

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	関 夏実
主論文題名： 腸内環境変化が宿主生理機能に与える影響の解明			
<p>(内容の要旨)</p> <p>ヒトの腸管には、約 40 兆個、100 種類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。</p> <p>まず、抗肥満作用を示す新規腸内細菌由来代謝物の探索を行った。近年、肥満の促進または抑制において腸内細菌叢が重要な役割を果たすことが報告されている。本研究では、腸内細菌叢を変化させる複数の薬剤をマウスに投与し、マウスの肥満形質と腸内細菌代謝物との間の相関関係を解析することで、肥満抵抗性に寄与する腸内細菌由来代謝物の同定を試みた。その結果、糖の分解酵素で、唾液や膵液中に含まれる α-アミラーゼや小腸粘膜上皮細胞の刷子縁に存在する α-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非吸収性の抗生剤であるバンコマイシン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ることを見出した。そこで、アカルボースとバンコマイシンの併用投与マウスを“肥満抵抗性マウス”とし、当該マウスの腸内代謝物を解析した結果、肥満形質と負の相関を示す代謝物が複数見出された。これらの代謝物の中から、抗肥満作用を発揮する代謝物として代謝物 X を同定した。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。さらに、ヒト肝癌由来細胞株である 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。また、無菌マウスを用いた実験により、肥満抵抗性マウスの腸管内で最優勢の菌種であった <i>Lactobacillus murinus</i> が代謝物 X の産生に関与することがわかった。本研究により、腸内細菌由来代謝物 X の生理機能が初めて明らかとなった。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。</p>			

続いて、腸炎の抑制に働く腸内細菌代謝物の探索を行った。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炎症性疾患である。また、発症原因が不明であることから、根本的な治療法は存在せず、副作用が少なく長期投与可能な代替治療法の確立が求められている。これまでの研究により、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い。そこで本研究は、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目的とした。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、アラビノガラクトン）を与え、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。そこで、アルギン酸による大腸炎抑制機構の詳細な解析を行った。まず、アルギン酸投与群では、炎症惹起により観察される大腸の肥厚・短縮の抑制、病理スコアの低下が見られ、腸炎による体重低下からの回復が早まった。しかし、腸内細菌叢を変化させる抗生剤の投与下ではアルギン酸の腸炎抑制効果がみられなかった。以上のことから、アルギン酸による腸炎抑制作用には、腸内細菌叢が重要な役割を担っている可能性が示唆された。さらに、アルギン酸の投与により腸管内で *Bacteroides* 属菌および *Lactobacillus* 属菌が増加し、複数の腸内細菌代謝物が対照マウスと比べて増加した。その中で、大腸炎の病態と負の相関性があり、上記2種の菌をそれぞれ無菌マウスに定着させることで腸管内において増加した代謝物としてタウリンを同定した。そこで次に実験的大腸炎誘導マウスにタウリンを投与したところ、体重低下からの回復が早くなった。しかし、タウリントランスポーターである *Slc6a6* のノックアウトマウスにおいては、アルギン酸の大腸炎に対する抑制効果はみられなかった。以上のことから、アルギン酸はタウリン依存的に大腸炎抑制効果を発揮することが示唆された。最後に、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。遺伝子 Y に関する先行研究は少ないため、我々はその機能を解析するために本遺伝子のノックアウトマウスを作製した。現在、遺伝子 Y が大腸炎の抑制に関与しているか解析中である。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。

このように、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、宿主の摂取した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、我々は常に食事を介してメチル水銀を一定量摂取している。しかし、メチル水銀が腸内細菌叢の構成を変化させるメカニズムは解明されていない。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。そこで三つ目の研究課題として、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。まず、我々は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事を、SPF マウスと無菌マウスの比較によって明らかにした。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* 属菌に含まれる4種の菌を用い、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している可能性が示唆された。実際に、無菌マウスでは、腸内細菌の存在する SPF マウスと比べて糞便中の活性イオウ分子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ことが示唆された。今後、メチル水銀と同様にタンパク質を修飾する可能性のある環境中化学物質（大気汚染物質であるナフトキノ類、米に含まれるカドミウムなど）の腸内細菌との相互関係を解明することで、腸内細菌叢の構成異常を未然に防ぐ方法を見出せる可能性がある。

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、環境中化学物質により腸内細菌叢が攪乱され、宿主恒常性の破綻が招かれる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。