝物は、悪玉細菌が所有しているトリプトファナーゼによる代謝を起因としているインドール系化合物のため、代表的な善玉細菌である乳酸菌摂取によって悪玉細菌を減少させ、インドール系化合物の産生量を低下させる事で、腎不全の進行遅延が起こる事が明らかとなっている。そのため、腸内細菌由来のインドール系化合物と腎不全の進行促進についての研究は、近年、盛んに行われ始めているが、他のトリプトフ

アン代謝物と病態進行との関連性についての知見は未だに乏しい。そこで申請者は、腸内細菌による他の食品タンパク質由来トリプトファン代謝物としてスカトールに着目した。

2. 研究の目的

高脂肪食摂取に伴う消化管内の胆汁酸量の上昇が悪玉細菌の割合を増やし、同時に、食品タンパク質摂取によって悪玉細菌から産生されるスカトール量が著しく増加すると予想した。加えて、増加したスカトールが腸から吸収され肝臓に蓄積される事で肝機能に影響を与え、生活習慣病の発症・進展に寄与しているという仮説を立てるに至った。

3. 研究の方法

< 実験1 >

Sprague-Dawley 系ラット(5週齢雄性)に AIN-93G に準拠した基本飼料を与え、5日間の予備飼育を行い、その後、基本飼料を摂取させた対照群(n=8)、0.025%及び0.05%スカトールを含む飼料を摂取させた試験群(それぞれn=7, n=8)に分け、試験期間を28日間とし、飼料は全て自由摂取とした。試験期間終了時に採糞を行い、糞中胆汁酸組成を Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry (UPLC/ESI-MS) で分析した。また解剖時に、腸間膜脂肪、副睾丸脂肪、後腹膜脂肪、腎周囲脂肪、肝臓、腎臓を採取し、それぞれの重量を測定した。採取した肝臓と結腸については、real-time PCR 法を用いて遺伝子の発現量について解析を行った。

< 実験2 >

抗生活習慣病効果の働きがあるとされている Farnesoid X Receptor (FXR) に対するスカトールの作用を、腸管細胞である Caco-2 細胞を用いて、下記のように検討を行った。FXR の応答配列を組み込んだルシフェラーゼベクターを Caco-2 細胞にトランスフェクションした

後、24時間無血清培地でCaco-2細胞を培養した。その後、スカトールで24時間細胞を刺激した後、ルシフェラーゼアッセイを用いてFXRに及ぼす転写活性について測定を行った。

<実験3>

試験群を対照群(n=10)及び0.025%スカトール添加食群(n=11)とする以外は、上記「実験1」と同様の条件で飼育を行った。試験期間終了時に、腸間膜脂肪、副睾丸脂肪、後腹膜脂肪、腎周囲脂肪、肝臓、腎臓を採取し、各種臓器重量を測定した。肝臓と回腸については、real-time PCR法を用いて各種遺伝子の発現量を解析した。また、回腸内容物、糞、門脈血について、UPLC/ESI-MSで胆汁酸組成を分析した。

<実験4>

慢性腎不全などの疾患において、二次胆汁酸であるデオキシコール酸の血中濃度が上昇する事が知られている。また、本実験からも血中デオキシコール酸の濃度が増加する事が予想されたため、動脈硬化の発症・進展に関わる血管平滑筋細胞を用いて、デオキシコール酸が与える影響について解析した。

4. 研究成果

<実験1>

コントロール及び0.025%スカトール摂取群において、摂食量及び体重当たりの腸間膜脂肪、副睾丸脂肪、後腹膜脂肪、腎周囲脂肪、肝臓、腎臓の各種臓器重量に変化はなかった。しかし、0.05%スカトール摂取群では、摂食量及び体重当たりの腎周囲脂肪が減少していた。逆に、体重当たりの肝臓重量が増加していた。腸間膜脂肪、副睾丸脂肪、後腹膜脂肪、腎臓の各種臓器重量に変化はなかった。

糞中胆汁酸組成については、総胆汁酸量及び総二次胆汁酸量が、0.025%及び0.05%スカトール摂取群で増加していた。また二次胆汁酸の中

で、大腸がんの発症・進展への関与が報告されているデオキシコール酸及びその関連胆汁酸の総量が、0.025%及び0.05%スカトール摂取群で上昇していた。

肝臓及び結腸における遺伝子の発現量については、炎症性サイトカインの一つであるTNF α の発現量について解析を行った。結果として、群間で変化がなかった事から、両部位では炎症反応が惹起されていない事が示唆された。加えて、肝臓における胆汁酸合成に関わる遺伝子の発現量について調べてみたところ、両スカトール摂取群で共に増加していた。以上の事から、スカトール摂取に伴い、胆汁酸合成系の遺伝子の発現量が変化する事で、糞中の胆汁酸量や組成に変化が現れたと考えられた。

<実験2>

FXRの応答配列を組み込んだルシフェラーゼベクターをトランスフェクションしたCaco-2細胞において、スカトールの濃度依存的に転写活性が抑制された。したがってスカトールは、FXRに対してインバースアゴニストである事が示唆された。<実験1>の結果や現在までのFXRと胆汁酸代謝との関係についての知見を踏まえると、スカトールはFXRに作用する事で、肝臓における胆汁酸合成系遺伝子の発現量に影響を与えている可能性が考えられた。

<実験3>

コントロール及び0.025%スカトール摂取群において、<実験1>と同様、摂食量及び体重当たりの腸間膜脂肪、副睾丸脂肪、後腹膜脂肪、腎周囲脂肪、肝臓、腎臓の各種臓器重量に変化はなかった。

糞中胆汁酸組成についても<実験1>の結果と同様に、デオキシコール酸及びその関連胆汁酸の総量が、0.025%スカトール摂取群で上昇していた。加えて、回腸末端内容物及び門脈血中において、一次胆汁酸であるコール酸のタウリン

抱合型であるタウロコール酸の量及び比率が上昇していた。

肝臓における遺伝子解析の結果、胆汁酸合成系遺伝子の発現量が増加傾向にあったが、肝臓及び回腸末端で発現する胆汁酸代謝制御系の遺伝子について、発現量に変化はなかった。また、肝臓及び回腸末端でTNF α の発現量に群間で変化がなかった事から、両部位では炎症反応が惹起されていない事が、＜実験1＞と同様に示唆された。

<実験4>

血管平滑筋細胞をデオキシコール酸で刺激したところ、Mitogen-activated Protein Kinase Familyの1つであるc-jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化が誘導された。加えてデオキシコール酸は、JNKを活性化する事で、血管平滑筋細胞の細胞増殖及び遊走を導いた。また、JNKの活性化を介して、動脈硬化の発症・進展に対して中心的な役割を果たしているPlatelet-derived Growth Factor Receptor β (PDGFR β) の発現量を上昇させる事で、PDGF刺激依存的な増殖能及び遊走能を亢進させた。

<総括>

スカトールは、肝臓における胆汁酸合成系遺伝子の発現増加を導く事で、回腸末端と門脈での総胆汁酸量及びタウロコール酸量を増加させた。加えて、糞中でのデオキシコール酸及びその関連胆汁酸の総量も上昇させた。しかし、胆汁酸合成系遺伝子の発現量に影響を与えていたものの、胆汁酸量増加に伴う胆汁酸代謝制御系遺伝子、炎症性サイトカインであるTNF α について、肝臓、回腸末端、結腸において観察されなかった。

総胆汁酸量増加に伴うデオキシコール酸の血中濃度の上昇は、血管平滑筋細胞の増殖能や遊走能の亢進に関与している事が明らかとなった。

以上の結果から、消化管におけるスカトール量の増加は、肝臓における胆汁酸合成系遺伝子の発現量に影響を与え、また総胆汁酸量の増加に伴う血中デオキシコール酸濃度の上昇は、動脈硬化の発症・進展に関与する事が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Shimizu H, Hagio M, Iwaya H, Tsuneki I, Lee JY, Fukiya S, Yokota A, Miyazaki H, Hara H, Ishizuka S. Deoxycholic acid is involved in the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *J Nutr Sci Vitaminol*. 60: 450-454, 2014. doi: 10.3177/jnsv.60.450. (査読有)

[学会発表](計 6 件)

1. 野勢琢馬, 清水英寿, 萩尾真人, 吹谷智, 横田篤, 原博, 石塚敏. 腸内細菌代謝物スカトールは肝臓でのCyp7a1の発現と糞中二次胆汁酸増加を誘導する. 第37回日本分子生物学会 2014年11月25日～11月27日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
2. 野勢琢馬, 清水英寿, 萩尾真人, 吹谷智, 横田篤, 原博, 石塚敏. Skatoleの経口負荷が肝Cyp7a1発現と二次胆汁酸排泄の亢進を誘導する. 第35回日本肥満学会2014年10月24日～25日 シーガイアコンベンションセンター(宮崎県・宮崎市).
3. 清水英寿. 腸内細菌由来食品タンパク質代謝物と病態発症・進展との関係性. 日本農芸化学会北海道支部・東北支部合同若手シンポジウム 2014年9月23日～24日 定山溪ビューホテル(北海道・札幌市).

4. Shimizu H, Hagio M, Nose T, Lee JY, Fukiya S, Yokota A, Hara H, Ishizuka S. The effects of skatole, an enterobacterium-derived dietary protein metabolite, on bile acid metabolism in rats. 17th IUFoST World Congress of Food Science and Technology and EXPO. 2014年8月17日～21日 モントリオール (カナダ).
5. 野勢琢馬, 清水英寿, 萩尾真人, 石塚敏, 原博. ラットにおけるスカトールの経口摂取が糞中二次胆汁酸を増加させる. 第68回日本栄養・食糧学会大会2014年5月30日～6月1日 札幌市教育会館 / 酪農学園大学 / 北海道大学学術交流会間 (北海道大学・札幌 / 江別).
6. Shimizu H, Hagio M, Yoshitsugu R, Kikuchi K, Joe G, Hara H, Ishizuka S. Deoxycholic acid is involved in the initiation and progression of atherosclerosis. Experimental Biology, 2013年4月20日～24日 ボストン (アメリカ).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

清水 英寿 (SHIMIZU HIDEHISA)

北海道大学・大学院農学研究院・特任講師

研究者番号：10547532