

氏名	せき なつみ 関 夏実
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博士甲第 号
学位授与の日付	令和3年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	腸内環境変化が宿主生理機能に与える影響の解明
論文審査委員	(主査) 教授 長谷 耕二 (博士(薬学)) (副査) 教授 服部 豊 (博士(医学)) 教授 齋藤 義正 (博士(医学))

## 論文内容の要旨

### 緒言

ヒトの腸管には、約 40 兆個、100 種類ほどの腸内細菌が存在し、腸内細菌叢を形成している。腸内細菌が産生する多様な代謝物は腸管局所で作用、または腸管から吸収され全身を巡ることで、宿主の生理機能に関与することが知られており、特定の腸内細菌と疾患との関連性についても報告されている。しかし、腸内細菌叢はヒトの 150 倍以上の遺伝子を保有することが知られており、宿主生理機能に影響を与える未知の腸内細菌代謝物が数多く存在すると考えられる。そこで本研究では、腸内環境変化が宿主生理機能に与える新たな影響を解明するために、以下に示す3つの研究を行った。

### 第一章 抗肥満作用を示す腸内細菌由来代謝物の探索

#### 1-1. 背景

Body mass index (BMI) 30 以上と定義される肥満者の世界人口は、1975 年から約 3 倍に増加した。肥満は高血圧や II 型糖尿病、心血管疾患などの危険因子となることから、肥満の制御は当該疾患の予防において重要である。近年、肥満の制御において腸内細菌叢が重要な役割を果たすことが注目されており、特定の腸内細菌種の抗肥満作用や腸内細菌代謝物である短鎖脂肪酸が脂肪の蓄積を抑制することが報告されている。

II 型糖尿病の治療薬であるアカルボースは、糖の消化吸収に必要な  $\alpha$ -アミラーゼと  $\alpha$ -グルコシダーゼを競合阻害することで、小腸での分解を免れた二糖・オリゴ糖・多糖を大腸に到達させる。その結果、腸内細菌叢やその代謝物の組成を変化させることが、動物実験とヒト試験において報告されている。また、アカルボースには抗肥満作用があることも報告されている。そのため、アカルボースによる腸内環境変化が抗肥満作用に寄与するという仮説を立てた。そこで本研究は、アカルボースによる抗肥満作用に腸内環境変化が関与するかを検証するとともに、抗肥満作用を発揮する新規の腸内細菌由来代謝物の探索とその作用メカニズム解明を目的とした。

## 1-2. 方法

C57BL/6J 雄マウスに7週間または10週間高脂肪食を自由摂食させることにより肥満を誘導した。薬剤は全て自由飲水により与えた。腸内細菌叢の解析は、16S rDNA シークエンシングにより行い、NCBI genome database に基づいて菌種の同定を行った。盲腸内容物のメタボローム解析は CE-TOFMS を用いて行った。肝臓の RNA シークエンス解析においては、得られた結果をもとに DAVID ツールを用いてエンリッチメント解析を行った。血中総コレステロールは生化学自動分析装置を用いて測定した。

## 1-3. 結果

### ① アカルボースとバンコマイシンの併用投与は強い抗肥満作用を示す

腸内細菌がアカルボースの抗肥満作用に関与しているかを検証するために、腸内細菌叢の組成を変化させる非吸収性抗生剤であるバンコマイシンの投与下で、アカルボースの抗肥満作用を検証した。その結果、アカルボース単独投与と比べて、バンコマイシンとアカルボースの併用投与により、高脂肪食誘導性の肥満が強く抑制された。以上の結果から、アカルボースの抗肥満作用発揮には腸内細菌叢およびその代謝物の変化が関与する可能性が示唆された。そこでバンコマイシンとアカルボースの併用投与マウスを“肥満抵抗性マウス”とし、更なる解析を行った。

### ② 肥満抵抗性マウスの盲腸内容物メタボローム解析

まず、肥満抵抗性マウスの腸管内でどのような代謝物が増加しているのかを確認するために、盲腸内容物のメタボローム解析を行った。その結果、体重増加、脂肪重量と負の相関関係にある代謝物が複数見出された。

### ③ 代謝物 X は抗肥満作用を示す

抗肥満作用をもつ可能性のある代謝物をさらに絞り込むため、肥満抵抗性マウスの腸内細菌叢で最優勢であった *Lactobacillus murinus* を無菌マウスに定着させ、アカルボースを投与し、盲腸内容物のメタボローム解析を行った。このときアカルボース投与群において非投与群と比較して増加した代謝物の中で、②における候補代謝物としても挙がっていた、代謝物 X に着目し、抗肥満作用を検証した。その結果、代謝物 X は、高脂肪食負荷後の体重や脂肪・肝臓重量の増加を有意に抑制した。以上の結果から、*L. murinus* 菌に関連して産生される代謝物 X は抗肥満作用をもつことがわかった。

### ④ 代謝物 X は肝臓におけるコレステロール合成を低下させる

代謝物 X による抗肥満作用のメカニズムを解明するために、肝臓組織の RNA シークエンシングを行った。その結果、コレステロール合成に関与する遺伝子群が代謝物 X の投与により減少していた。実際に、血液・肝臓中における総コレステロール濃度は代謝物 X の投与により低下した。さらに、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞に代謝物 X を添加すると、コレステロール合成関連遺伝子群や、これらの遺伝子発現を正に制御する転写因子 SREBF2 の遺伝子発現が低下した。以上の結果から、代謝物 X は肝臓に直接作

用することでコレステロール合成を低下させることが示唆された。

#### 1-4. 考察

本研究により新たに腸内細菌由来抗肥満代謝物として同定された代謝物 X は、アカルボースの投与により大腸に供給された食物中の易消化性の糖を *Lactobacillus* 属菌がエネルギー源として消費したことで産生された可能性が考えられる。今後、代謝物 X 産生菌を腸管内で特異的に増加させることで、高コレステロール血症や食事誘発性肥満の制御に応用できる可能性がある。

## 第二章 海藻多糖アルギン酸によるタウリン産生菌の増加は腸炎回復を促進する

### 2-1. 背景

炎症性腸疾患（IBD）は、潰瘍性大腸炎とクローン病に大別され、どちらも再燃と寛解を繰り返す慢性の炎症性疾患である。IBD の患者数は年々増加しており、2017 年の時点で世界に 600-800 万人の罹患者が存在する。また、根本的な治療法は確立されておらず、副作用が少なく長期投与可能な代替治療法が求められている。IBD の病因は明らかにされていないものの、遺伝学的因子に加え、環境因子の一つとして、腸内細菌叢の構成異常が IBD の発症や進展に関与することが報告されている。

食物繊維はヒトの消化酵素により分解・吸収されず、大腸に到達することで腸内細菌に利用される。過去の研究により、複数の水溶性食物繊維が実験的大腸炎を抑制することが示されている。しかし、食物繊維による腸炎抑制効果の詳細なメカニズムや腸内細菌叢との関連性については不明な点が多い。そこで本研究では、水溶性食物繊維が腸内細菌叢の構成変化を介して大腸炎を抑制するメカニズムの解明を研究目的とした。

### 2-2. 方法

C57BL/6J 雄マウスにデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）を飲水投与することで大腸炎を誘導した。水溶性食物繊維、タウリンは飲水または経口投与により与えた。結果②以降の大腸炎の重症度は、体重減少、大腸の長さ・重さ、糞便中炎症マーカーであるリポカリン-2などを指標として評価した。腸内細菌叢の解析は、16S rDNA シークエンシングにより行い、NCBI genome database に基づいて菌種の同定を行った。盲腸内容物のメタボローム解析は CE-TOFMS を用いて行った。

### 2-3. 結果

#### ① 海藻多糖であるアルギン酸は DSS 腸炎誘発後の生存率を上昇させる

まず、致死的大腸炎誘導マウスに複数の水溶性食物繊維（アルギン酸、ラミナリン、プルラン、アラビノガラクトサン）を治療的に与え、どの水溶性食物繊維が最も生存率を上昇させるかを検討した。その結果、アルギン酸の投与が最も生存率を向上させた。

#### ② アルギン酸は腸内細菌叢と腸管内代謝物組成を変化させる

次に、大腸炎誘導下におけるアルギン酸の腸内細菌叢を解析したところ、アルギン酸の投与により、*Bacteroides* 属菌および *Lactobacillus* 属菌が増加した。また、大腸炎抑制に

寄与する代謝物を調べるために、①アルギン酸の投与マウス、②*Bacteroides* 属菌および③*Lactobacillus* 属菌の単菌定着マウスの腸管内容物を用い、メタボローム解析を行った。その結果、3つの実験で共通し、かつ大腸炎の病態と負の相関を示す代謝物としてタウリンが同定された。

### ③ アルギン酸の腸炎治療効果はタウリン依存的である

そこで、アルギン酸の大腸炎治療効果がタウリン依存的であるかを検証するために、タウリンを細胞内に取り込むトランスポーターである *Slc6a6* のノックアウトマウスを用い、アルギン酸の腸炎治療効果を検証した。その結果、アルギン酸の腸炎治療効果が観察されなかったことから、アルギン酸はタウリン依存的に腸炎治療効果を発揮することが示唆された。

### ④ アルギン酸およびタウリンの投与は腸管組織における遺伝子 Y の発現を誘導する

次に、アルギン酸およびタウリンの投与による大腸組織の遺伝子変化を RNA シークエンスにて網羅的に調べたところ、アルギン酸およびタウリンの投与により共通して遺伝子 Y の発現が上昇していた。また、タウリンをマウス大腸癌細胞株 CMT93 に添加したところ、タウリンの濃度依存的に遺伝子 Y の発現が上昇した。以上よりアルギン酸およびタウリンにより発現誘導される遺伝子 Y が大腸炎抑制に関与する可能性がある。

## 2-4. 考察

*Bacteroides* 属菌および *Lactobacillus* 属菌は胆汁酸脱抱合酵素を保有するため、タウリン抱合された胆汁酸を脱抱合することでタウリンを遊離する可能性が考えられる。タウリンによって直接誘導された遺伝子 Y に関する先行研究は少ないため、今後はその機能を解析する。本研究により、アルギン酸の投与が、大腸炎抑制作用のある代謝物であるタウリンの産生菌を増加させることで、IBD 治療に有効であることが示唆された。

## 第三章 腸内細菌に対するメチル水銀の悪影響と腸内細菌叢の乱れによる臓器への水銀蓄積の促進

### 3-1. 背景

第一章、第二章で示したように、腸内細菌叢は代謝物の産生を介して宿主恒常性の維持に寄与しており、食事や薬剤などの環境因子によって容易に変化し得る。近年、環境中化学物質の曝露によっても腸内細菌叢が攪乱されることが報告されており、中でもメチル水銀は海産物に濃縮されることから、我々は食事を介してメチル水銀を一定量摂取している可能性がある。しかし、メチル水銀が腸内細菌叢に影響を与えるかは不明である。メチル水銀は高い親電子性を有し、タンパク質の求核基に共有結合（親電子修飾）することでタンパク質の機能を変化させる。このことがメチル水銀毒性の主因の一つであると考えられている。一方で、メチル水銀は生体内求核低分子である活性イオウ分子と反応し、イオウ付加体形成を介して不活性化されることが知られる。腸管には硫酸還元菌が常在し硫化水素などのイオウを産生していることから、イオウ付加体形成を介したメ

チル水銀の不活性化に寄与している可能性が高い。そこで、メチル水銀による腸内細菌への影響と、メチル水銀の毒性軽減作用に対する腸内細菌叢の役割を検証した。

### 3-2. 方法

糞便タンパク質中の反応性システイン残基は BPM アッセイにて検出した。*Lactobacillus* 属菌の増殖は好気条件下 37°C で 24 時間培養し 1 時間ごとに 600 nm の吸光度を測定することで検出した。H<sub>2</sub>S および H<sub>2</sub>S<sub>2</sub> は LC-ESI-MS/MS により測定した。C57BL/6 マウス臓器中の水銀濃度測定に際し、抗生剤（アンピシリン、バンコマイシン）を 14 日間飲水投与後、MeHg を経口投与した。臓器中の水銀濃度は原子吸光水銀検出器を用いて測定した。

### 3-3. 結果

#### MeHg による腸内細菌タンパク質への親電子修飾

まず、腸内細菌由来のタンパク質が反応性システイン残基を保有するかを調べるために、SPF マウスと無菌マウスの糞便中タンパク質に含まれる反応性システイン残基を比較した。その結果、SPF マウスの糞便タンパク質中からは反応性システイン残基が検出されたが、無菌マウスの糞便中においてはほとんど検出されなかった。これら検出された反応性システイン残基のシグナルは、MeHg および別の親電性物質 1,2-NQ と反応することで減少した。さらに、1,2-NQ 抗体を用いたウエスタンブロットにより、1,2-NQ による腸内細菌由来タンパク質への修飾を確認した。以上より、メチル水銀によって腸内細菌のタンパク質が親電子修飾されることがわかった。

#### MeHg 曝露による *Lactobacillus* 属菌の増殖への影響

次に、メチル水銀が腸内細菌の増殖に与える影響を検証するために、小腸から大腸まで幅広く存在する乳酸菌である *Lactobacillus* 属菌を用い、メチル水銀を添加した培地で培養した。その結果、非添加培地で培養した場合と比べて、メチル水銀を曝露した培地では、メチル水銀の濃度依存的な増殖阻害作用がみられたが、メチル水銀に対する感受性は菌種により異なっていた。また、活性イオウ分子である H<sub>2</sub>S<sub>2</sub> の添加によりメチル水銀による増殖阻害作用が打ち消されたことから、腸管内における活性イオウ分子の産生は、メチル水銀に対する生体防御に寄与する可能性が示唆された。

#### 腸内細菌による活性イオウ分子産生と MeHg 曝露による水銀積の抑制

続いて、無菌マウスと SPF マウスの糞便中の活性イオウ分子量を比較したところ、無菌マウスにおいて活性イオウ分子である H<sub>2</sub>S や H<sub>2</sub>S<sub>2</sub> の濃度が有意に低かった。さらに、抗生剤によって腸内細菌叢を攪乱したマウスでは、対照群と比べ、メチル水銀曝露による小脳、肺、肝臓への水銀蓄積が促進していた。

### 3-4. 考察

腸管内には *Desulfovibrio* 属菌などの硫酸還元細菌が常在し、これらが H<sub>2</sub>S などの活性イオウ分子の産生に寄与している可能性がある。また H<sub>2</sub>S や活性イオウ分子の産生酵素のノックアウトマウスでは臓器への水銀蓄積が促進されることが報告されており、腸

管常在菌がメチル水銀毒性から宿主を保護していることが考えられる。

## 結論

本研究結果から、肥満や大腸炎などの疾患の予防・治療に働く新たな腸内細菌代謝物およびその作用メカニズムを明らかにすることができた。また、環境中化学物質が腸内細菌叢を攪乱することで宿主恒常性の破綻を招く可能性についても示すことができた。こうした知見の蓄積により、今後、腸内環境を人為的に変化させることで疾患を予防・治療することが可能になると考えられる。

## 論文審査結果の要旨

近年の次世代シーケンサーの進歩により、ヒトの腸管に存在する多様な腸内細菌が宿主の生理機能に関与することが明らかとなり、特定の腸内細菌との関連についても明らかとなってきた。申請者は、腸内細菌-宿主相互作用について新規経路を提示すべく、3つの研究を行った。一つ目は、抗肥満作用を示す新規腸内細菌由来代謝物の探索である。本研究では、糖の分解酵素である  $\alpha$ -アミラーゼおよび  $\alpha$ -グルコシダーゼの競合的阻害剤であるアカルボースと、腸内細菌叢を変化させる抗生剤であるバンコマイシンの併用投与が強い抗肥満作用を誘導することを見出し、当マウスの腸内環境の解析により、抗肥満作用を示す新規腸内細菌由来代謝物 X を同定した。さらに代謝物 X は肝臓におけるコレステロール合成を抑制し、血液、肝臓中における総コレステロール濃度を低下させた。また、肥満抵抗性マウスの腸管内で最優勢の菌種であった *Lactobacillus murinus* が代謝物 X の産生に関与することも新たに見出した。本研究の成果は代謝物 X 高産生菌のスクリーニングなどを通じ、高コレステロール血症や食事誘発性肥満の制御に応用可能である。二つ目は、腸炎の抑制に働く腸内細菌代謝物の探索である。IBD は世界的に患者数が増加している原因不明の難病であり、根本的な治療法が存在しないことから代替治療法の確立が求められている。先行研究により、複数の水溶性食物繊維が実験的大腸炎を抑制することが示されているが、詳細なメカニズムや腸内細菌叢との関連性については不明な点が多かった。そこで申請者は、水溶性食物繊維をツールとして、腸内細菌およびその代謝物による大腸炎の抑制メカニズムの解明を行った。その結果、海藻由来の食物繊維であるアルギン酸が大腸炎を強く抑制することを見出し、アルギン酸によって増加する *Bacteroides* 属菌および *Lactobacillus* 属菌とそれらに由来するタウリンが腸炎に抑制的に働くことを示した。本研究により、食物繊維による腸炎抑制効果における腸内細菌の役割を提示することができた。三つ目は、メチル水銀の腸内細菌への影響と、メチル水銀の毒性軽減作用に対する腸内細菌叢の役割の検証である。腸内細菌叢は宿主の摂取した食事によって容易に変化し得るが、近年、環境中化学物質の曝露によっても腸内細菌叢が攪乱されることが報告されている。申請者は、海産物に濃縮される

メチル水銀が腸内細菌叢の構成を変化させる機構に着目した。メチル水銀は高い親電子性を有し、生体タンパク質の求核基に共有結合することでタンパク質の機能を変化させる。申請者は、本機構が腸内細菌に対しても適用される可能性を考え、細菌のタンパク質がメチル水銀によって親電子修飾されること、代表的な乳酸菌である *Lactobacillus* 属菌の増殖がメチル水銀によって阻害されることを示した。さらに、メチル水銀を不活化させることが知られる活性イオウは腸内細菌によっても産生されることから、腸内細菌がメチル水銀毒性に対し保護的な役割を担う可能性が考えられた。そこで抗生剤で腸内細菌叢を攪乱したマウスにメチル水銀を投与すると、臓器への水銀蓄積が促進したことから、腸内細菌は活性イオウ分子の産生を介してメチル水銀毒性から宿主を保護している可能性を示した。

口頭発表において、副査の服部教授から「メチル水銀の研究が、社会に与えるインパクト」について質問があり、申請者は「本研究により、IBD など一部の疾患を持つ患者さんにとっては炎症を惹起する要因となる硫化水素などの活性イオウが、メチル水銀毒性に対しては保護的に働くことが示されたことから、腸内細菌の多様性を良好に保つことが重要であることを提示できた。」と回答した。また、副査の齋藤教授から「アルギン酸を代謝する酵素は知られているか。」との質問があり、「アルギン酸リアーゼが知られており、日本人の糞便より単離された菌が本酵素を持つことが報告されている。」と返答した。また、「申請者の研究において、アルギン酸を投与したマウスで増加した腸内細菌は本酵素を持つか。」との質問に対し、「その点について調べることは出来なかったが重要である」と返答した上で、「マウスから単離した腸内細菌をアルギン酸の存在下で培養すると、非存在下で培養した場合と比べて増殖が顕著に促進することから、マウスの腸内細菌がアルギン酸リアーゼを持つ可能性は高く、これによりアルギン酸を代謝し栄養源とすることで増殖していると考えられる。」と続けた。

申請者の博士論文、発表会での発表、試問に対する回答はおおむね妥当であり、腸内細菌が宿主整理機能に与える影響を多角的に解析した本研究は学術的に大きな価値があり、博士（薬学）を授与するにふさわしい学力を有すると判断した。

## 論文目録

### 【主論文に関する原著論文】

Natsumi Seki, Masahiro Akiyama, Hiroto Yamakawa, Koji Hase, Yoshito Kumagai, Yun-Gi Kim. Adverse effects of methyl mercury on gut bacteria and accelerated accumulation of mercury in organs due to disruption of gut microbiota. *J. Toxicol. Sci.* 46(2):91-97, 2021 doi: 10.2131/jts.46.91.