

博士学位論文 2020（令和二）年度

腸内環境変化が宿主生理機能に  
与える影響の解明  
【要約版】

慶應義塾大学大学院薬学研究科

関夏実

## 目次

### 第 1 章 抗肥満作用を示す腸内細菌由来代謝物の探索

1. 序論-----	6
2. 実験材料と方法-----	8
2-1 動物実験	
2-2 アカルボース、バンコマイシン塩酸塩、代謝物 X の投与実験	
2-3 糞便中細菌ゲノム DNA の抽出と 16S rDNA 領域のシーケンシング	
2-4 16S rDNA シーケンシングのデータ解析	
2-5 盲腸内容物中乳酸の測定	
2-6 耐糖能の測定	
2-7 肝臓中の中性脂肪・コレステロールの測定	
2-8 定量 PCR	
2-9 血漿中コレステロール濃度およびトリグリセリド濃度の測定	
2-10 ヘマトキシリン&エオジン (H&E) 染色	
2-11 食餌由来の糖およびアカルボースが <i>L. murinus</i> の増殖に及ぼす影響の評価	
2-12 CE-TOFMS による盲腸内容物のメタボローム解析	
2-13 RNA シーケンス解析	
2-14 HepG2 細胞の培養	
2-15 リポ蛋白質中コレステロールの測定	
2-16 GC-MS による糞便内容物および血漿中の代謝物 X の定量	
2-17 LC-MS を用いた脂質代謝物のメタボローム解析	
2-18 統計処理	
3. 結果-----	16
3-1 アカルボースは抗肥満作用を示す	
3-2 アカルボースの抗肥満作用には食餌性多糖が必要である	
3-3 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	
3-4 アカルボース、バンコマイシンの投与は腸内細菌叢を変化させる	
3-5 <i>Lactobacillus murinus</i> の単菌定着マウスにおいてアカルボースは抗肥満作用を 発揮する	

3-6	肥満抵抗性マウスの盲腸内容物中では代謝物 X と乳酸が増加する	
3-7	アカルボースの抗肥満作用発揮に乳酸は関与しない	
3-8	代謝物 X は抗肥満作用を示す	
3-9	代謝物 X は肝臓で代謝を受ける	
3-10	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	
3-11	代謝物 X および代謝物 X の硫酸抱合体は肝細胞においてコレステロール合成遺伝子を低下させる	
4.	考察	-----22

## 第 2 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

1.	序論	-----26
2.	実験材料と方法	-----28
2-1	動物実験	
2-2	DSS 誘導性大腸炎	
2-3	抗生剤、多糖類、タウリンの投与実験	
2-4	糞便中リポカリン-2 の測定	
2-5	ヘマトキシリン&エオジン (H&E) 染色	
2-6	EdU アッセイによる細胞増殖の測定	
2-7	腸管組織透過性の評価	
2-8	糞便 DNA の抽出と 16S rDNA 領域のシーケンシング	
2-9	16S rDNA シーケンシングのデータ解析	
2-10	アルギン酸の細菌の増殖に及ぼす影響	
2-11	CE-TOFMS によるメタボローム解析	
2-12	大腸上皮細胞の単離	
2-13	RNA シーケンス解析	
2-14	CMT93 細胞におけるタウリンの遺伝子 Y 誘導能の評価	
2-15	定量 PCR	
2-16	統計処理	
3.	結果	-----35

3-1	食物繊維の中でも特にアルギン酸は DSS 腸炎誘発後の生存率を上昇させる
3-2	アルギン酸は DSS 腸炎からの回復を促進する
3-3	アルギン酸は腸内細菌叢を変化させる
3-4	一部の <i>Bacteroides</i> 属菌はアルギン酸を資化する
3-5	抗生剤の投与下ではアルギン酸の腸炎治療効果は消失する
3-6	アルギン酸の投与により盲腸内容物中の代謝物組成が変化する
3-7	<i>B. acidifaciens</i> 、 <i>L. murinus</i> はタウリンの産生に関与する
3-8	タウリンの投与は DSS 腸炎からの回復を促進する
3-9	タウリントランスポーター ( <i>Slc6a6</i> ) のノックアウトマウスではアルギン酸の腸炎治療効果が消失する
3-10	アルギン酸およびタウリンの投与により腸管組織における遺伝子 Y の発現が上昇する
3-11	タウリンはマウス大腸由来細胞株において遺伝子 Y の遺伝子発現を直接誘導する
4.	考察-----41

### 第3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

1.	序論-----45
2.	実験材料と方法-----47
2-1	試薬
2-2	動物実験
2-3	BPM 標識アッセイおよびウェスタンブロッティング
2-4	<i>Lactobacillus</i> 属細菌の増殖能の測定
2-5	LC-ESI-MS/MS による H <sub>2</sub> S および H <sub>2</sub> S <sub>2</sub> の測定
2-6	水銀濃度の測定
2-7	統計処理

3. 結果-----	50
3-1 MeHg による腸内細菌タンパク質への親電子修飾	
3-2 MeHg 曝露による <i>Lactobacillus</i> 属菌の増殖への影響	
3-3 腸内細菌による活性イオウ分子産生と MeHg 曝露による水銀蓄積の抑制	
4. 考察-----	52
参考文献-----	54
謝辞-----	63

## 第 1 章

### 抗肥満作用を示す腸内細菌由来代謝物の探索

#### 略語

本論文では以下の略語を使用する。

Acar: acarbose

BMI: body mass index

BW: body weight

FBS: fetal bovine serum

GLP-1: glucagon-like peptide-1

GPR43: G-protein coupled receptor 43

HFD: high fat diet

OGTT: oral glucose tolerance test

MRM: multiple reaction monitoring

MACs: microbiota-accessible carbohydrates

OD: optical density

OTU: operational taxonomic unit

PBS: phosphate buffered saline

PCoA: principal coordinate analysis

PPAR $\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor

qPCR: quantitative polymerase chain reaction

SREBF2: sterol regulatory element binding transcription factor 2

Tbp: TATA-binding protein

Van: vancomycin

WAT: white adipose tissue

eWAT: epididymal white adipose tissue

WHO: World Health Organization

## 1. 序論

世界保健機 (World Health Organization: WHO) によると、肥満は body mass index (BMI) 30 以上と定義され、世界の肥満人口は 1975 年から約 3 倍に増加した。肥満は高血圧や II 型糖尿病、また高コレステロール血症などの脂質異常症に伴う心血管疾患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<sup>1,2</sup>。肥満は遺伝、環境、行動学的因子が複雑に関係して引き起こされるが、近年の研究により、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<sup>3</sup>。例えば、腸内細菌のいない無菌マウスは、食餌誘導性の肥満に抵抗性を示す<sup>4,5</sup>。また、無菌マウスに非肥満者または肥満者の糞便を移植すると、同一の食餌を与えているにもかかわらず、肥満者の糞便を移植されたマウスにおいてのみ肥満が誘導されることが報告されている<sup>6</sup>。特定の腸内細菌種が宿主の代謝機能に与える影響についてもいくつか報告されている。例えば、*Akkermansia muciniphila* や *Bacteroides acidifaciens* は抗肥満作用を有することが知られている<sup>7,8</sup>。また、腸内細菌の主要な代謝物である酢酸・プロピオン酸などの短鎖脂肪酸は、G-protein coupled receptor 43 (GPR43) を介して脂肪組織特異的にインスリンの作用を選択的に抑制することで、脂肪の蓄積を抑制することが報告されている<sup>9</sup>。しかし、約 40 兆個、100 種類以上存在するとされる腸内細菌は、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<sup>10</sup>、腸内細菌による代謝物を介した未知の宿主代謝制御機構が存在することが考えられる。

腸内細菌は、宿主が摂取した食物のうち、宿主酵素による消化吸収を免れた残滓を主な栄養源として生息している。特に腸内細菌が利用可能な炭水化物は Microbiota-accessible carbohydrates (MACs) と呼ばれている<sup>11</sup>。低 MACs 食を摂取させたマウスでは、腸内細菌叢の多様性が低下することや、短鎖脂肪酸が減少することが知られている<sup>11,12</sup>。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<sup>13,14</sup>。その結果、大腸での MACs 増加に伴い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<sup>15-18</sup>。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。過去の臨床試験のメタ分析において、アカルボース投与による体重減少効果は欧米の被験者よりも東洋の被験

者の方が顕著であることが示されており<sup>19</sup>、食文化や腸内細菌叢の違いがアカルボースの抗肥満作用に影響を与えることが考えられる。しかし、腸内環境の変化がアカルボースの抗肥満作用に寄与するという直接的な報告はない。そこで本研究は、アカルボースを投与した高脂肪食給餌マウスの腸内環境を詳細に解析することで、抗肥満作用を發揮する新規の腸内細菌由来代謝物を探索するとともに、その作用メカニズム解明を目的とした。



## 2. 実験材料と方法

### 2-1 動物実験

全ての動物実験は慶應義塾大学の動物実験委員会によって承認されたプロトコールに従って実施した（承認番号 17014）。マウスは、慶應義塾大学の実験動物ガイドラインに従って維持し、明暗周期 12/12 時間（照明点灯時間 8:00~20:00）、温度  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 5\%$  の環境下で飼育した。7 週齢 C57BL/6J 雄性マウスは日本 SLC 社（引佐）から購入した。搬入後 CE-2（日本クレア社）給餌下で馴化飼育し、9 週齢で実験に供した。実験開始日から高脂肪食の自由摂食を 7 週間または 10 週間行った。無菌マウスを用いた実験においては、慶應義塾大学薬学部コンベンションマウス室のアイソレーター内で繁殖させた無菌 IQI マウスを使用し、9 週齢で実験に供した。ビニルアイソレーター内で給餌する場合には餌を 50 kGy ガンマ線滅菌後に使用した。また、全ての実験において自由飲水とした。

### 2-2 アカルボース、バンコマイシン塩酸塩、代謝物 X の投与実験

アカルボース（TCL, Japan）は 0.5%、バンコマイシン塩酸塩（nacalai tesque, Japan）は 0.025%、ストレプトマイシンは 0.5% でそれぞれ Elix 水に溶解した。これらは全て 0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターにより滅菌後、自由飲水により与えた。

### 2-3 糞便中細菌ゲノム DNA の抽出と 16S rDNA 領域のシーケンシング

マウスの糞便より E.Z.N.A® Stool DNA kit（Omega Bio-Tek, USA）のプロトコールに従って DNA を溶出させた後、magLEAD 12gc（Precision System Science, Japan）を用いて DNA の精製を行なった。回収した DNA から、16S rDNA の V4 領域を Illumina のプロトコールに準拠し、KAPA HiFi HotStart ReadyMix（日本ジェネティクス）を用いて増幅した。

プライマーの配列は以下の通りである

Forward: 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'

Reverse: 5'-GGACTACHVHHHTWTCTAAT-3'

増幅産物を Nextera XT index kit (Illumina, USA) のプライマーを用いて PCR を行うことで、各検体由来の DNA にそれぞれ異なる index 配列を付加した。ライブラリーDNA を AMPure XP Beads (Beckman Coulter, USA) を用いて精製し、10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) で 10 nM に希釈した後プールした。プールされたライブラリーDNA は最終濃度 12 pM として 600  $\mu$ L を Miseq 600 cycle v3 kit (Illumina, USA) を用いてシーケンシングした。

#### 2-4 16S rDNA シーケンシングのデータ解析

解析には QIIME (version 1.9.1) を用いた<sup>20</sup>。配列データは trimmomatic-0.36.jar スクリプトによって Q スコア 25 以下の配列を除いた。まず join\_paired\_ends.py により ea-utils ソフトウェアパッケージの fastq-join メソッド<sup>21</sup>によって Forward read と Reverse read を結合し、split\_libraries\_fastq.py により FASTQ ファイルから FASTA ファイルへ変換した。次に cutadapt<sup>22</sup>によってプライマー配列の除去を行うと同時に 300 塩基以下の配列を除いた。5,000-10,000 リードをランダムサンプリングした後に identify\_chimeric\_seqs.py (usearch61 メソッド) によりキメラ配列の同定を行い、filter\_fasta.py によって除去をした。それぞれの FASTA ファイルを一つに結合後、pick\_denovo\_otu.py によって 96%の相同性で OTU テーブルの作成をした。Local BLAST 内の blastn プログラムを使い 16S (RDP ver. 10.27 and CORE update 2 September 2012)、NCBI genome database に基づいて菌種の同定を行った。core\_diversity\_analysis.py により多様性の計算を行った。

#### 2-5 盲腸内容物中乳酸の測定

マウス盲腸内容物サンプル 50 mg を 2 mL のプラスチックチューブに測り取り、9 倍量の H<sub>2</sub>O (w/w) 中に懸濁した。4°C、10,000  $\times$  g で 5 分間遠心分離し、上清 230  $\mu$ L に内部標準として 1 mM の 2-エチル酪酸溶液 (TCI, Japan) 11.5  $\mu$ L と、除タンパクのために 20% w/v の 5-スルホサリチル酸 (Wako, Japan) 23  $\mu$ L を加えた。よく混合し、15,000  $\times$  g で 15 分間遠心分離後、除タンパクされた上清を得た。この上清 200  $\mu$ L に 37%濃塩酸 (nacalai tesque, Japan) を 10  $\mu$ L 加えてよく混合し有機酸を遊離させ、ジエチルエー

テル (nacalai tesque, Japan) を 2 mL 加えてエーテル層を抽出した。エーテル層 500  $\mu$ L に誘導体化のため N-tert-butyltrimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide (Sigma-Aldrich, USA) を加え、24 時間室温暗所にてインキュベートしたものを解析に用いた。測定には HP-5 キャピラリーカラム (60 cm  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, US) を備えた GC-MS system (JMS-Q1500GC, 日本電子光学研究所) を用いた。

## 2-6 耐糖能の測定 (OGTT : Oral glucose tolerance test)

6 時間絶食後、20%ブドウ糖液 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Japan) を 2 mg/g になるように経口投与し、投与 15 分後、30 分後、1 時間後、2 時間後に尾静脈より採血を行った。その後、血糖値を血糖自己測定器 (ワンタッチウルトラビュー : Johnson & Johnson, USA) にて測定した。

## 2-7 肝臓中の中性脂肪・コレステロールの測定

肝臓中の脂質は Bligh and Dyer の方法に従って分離した<sup>23</sup>。肝臓組織に 19 倍量の PBS (nacalai tesque, Japan) を加え、パワーマッシャー II (Nippi, Japan) にてホモジナイズした。200  $\mu$ L のホモジネートに 750  $\mu$ L のメタノール・クロロホルム混合溶媒 (メタノール: クロロホルム=2:1) を加え、5 分間ボルテックスし、混合した。その後、200  $\mu$ L のクロロホルムを添加し 5 分間ボルテックスし、混合した。さらに 200  $\mu$ L の PBS を加え、5 分間ボルテックスしたのち、3,000  $\times$  g、5 分間の遠心分離により有機層と水層に分離した。下層の有機層のみを回収、乾枯させ、再度 2-プロパノールで溶解し、脂質抽出物とした。コレステロールはラボアッセイコレステロール (Wako, Japan)、中性脂肪はラボアッセイトリグリセライド (Wako, Japan) を用いてキット付属のプロトコルに従い定量した。

## 2-8 定量 PCR

マウスから摘出した各組織は RNA later (invitrogen, USA) に浸し、4°C にて保存した。後日、PureLink™ RNA mini Kit (invitrogen, USA) の製品プロトコルに準じて RNA 抽出を行なった。抽出した RNA は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Japan) の製品プロトコルに準じて cDNA の合成に用いた。KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Japan) を用いて、Step One Plus (Thermo Fisher Scientific, USA) を使用して real time PCR を行なった。PCR は 98°C, 10 秒、60°C, 10 秒、68°C, 30 秒を 40 サイクルという条件により行った。内部標準には TATA-binding protein (*Tbp*) 遺伝子を用いた。

## 2-9 血漿中コレステロール濃度およびトリグリセリド濃度の測定

実験終了時に心採血を行った。ヘパリンナトリウム注射液を 1 μL 加え 3,500 rpm で 15 分間遠心分離し、得た上清を血漿とした。血漿中総コレステロールおよびトリグリセリド濃度の測定は富士ドライケムスライド TCHO-PIII (Fujifilm, Japan) および富士ドライケムスライド TG-PIII (Fujifilm, Japan) を用い、生化学自動分析装置 (富士ドライケム 7000, Fujifilm, Japan) を使用して行った。

## 2-10 ヘマトキシリン&エオジン (H&E) 染色

肝臓組織サンプルを 10%ホルマリン中性緩衝液 (Mildform 10N, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) で一晩固定した。固定後、パラフィンブロックに埋め込み、マイクロトームを用いて 3 μm の切片を作成した。切片を脱パラフィン化・再水和し、ヘマトキシリン (Agilent Technologies, Inc., USA) およびエオジン (Wako, Japan) で染色した後、マウントクイック (Daido Sangyo Co., Ltd., Japan) で封入した。

## 2-11 食餌由来の糖およびアカルボースが *L. murinus* の増殖に及ぼす影響の評価

*Lactobacillus murinus* は C57BL/6J 雄性マウスの糞便より単離した株を用いた。下記に示す *Lactobacillus* 最小培地に、スクロース、マルトデキストリン、アカルボースを最終濃度が 1% (w/v) となるようそれぞれ添加し、対照群には滅菌水を添加した。各培地

に、菌の 24 時間培養液を 1/100 量添加・混合し、96 well プレートに 200  $\mu$ L ずつ添加した。濁度の測定には SpectraMax iD3 (MOLECULAR DEVICES, USA) を用い、好気条件下、37°C で 24 時間 1 時間ごとに 600 nm の吸光度を測定した。

< *Lactobacillus* 最小培地 >

以下を秤量し、Elix 水を加えて 100 mL とし、攪拌して溶解後、オートクレーブ (115°C, 15 分) した。

Yeast extract (Difco)	0.5 g
Bactopecton (Difco)	0.5 g
Na-acetate $\cdot$ 3H <sub>2</sub> O	0.2 g
*Salts solution	0.5 mL
Tween80 solution (TCI)	1 mL
*Salt solution (/10mL)	
MgSO <sub>4</sub> $\cdot$ 7H <sub>2</sub> O	400 mg
MnSO <sub>4</sub> $\cdot$ 5H <sub>2</sub> O	21.5 mg
FeSO <sub>4</sub> $\cdot$ 7H <sub>2</sub> O	20 mg
NaCl	20 mg

**2-12 CE-TOFMS による盲腸内容物のメタボローム解析**

盲腸内容物サンプルを凍結乾燥し、Shake Master NEO (Bio Medical Science, Tokyo, Japan) を用いて 3 mm ジルコニアビーズ 4 個と共に 1,500 rpm で 10 分間激しく振盪することで糞便サンプルを破壊した。10 mg ( $\pm$ 0.5 mg) の糞便サンプルを、内部標準物質 (メチオニンスルホン、D-カンファー-10-スルホン酸 (CSA) 各 20  $\mu$ M) を含む 500  $\mu$ L メタノールでホモジナイズし、100 mg の 0.1 mm および 4 個の 3 mm zirconia/silica beads (BioSpec Products, USA) を用いてホモジナイズした。Shake Master NEO (Bio Medical Science, Japan) を用いて 1500 rpm で 5 分間振盪した後、ミリ Q 水 200  $\mu$ L、クロロホルム 500  $\mu$ L を加え、同様に振盪した。4,600  $\times$  g、4°C で 15 分間遠心分離した後、上清を 5 kDa cutoff centrifugal filter tube に移した。濾液を 40 °C で遠心濃縮し、40  $\mu$ L のミリ Q 水を加えた。イオン性代謝物を、+及び-の両方のモードで CE-TOFMS を用いて分析した。本実験は、

Agilent CE キャピラリー電気泳動システム (Agilent Technologies, USA) を用いて実施した。

### 2-13 RNA シークエンス解析

NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina (Illumina, USA) を用いてマニュアルに従いライブラリを調製した。調製したライブラリは、Illumina HiSeq 2500 を用い、50-bp シングルエンドモードでシークエンスした。決定した配列をマウス参照ゲノム (mm10) にマッピングし、salmon ソフトウェア (ver. 0.13.1) を用いて mRNA の発現を定量した。定量化したデータは、tximport R パッケージ (ver. 1.8.0) を用いて変換した。実験群の出力は、DESeq2 R パッケージ (ver. 1.20.0) を用いて正規化、比較を行った。有意に発現量の異なる遺伝子については、DAVID ツール (19131956) を用いてエンリッチメント解析を行った。

### 2-14 HepG2 細胞の培養

HepG2 細胞を、10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) 、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin を含む低グルコース Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (1 g/L) (nacalai tesque, Japan) で培養した。48 well プレートに  $1.5 \times 10^4$  個の細胞を播種した。翌日、FBS を除いた培地に変更すると同時に 400 µM の代謝物 X または 400 µM の代謝物 X の硫酸抱合体を添加し、12 時間後に細胞を回収した。このとき、PureLink™ RNA mini Kit (invitrogen, USA) 付属の Lysis buffer に 1% の 2-mercaptoethanol を加えたもので細胞を溶解した。

### 2-15 リポ蛋白質中コレステロールの測定

血漿中のリポタンパク質は、過去の報告に従って<sup>24</sup>、スカイライトバイオテック (Japan) の HPLC にて二重酵素法を使用して分析した。

## 2-16 GC-MS による糞便内容物および血漿中の代謝物 X の定量

マウスの糞内容物 (~20 mg) を 200  $\mu$ L の PBS に懸濁し、15 分間ボルテックスし、室温で 20 分間 1,100  $\times$  g で遠心分離した。上清 200  $\mu$ L を 800  $\mu$ L のアセトニトリルと混合し、4°C、16,000  $\times$  g の条件で 3 分間遠心分離した。上清 850  $\mu$ L を乾固し、ピリジンに 2%で溶解したメトキシアミン塩酸塩を 50  $\mu$ L 添加し懸濁した。50  $\mu$ L の MSTFA + 1% TMCS (Thermo Fisher Scientific, USA) を添加し、37°Cで 30 分間、続いて 30°Cで 90 分間インキュベートすることで誘導体化した。マウス血漿 (200  $\mu$ L) を 800  $\mu$ L のアセトニトリルと混合し、4°C、16,000  $\times$  g の条件で 3 分間遠心分離した。上清 850  $\mu$ L を乾固し、ピリジンに 2%で溶解したメトキシアミン塩酸塩を 50  $\mu$ L 添加し懸濁した。TMCS 誘導体化は上記の方法で行った。4°C、20,000  $\times$  g の条件で 5 分間遠心分離後、上清を GC-MS/MS 分析に供した。代謝物 X 定量化のための GC-MS/MS 分析は、GCMS-TQ8040 (Shimadzu Corporation, Japan) を用い、GC 分離は BPX-5 カラム (内径 30.0 m $\times$ 0.25 mm, Shimadzu Corporation) を用いて行った。各試料中の代謝物 X の濃度は、外部標準法にて決定した。

## 2-17 LC-MS を用いた脂質代謝物のメタボローム解析

肝臓組織中のスクワレンおよびコレステロールエステルは、UltiMate™ 3000 RSLC システム (Thermo Scientific™ Dionex™)、orbitrap-type MS (Q-Exactive focus, Thermo Fisher Scientific) を用いた LC-MS により定量した。サンプルは、移動相 A (10 mM HCOONH<sub>4</sub> in 50% ACN (v) with 0.1% HCOOH (v)) と移動相 B (2 mM HCOONH<sub>4</sub> in ACN/IPA/H<sub>2</sub>O 10:88:2 (v/v/v) with 0.02% HCOOH (v)) を 65:35 (0 分), 40:60 (0-4 分), 15:85 (4-12 分), 0:100 (12-21 分), 0:100 (21-41 分) の比率、0.4 mL/分の流速にて、Accucore C18 カラム (2.1  $\times$  150 mm, 2.6  $\mu$ m, Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて分離した。Q-Exactive focus 質量分析計は、すべての検出について ESI ポジティブモードで操作した。Full mass scan (m/z 70-1000) を、データに依存した MS/MS 測定で 70,000 の分解能で使用した。オートゲインコントロールは 3  $\times$  10<sup>6</sup> イオンに設定し、最大イオン注入時間は 100 ミリ秒とした。Source ionization パラメータは、スプレー電圧 3 kV で最適化した。

その他のパラメータは以下の通りである。transfer temperature; 370°C, S-Lens level; 45, heater temperature; 370°C, Sheath gas; 60, Aux gas; 20, and Auxiliary gas; 20.

## 2-18 統計処理

2 群間の比較においては、正規分布である場合は F 検定により等分散性を調べ、等分散の場合には Student t 検定を使用し、不等分散の場合には Welch t 検定を採用した。非正規分布である場合には Mann–Whitney U test を使用した。3 群以上の比較においては、正規分布の場合には one-way ANOVA を用い、Tukey の多重比較検定を行なった。非正規分布である場合には Kruskal-Wallis 検定に続く Dunn 検定を行った。経時的変化を観察する場合、two-way ANOVA に続き、Šídák 検定を行った。p 値によって\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  と表記した。また、エラーバーには標準誤差を使用した。



### 3. 結果

#### 3-1 アカルボースは抗肥満作用を示す

アカルボースの抗肥満作用を確認するために、マウスに 7 週間高脂肪食を給餌し、0.5%アカルボースを飲水投与した。その結果、通常水を与えた群（以下、コントロール群）と比べ、アカルボース投与群で顕著に体重増加が抑制された。また、精巣上体脂肪重量の低下、脂肪細胞の縮小が観察された。肝臓重量もアカルボース投与群で顕著に低下した。また、アカルボースの投与は耐糖能試験におけるグルコース負荷後 60 分後、120 分後の血糖値を有意に低下させた。このとき、摂餌量は同等であった。これらの結果より、アカルボースは抗肥満作用を持つことが確認された。

#### 3-2 アカルボースの抗肥満作用には食餌性多糖が必要である

アカルボースは食物由来の多糖・二糖の分解・吸収を抑制する薬剤であることから、次に、アカルボースの抗肥満作用において食餌由来の多糖の存在が必須であるかを検証した。そのために、高脂肪食中に含まれる糖源であるスクロース、マルトデキストリンを全てグルコースに置換した飼料（グルコース置換高脂肪食, glucose-HFD）を用いた。この飼料を用いた場合、アカルボースの  $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害作用が働かず、食餌由来の多糖が大腸に到達しない。一方、四糖構造を持つアカルボースは吸収されにくい薬剤であるため、本飼料の給餌下においても大腸に到達すると考えられる。グルコース置換高脂肪食の給餌下でマウスに 7 週間アカルボースを投与したところ、コントロール群と比べ、体重増加量、脂肪・肝臓重量に変化はみられなかった。また、耐糖能の改善も見られなかった。以上の結果より、アカルボースの抗肥満作用発揮には食餌由来の多糖の存在が必要であることがわかった。

#### 3-3 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

次に、大腸に多糖が到達することで変化した腸内環境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抗生剤を用いた実験を行った。抗生剤は非吸収性であるバンコマイシンまたはストレプトマイシンを用い、

飲水投与で与えた。高脂肪食給餌マウスにバンコマイシンの投与下でアカルボースを併用投与すると、コントロール群、バンコマイシン単独投与群、アカルボース単独投与群と比べ、顕著な体重増加抑制が観察された。一方、ストレプトマイシンの単独投与と比べ、ストレプトマイシンとアカルボースの併用投与は有意に体重増加を抑制したものの、その差はわずか3g程度と軽微であった。そこでバンコマイシン/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、より詳細な解析を行った。肥満抵抗性マウスはコントロール群と比較して精巢上体脂肪重量、肝臓重量が少なく、耐糖能試験における空腹時血糖値、グルコース負荷後の血糖値の有意な低下がみられた。さらに、血中総コレステロール濃度、トリグリセリド濃度は肥満抵抗性マウスにおいて減少した。また、このとき摂餌量は同等であった。以上の結果より、バンコマイシンの投与はアカルボースの抗肥満作用を増強すること、アカルボースの抗肥満作用発揮には腸内細菌叢の変化が関与することがわかった。

### 3-4 アカルボース、バンコマイシンの投与は腸内細菌叢を変化させる

次に、アカルボース及びバンコマイシンの投与により腸内細菌叢がどのように変化するかを検証するために、16S rDNA シークエンシングにより糞便中の細菌叢を解析した。得られたデータについて、weighted UniFrac 距離に基づく主座標分析 (principal coordinate analysis: PCoA) を行った。その結果、コントロール群、アカルボース群、バンコマイシン群、バンコマイシン/アカルボース投与群それぞれで異なる領域にプロットされ、全ての群が固有の腸内細菌叢を持つことがわかった。また、コントロール群では *Clostridium* 属菌が優勢であったが、アカルボースの投与では *Bacteroides* 属、バンコマイシンの投与では *Akkermansia*、*Escherichia* 属菌がそれぞれ優勢であった。バンコマイシン/アカルボース投与群では、*Lactobacillus* 属菌が優勢であり、全体の60%を占めていた。さらに *Lactobacillus* 属菌は、肥満の指標である体重増加量、精巢上体脂肪重量と最も強い負の相関を示した。以上の結果より、アカルボース、バンコマイシンの投与は腸内細菌叢を変化させることが確認され、アカルボースによる抗肥満作用に腸内細菌叢が関与することが示唆された。また、*Lactobacillus* 属菌がアカルボースの抗肥満作用に関与する可能性があることが考えられた。

### 3-5 *Lactobacillus murinus* の単菌定着マウスにおいてアカルボースは抗肥満作用を発揮する

次に、*Lactobacillus* 属菌の単菌定着マウスにおいてアカルボースの抗肥満作用が発揮されるかを検証する実験を行った。そのために、バンコマイシン/アカルボース投与マウスで増加した *Lactobacillus* 属菌の中で最も優勢であった *Lactobacillus murinus* を無菌マウスに定着させ、7週間高脂肪食給餌下、通常水を投与する群とアカルボースを投与する群で抗肥満作用を比較した。その結果、アカルボースを投与した群で顕著な体重抑制、脂肪・肝臓重量の抑制、耐糖能の改善が見られた。一方で、コントロール群の糞便中より単離された *Faecalibacterium rodentium* の単菌定着マウスに、高脂肪食給餌下でアカルボースを投与したところ、アカルボース非投与群と比べ、7週間後の体重に変化は見られなかった。また、耐糖能試験におけるグルコース負荷 30 分後の血糖値は同等であった。以上より、アカルボースは *L. murinus* の単菌定着マウスにおいて顕著な抗肥満作用を発揮することがわかった。さらに、アカルボースにより大腸に到達する多糖のうち、どの多糖が *L. murinus* の増殖促進に関与するか調べるために、高脂肪食中に含まれる糖源であるスクロース、マルトデキストリン、また四糖構造を持つアカルボースをそれぞれ添加した培地で *L. murinus* を培養した。その結果、*L. murinus* はスクロースを添加した培地においてのみ顕著に増殖が促進された。以上の結果より、アカルボースによる抗肥満作用は、スクロースが *L. murinus* に供給されることで発揮されると考えられる。

### 3-6 肥満抵抗性マウスの盲腸内容物中では代謝物 X と乳酸が増加する

続けて、アカルボース投与により抗肥満作用がみられたマウスの腸管内でどのような腸内細菌由来代謝物が増加しているのかを確認するために、①バンコマイシン/アカルボース投与マウス、②アカルボースを投与した *L. murinus* 定着マウスの盲腸内容物中のメタボローム解析を行った。得られたデータを元に、UniFrac 距離に基づく主座標分析 (principal coordinate analysis: PCoA) を行った。その結果、バンコマイシン、アカルボース、またそれらの併用投与により各個体が群ごとに異なる位置にプロットされ、代謝物組成が各群に固有のものであることがわかった。次に、抗肥満に働く腸内細菌代謝物

を絞り込むために、Spearman 相関解析を行い、体重、精巣上体脂肪重量と負の相関性を示す 10 の代謝物に着目した。その結果、両実験において共通して負の相関性を示した代謝物として代謝物 X と乳酸が検出された。両代謝物は、バンコマイシン/アカルボースの投与マウス、*L. murinus* 定着アカルボース投与マウスの盲腸内容物中において、コントロール群と比較して有意に上昇していた。以上の結果から、肥満形質と負の相関を示す代謝物 X と乳酸が、抗肥満作用をもつ候補代謝物として絞り込まれた。

### 3-7 アカルボースの抗肥満作用発揮に乳酸は関与しない

次に、3-5 においてアカルボースによる抗肥満作用がみられなかった *Faecalibacterium rodentium* の単菌定着マウスにおける、盲腸内容物中の代謝物 X および乳酸濃度を調べた。その結果、アカルボース投与群の盲腸内容物中では非投与群と比べて代謝物 X 濃度は減少しており、一方で乳酸濃度は上昇していた。以上の結果より、乳酸の腸管内での増加は抗肥満作用と関連がないことが示唆された。

### 3-8 代謝物 X は抗肥満作用を示す

続いて、代謝物 X の抗肥満作用を検証するために、高脂肪食給餌マウスに代謝物 X を飲水投与した。その結果、コントロール群と比較して、代謝物 X 投与マウスにおいて顕著な体重増加抑制がみられた。また、脂肪重量（精巣上体、腎周囲、皮下、腸管膜脂肪）、肝臓重量は代謝物 X の投与群において有意に減少した。さらに、血漿中総コレステロール値は代謝物 X 投与群において有意に低下しており、体重増加量と正の相関関係にあった。一方、血漿中トリグリセリド値は同等であり、体重増加量との間に相関性はみられなかった。また、代謝物 X の投与により耐糖能試験におけるグルコース負荷 60 分後の血糖値が有意に低下した。このとき摂餌量に変化はなかった。以上の結果より、代謝物 X は抗肥満作用、耐糖能改善作用を示すことがわかった。

### 3-9 代謝物 X は肝臓で代謝を受ける

代謝物 X の消化管吸収の可否に関しては報告がない。そこで、代謝物 X の吸収性を調べるため、血漿中及び肝臓中の代謝物 X 濃度を測定した。その結果、代謝物 X の投与により血漿中代謝物 X 濃度は有意に上昇した。肝臓中では、代謝物 X 濃度の上昇は見られなかったものの、メタボローム解析の結果、代謝物 X の硫酸抱合体が増加していることがわかった。以上の結果より、代謝物 X は腸管で吸収され一部血中移行し、一部は肝臓で硫酸抱合を受けることが示唆された。

### 3-10 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

肝臓は脂質合成、糖新生、胆汁酸の合成などを介し全身の代謝機能において重要な役割を担っていること、代謝物 X は肝臓で代謝を受けることから、代謝物 X は肝臓機能に影響を与えることが考えられた。そこで、代謝物 X 投与マウスの肝臓組織の RNA シークエンシングを行った。得られたデータを元に、gene ontology 解析ツール DAVID を用いて遺伝子発現解析を行った。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ることがわかった。また、RNA シークエンシングによる遺伝子発現解析で減少が確認されたコレステロール合成関連遺伝子の発現低下を qPCR 法によっても再確認した。これらの結果と一貫して、代謝物 X 投与群の肝臓中では、総コレステロールとコレステロール合成の中間体であるスクワレンの減少がみられた。また、血漿中コレステロールエステル（コレステリルアラキドン酸、ドコサヘキサエン酸、オレイン酸、パルミチン酸、パルミトイン酸）、リポタンパク質中のコレステロール（リポタンパク質; LDL、HDL）が有意に減少した。以上の結果から、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、肥満に伴う全身のコレステロール値上昇を抑制する可能性が示唆された。

### 3-11 代謝物 X および代謝物 X の硫酸抱合体は肝細胞においてコレステロール合成遺伝子を低下させる

最後に、代謝物 X 投与マウスの肝臓で見られたコレステロール合成遺伝子の低下作用が肝臓細胞に対する直接的なものであるかを検証する実験を行った。そのために、

ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 に代謝物 X または代謝物 X の硫酸抱合体を添加し、qPCR 法により遺伝子発現を比較した。その結果、代謝物 X および代謝物 X の硫酸抱合体の添加により、コレステロール合成遺伝子群の有意な低下が観察された。また、コレステロール合成遺伝子群の上流に位置し、制御因子として知られる膜結合型転写因子 *SREBF2* 遺伝子の発現も両化合物の添加により有意に低下した。以上の結果より、代謝物 X および代謝物 X の硫酸抱合体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。

#### 4. 考察

本研究では、アカルボースとバンコマイシンの併用投与が強い抗肥満作用を発揮することを発見し、両薬剤を投与したマウスを“肥満抵抗性マウス”として解析を行った。その結果、抗肥満作用を持つ腸内細菌由来代謝物として代謝物 X を同定した。アカルボースに抗肥満作用があることは既に知られていたが、その詳細なメカニズムは報告されていない。アカルボースを投与することにより、マウス腸管内において *Bacteroidaceae* 科菌および *Bifidobacteriaceae* 科菌が増加することや<sup>16</sup>、糞便中の短鎖脂肪酸が増加することが示されていたが<sup>14,25</sup>、抗肥満作用と腸内細菌叢構成変化の関連性については明らかにされていなかった。本研究により、食餌由来の多糖が腸内細菌に供給され、腸内環境が変化することがアカルボースの抗肥満作用発揮において重要であることが示唆された。

一方で、アカルボースを投与したマウスと、アカルボース/バンコマイシンを投与したマウスでは、腸内細菌叢の構成が大きく異なっていた。アカルボース単独投与で増加した *Bacteroides* 属菌の中では、*B. acidifaciens* が最優勢であった。*B. acidifaciens* は抗肥満作用を有することが報告されており、脂肪組織において  $\beta$ -酸化に関与する peroxisome proliferator-activated receptor (*PPAR $\alpha$* ) の遺伝子発現を促進することや、インスリン分泌を促進する glucagon-like peptide-1 (GLP-1) の血中濃度を上昇させることが報告されている<sup>8</sup>。このことは、アカルボース単独投与による抗肥満作用はアカルボース/バンコマイシン併用投与とは異なるメカニズムによることが考えられる。

また、バンコマイシン/アカルボースの投与は代謝物 X の投与と比較して顕著な抗肥満作用を示していることから、代謝物 X により本肥満抵抗性モデルの抗肥満作用を完全に説明することは難しく、その他の代謝物による宿主代謝調節機構が寄与している可能性が考えられる。例えば、バンコマイシン/アカルボースの投与実験において、体重増加量及び脂肪重量との間に最も強い負の相関がみられた代謝物であるコハク酸は、褐色脂肪細胞における熱産生を促し、エネルギー支出を増加させることが報告されている<sup>26</sup>。また、コハク酸の次に高い負の相関を示した  $\text{NAD}^+$  は、高脂肪食の投与により肝臓や脂肪組織中での濃度が低下することが報告されており<sup>27</sup>、インスリン感受性に関与することや<sup>28</sup>、 $\text{NAD}^+$  の投与により体重増加が抑制されることが示されている<sup>29</sup>。このように、

複数の腸内細菌代謝物の相乗効果が、宿主の生理機能を複雑に制御していると考えられる。

本研究によって初めて、代謝物 X は特定の腸内細菌に関連して腸管内で産生され、腸管吸収を受け全身に移行し、抗肥満作用、肝臓におけるコレステロール合成を阻害する物質であることが明らかとなった。また代謝物 X は、コレステロール代謝の制御に関わる転写因子 *SREBF2* の mRNA も低下させた。現在高コレステロール血症に対する第一選択として使用されているスタチン系薬剤は、コレステロール合成の律速酵素 HMG-CoA を阻害することで肝臓内のコレステロールを枯渇させ、*SREBF2* の発現をむしろ正に調節する。その結果、*SREBF2* によって制御される low density lipoprotein receptor (LDLR) の発現を上昇させ、肝臓中にコレステロールを取り込むことで血中コレステロールを低下させる<sup>30</sup>。したがって、代謝物 X によるコレステロール合成阻害作用は既存のメカニズムとは異なる可能性がある。またスタチン系薬剤は、II 型糖尿病のリスク上昇や<sup>31-33</sup>、脂肪蓄積の増加など<sup>34</sup>、高コレステロール血症患者にとっては通常好ましくない作用があることが報告されている。一方で本研究により新たなコレステロール合成抑制剤の候補となった代謝物 X は、食餌性肥満を抑制し、耐糖能を改善する作用を有する。代謝物 X を臨床に応用するためには、さらなる詳細なメカニズム解明や安全性の確認、抗肥満作用とコレステロール合成阻害作用の因果関係の解明が求められるが、既存の薬剤の問題点を解決した汎用性の高い化合物である可能性がある。

また、代謝物 X は無菌マウスに *L. murinus* 単菌を定着させ、アカルボースを投与した場合に盲腸内容物中で増加した。さらに、アカルボースの投与により大腸に到達する糖のうち、特にスクロースが *L. murinus* の増殖を促進した。スクロースはグルコースとフルクトースが  $\alpha$ -1,2-グリコシド結合した二糖であり、通常は小腸で  $\alpha$ -グルコシダーゼにより分解され容易に吸収されるため、大腸での主な発酵基質とはならないと考えられる。しかし、アカルボースの投与により易消化性のスクロースが *L. murinus* に供給され特殊な腸内環境が作られたことで、菌体内代謝に変化が生じ、代謝物 X を産生した可能性が考えられる。今後は、*L. murinus* が代謝物 X を産生するための基質や合成酵素、また消化管における主な産生部位など、詳細な合成機構を解明する必要がある。



本研究により、*Lactobacillus* 属菌関連代謝物である代謝物 X が、肝臓でのコレステロール合成と食事誘発性肥満を抑制する物質として新たに同定され、宿主の代謝恒常性維持における腸内細菌の役割の一端が解明された。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。

## 第 2 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

#### 略語

本章では以下の略語を使用する。

ADMA : asymmetric dimethylarginine

Alg: Alginate

BSA: bovine serum albumin

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

DSS: dextran sodium sulfate

DTT: dithiothreitol

EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

FITC: fluorescein isothiocyanate

HBSS: Hank's balanced salt solution

IBD: inflammatory bowel disease

LCN2: Lipocalin-2

LI: large intestine

PBS: phosphate-buffered saline

qPCR: quantitative PCR

SAM: S-adenosylmethionine

SI: small intestine

Tau: Taurine

TNBS: trinitrobenzene sulfonic acid

## 1. 序論

炎症性腸疾患（IBD：Inflammatory Bowel Disease）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。潰瘍性大腸炎は、大腸に限局して粘膜に潰瘍と炎症が起こり、連続性の病変がみられる。一方、クローン病は、小腸と大腸を中心に全消化管に非連続性の病態を呈する。どちらも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<sup>35</sup>。また、発症原因が不明であることから、現在、根本的な治療法は存在せず、病変部位の炎症を抑えることが主な治療目標とされている。薬物療法としては、抗炎症薬アミノサリチル酸製剤から導入し、炎症の強さに応じて副腎皮質ステロイド、免疫調節薬、生物学的製剤である抗体医薬など、効果は強いが副作用リスクの高い薬剤へとステップアップしていく治療が主に採用されている<sup>36,37</sup>。そのため、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。

前述のように、IBDの病因は明らかにされていないものの、遺伝学的因子・環境因子が深く関わっている可能性が示唆されている。環境因子の一つとして近年、腸内細菌叢の構成異常、すなわち、ディスバイオーシスがIBDの発症や進展に関与することが報告されている<sup>38</sup>。例えば、IBD患者では健常者と比べて腸内細菌の多様性が低下していること、*Clostridium* cluster IV, XIVa 細菌群に多い酪酸産生菌が減少していること、*Escherichia coli* などの Enterobacteriaceae 科菌群が増加していることが報告されている<sup>39,40</sup>。こうしたIBD患者の腸内細菌叢のディスバイオーシスを回復させるために、健常者の糞便中に含まれる腸内細菌を患者に移植する、便微生物叢移植療法が行われている<sup>41,42</sup>。

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。食物繊維はその構成糖の種類や糖鎖の長さ、結合様式の違いにより異なる腸内細菌叢の変化をもたらす<sup>43,44</sup>。また、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。例えば、アルギン酸ナトリウムはデキストラン硫酸ナトリウム（DSS: Dextran Sodium Sulfate）誘導性大腸炎、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS: trinitrobenzene sulfonic acid）誘導性大腸炎を抑制することが報告されている<sup>45,46</sup>。また、グルコマンナン、イヌリン、セルロースなどの水溶性食

物繊維も、それぞれ動物実験において腸炎抑制効果が示されている<sup>47-49</sup>。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は不明な点が多い<sup>47-49</sup>。

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. 実験材料と方法

### 2-1 動物実験

全ての動物実験は慶應義塾大学の動物実験委員会によって承認されたプロトコールに従って実施した（承認番号 17014）。マウスは、慶應義塾大学の実験動物のガイドラインに従って維持し、明暗周期 12/12 時間（照明点灯時間 8:00～20:00）、温度  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 5\%$  の環境下で飼育した。6 週齢 C57BL/6J 雄性マウスは日本 SLC 社（引佐）から購入した。搬入後は CE-2（日本クレア社）給餌下で馴化飼育し、7 週齢で実験に供した。

### 2-2 DSS 誘導性大腸炎

分子量：36,000-50,000 の DSS（MP Biomedicals, USA）溶液は、Elix 水に終濃度 2.5% または 2% で溶解し、 $0.22 \mu\text{m}$  のフィルターにより滅菌した。実験開始日より DSS を自由飲水により 5 日間与え、その後通常水に交換した。生存率を評価する 3-1 においては 2.5% DSS を与え、3-2 以降は 2% DSS を与えることで体重変化を観察した。

### 2-3 抗生剤、多糖類、タウリンの投与実験

抗生剤であるストレプトマイシン（nacalai tesque, Japan）は 0.5% の濃度で、エリスロマイシン（nacalai tesque, Japan）は 0.02% の濃度でそれぞれ Elix 水に溶解した。水溶性食物繊維であるアルギン酸ナトリウム（KIMICA, Japan）、ラミナリン（nacalai tesque, Japan）、プルラン（TCI, Japan）、グルコマンナン（TCI, Japan）は 1% でそれぞれ Elix 水に溶解した。タウリン（Wako, Japan）は 5% で Elix 水に溶解した。これらは全て  $0.22 \mu\text{m}$  のフィルターにより滅菌後、DSS の投与終了後に飲水投与または経口投与により与えた。

### 2-4 糞便中リポカリン-2 の測定

-80°C で保存した糞便の重量を測定し、0.1% Tween-20 を含む PBS を 100 mg/mL とするよう加え懸濁した。懸濁液を 20 分間 vortex 後、4°C、13,000 g の条件で 10 分間遠心分離し、上清を分取した。上清は 1% BSA を含む PBS を用いて希釈した。ELISA は Mouse Lipocalin-2/NGAL DuoSet ELISA (R&D Systems, USA) の製品プロトコルに従って行った。

## 2-5 ヘマトキシリン&エオジン (H&E) 染色と病理スコアの評価

大腸組織サンプルを 10%ホルマリン中性緩衝液 (Mildform 10N, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) で一晩固定した。固定後、パラフィンブロックに埋め込み、ミクロトームを用いて 3  $\mu\text{m}$  の切片を作成した。切片を脱パラフィン化・再水和し、ヘマトキシリン (Agilent Technologies, Inc., USA) およびエオジン (Wako, Japan) で染色した後、マウントクイック (Daido Sangyo Co., Ltd., Japan) で封入した。作成した組織染色サンプルの病理スコアの評価は新組織科学研究所 (Japan) に委託した。

## 2-6 EdU アッセイによる細胞増殖の測定

マウスに 50  $\mu\text{g}$  の EdU (EdU ; 関東化学株式会社) を腹腔内注射した。3 時間後、大腸下部組織を採取して上記 H&E 染色と同様の方法で固定、パラフィンブロック・切片の作成、脱パラフィンを行った。染色は、Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) を用い、キットの製品プロトコルに従って EdU を検出後、蛍光顕微鏡 BZ-9000 (KEYENCE, Japan) にて観察した。

## 2-7 腸管組織透過性の評価

4-kDa FITC-dextran (Sigma-Aldrich, USA) を 100 mg/mL とするよう PBS を用いて希釈した。マウスを 4 時間絶食させ、体重 100 g あたり 60 mg の FITC-dextran を経口投与した。投与 4 時間後にイソフルラン麻酔下、心採血を行った。採取した血液をヘパリンと混合し、4°C 1000  $\times$  g の条件で 10 分間遠心分離し、血漿を回収した。回収した血漿を

PBS で希釈し、マイクロプレートリーダー infinite M1000 (Tecan, CH) を用いて蛍光強度を測定した。

## 2-8 糞便 DNA の抽出と 16S rDNA 領域のシーケンシング

マウスの糞便より E.Z.N.A® Stool DNA kit (Omega Bio-Tek, USA) のプロトコルに従って DNA を溶出させた後、magLEAD 12gc (Precision System Science, Japan) を用いて DNA の精製を行なった。回収した DNA から、16S rDNA の V3-V4 領域を Illumina のプロトコルに準拠し、KAPA HiFi HotStart ReadyMix (日本ジェネティクス) を用いて増幅した。

プライマーの配列は以下の通りである

Forward: 5'-CCTNCGGGNGGCNGCAG-3'

Reverse: 5'-GGATTAGATACCCNNGTAGTC-3'

増幅産物を Nextera XT index kit (Illumina, USA) のプライマーを用いて PCR を行うことで、各検体由来の DNA にそれぞれ異なる index 配列を付加した。ライブラリー DNA を AMPure XP Beads (Beckman Coulter, USA) を用いて精製し、10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) で 10 nM に希釈した後プールした。プールされたライブラリー DNA は最終濃度 12 pM として 600 µL を Miseq 600 cycle v3 kit (Illumina, USA) を用いてシーケンシングした。

## 2-9 16S rDNA シーケンシングのデータ解析

解析には QIIME (version 1.9.1) を用いた<sup>20</sup>。配列データは trimmomatic-0.36.jar スクリプトによって Q スコア 25 以下の配列を除いた。まず join\_paired\_ends.py により ea-utils ソフトウェアパッケージの fastq-join メソッド<sup>21</sup>によって Forward read と Reverse read を結合し、split\_libraries\_fastq.py により FASTQ ファイルから FASTA ファイルへ変換した。次に cutadapt<sup>22</sup>によってプライマー配列の除去を行うと同時に 300 塩基以下の配列を除いた。5,000-10,000 リードをランダムサンプリングした後に identify\_chimeric\_seqs.py (usearch61 メソッド) によりキメラ配列の同定を行い、filter\_fasta.py によって除去をし

た。それぞれの FASTA ファイルを一つに結合後、pick\_denovo\_otu.py によって 96%の  
 相同性で OTU テーブルの作成をした。Local BLAST 内の blastn プログラムを使い 16S  
 (RDP ver. 10.27 and CORE update 2 September 2012)、NCBI genome database に基づいて  
 菌種の同定を行った。core\_diversity\_analysis.py により多様性の計算を行った。

## 2-10 アルギン酸の細菌の増殖に及ぼす影響

### 2-10-1 培地の作成

<糖非含有 GAM 液体培地>

GAM 糖分解用半流動培地（日水製薬株式会社）を 26.25 g 秤量し、100 mL の Elix 水  
 を加え、攪拌して溶解した。漏斗とろ紙を用いて 500 mL 容メスシリンダーにろ過した。  
 ろ液を Elix 水で 450 mL にメスアップし、耐熱性瓶に分注後、オートクレーブ（115°C,  
 15 分）した。

<Lactobacillus 最小培地>

以下を秤量し、Elix 水を加えて 100 mL とし、攪拌して溶解後、オートクレーブ（115°C,  
 15 分）した。

Yeast extract (Difco)	0.5 g
Bactopecton (Difco)	0.5 g
Na-acetate · 3H <sub>2</sub> O	0.2 g
*Salts solution	0.5 mL
Tween80 solution (TCI)	1 mL
*Salt solution (/10mL)	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	400 mg
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	21.5 mg
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	20 mg
NaCl	20 mg

### 2-10-2 細菌の培養



*Bacteroides acidifaciens*, *Lactobacillus murinus* は C57BL/6J の雄マウスの糞便より単離した株を、*B. ovatus*, *B. fragilis* はヒト糞便由来の株を用いた。*Bacteroides* 属の各菌株の培養においては、上記糖非含有 GAM 液体培地にグルコースまたはアルギン酸ナトリウムを最終濃度が 0.5% (w/v) になるよう添加した。*L. murinus* の培養においては、最終濃度が 1% (w/v) になるよう、グルコースまたはアルギン酸ナトリウムを上記 *Lactobacillus* 最小培地に添加し、対照群には滅菌水を添加した。それぞれの培地に、菌の 24 時間培養液を 1/100 量添加し、96 well プレートに 200  $\mu$ L ずつ添加した。なお、*Bacteroides* 属の培養は嫌気チャンバー内で行い、*L. musinus* の培養は好気条件下で行った。濁度の測定には SpectraMax iD3 (MOLECULAR DEVICES, USA) を使い、37°C で 24 時間 1 時間ごとに 600 nm の吸光度を測定した。

## 2-11 CE-TOFMS によるメタボローム解析

糞便サンプルを凍結乾燥し、Shake Master NEO (Bio Medical Science, Japan) を用いて 3 mm ジルコニアビーズ 4 個と共に 1,500 rpm で 10 分間激しく振盪することで糞便サンプルを破壊した。10 mg ( $\pm 0.5$  mg) の糞便サンプルを、内部標準物質 (メチオニンスルホン、D-カンファー10-スルホン酸 (CSA) 各 20  $\mu$ M) を含む 500  $\mu$ L メタノールでホモジナイズし、100 mg の 0.1 mm および 4 個の 3 mm zirconia/silica beads (BioSpec Products, US) を用いてホモジナイズした。Shake Master NEO (Bio Medical Science, Japan) を用いて 1,500 rpm 5 分間振盪した後、ミリQ水 200  $\mu$ L、クロロホルム 500  $\mu$ L を加え、同様に振盪した。4,600  $\times$  g、4°C で 15 分間遠心分離した後、上清を 5 kDa cutoff centrifugal filter tube に移した。濾液を 40 °C で遠心濃縮し、40  $\mu$ L のミリQ水を加えた。イオン性代謝物を、+及び-の両方のモードで CE-TOFMS を用いて分析した。本実験は、Agilent CE キャピラリー電気泳動システム (Agilent Technologies, USA) を用いて実施した。

## 2-12 大腸上皮細胞の単離

大腸組織を 1 mM DTT、30 mM EDTA を含む Hank's balanced salt solution (HBSS) 中、氷上で 20 分間インキュベートした。その後、26 ゲージの針付きシリンジを用いて大

腸上皮細胞を剥離し、氷冷した HBSS で洗浄した。洗浄後の大腸上皮細胞は、PureLink™ RNA Mini Kit (invitrogen, USA) 付属の Lysis buffer に 1% 2-mercaptoethanol を加えたもので溶解した。

## 2-13 RNA シークエンス解析

NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina (Illumina, USA) を用いてマニュアルに従いライブラリを調製した。調整したライブラリは、Illumina HiSeq 2500 を用い、50-bp シングルエンドモードでシークエンスした。決定した配列をマウス参照ゲノム (mm10) にマッピングし、salmon ソフトウェア (ver. 0.13.1) を用いて mRNA の発現を定量した。定量化したデータは、tximport R パッケージ (ver. 1.8.0) を用いて変換した。実験群の出力は、DESeq2 R パッケージ (ver. 1.20.0) を用いて正規化、比較を行った。有意に発現量の異なる遺伝子については、DAVID ツール (19131956) を用いてエンリッチメント解析を行った。

## 2-14 CMT93 細胞におけるタウリンの遺伝子 Y 誘導能の評価

CMT93 細胞を 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) 、1% GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, USA) 、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) で培養し、2 日ごとに継代した。24 well プレートに  $5 \times 10^6$  個の細胞を播種すると同時に 40 mM、80 mM、160 mM のタウリンを添加し、12 時間後に細胞を回収した。このとき、PureLink™ RNA mini Kit (invitrogen, USA) 付属の Lysis buffer に 1% 2-mercaptoethanol を加えたもので細胞を溶解した。

## 2-15 定量 PCR

マウスから摘出した大腸組織は RNA later (invitrogen, USA) に浸し、4°C にて保存した。後日、PureLink™ RNA mini Kit (invitrogen, USA) の製品プロトコルに準じて RNA 抽出を行なった。抽出した RNA は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Japan) の製品プロトコルに準じて cDNA の合成に用いた。KOD SYBR qPCR

Mix (TOYOBO, Japan) と以下に記す各プライマーを用いて、Step One Plus (Thermo Fisher Scientific, US) を使用して real time PCR を行なった。PCR は 98°C 10 秒, 60°C 10 秒, 68°C 30 秒を 40 サイクルという条件により行った。内部標準には TATA-binding protein (*Tbp*) 遺伝子を用いた。

< *Tbp* >

Forward: 5'-GCTGTTGCTATGCTGGTATCT-3'

Reverse: 5'-GACTGGATTGTGGGAGAATGAA-3'

< 遺伝子 *Y* >

Forward: 5'- ACCGTGAATCTTGGCTGTAAA-3'

Reverse: 5'- GCAGCAAATCGCTTGGGATTA-3'

## 2-16 統計処理

2 群間の比較においては、正規分布である場合は F 検定により等分散性を調べ、等分散の場合には Student t 検定を使用し、不等分散の場合には Welch t 検定を採用した。非正規分布である場合には Mann-Whitney U test を使用した。3 群以上の比較には、Dunnett 検定を用いた。経時的変化を観察する場合、two-way ANOVA に続き、Šídák 検定を行った。p 値によって\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  と表記した。また、エラーバーには標準誤差を使用した。

### 3. 結果

#### 3-1 食物繊維の中でも特にアルギン酸は DSS 腸炎誘発後の生存率を上昇させる

まず、複数種の水溶性食物繊維を DSS 大腸炎誘導後（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のかを検討した。水溶性食物繊維は、過去に DSS 腸炎抑制効果の報告されているアルギン酸ナトリウム（以後アルギン酸）<sup>45,46</sup>、ラミナリン<sup>50</sup>に加え、報告のないアラビノガラクトタン、プルランを用いた。2.5% DSS を 5 日間飲水投与することで腸炎を誘導し、その後それぞれの水溶性食物繊維を 1% の濃度で自由飲水により与えた。その結果、通常水を与えた群（以後コントロール群）では DSS 投与開始後 12 日目で全マウスが死亡したのに対し、アルギン酸およびプルラン投与マウスでは生存日数が有意に延長した。特にアルギン酸投与群は DSS 投与 14 日目の実験終了まで全てのマウスが生存した。この結果から、水溶性食物繊維の中でも特にアルギン酸は DSS 腸炎誘発後の治療効果が高いことがわかった。

#### 3-2 アルギン酸は DSS 腸炎からの回復を促進する

次に、DSS 腸炎に対するアルギン酸の治療効果についての詳細な解析を行うために、2% DSS を 5 日間飲水投与し、その後 1% アルギン酸を与えた。その結果、アルギン酸投与群ではコントロール群と比較して体重の回復が顕著であった。DSS 腸炎モデルでは炎症が起こると大腸が短縮、肥厚し、重量が増大することが知られている。アルギン酸投与群の大腸ではコントロール群と比較して、大腸が長く、1cm あたりの重量も有意に小さかった。また、炎症マーカーとして知られるリポカリン-2 の糞便中濃度はアルギン酸投与群で低値であった。さらに、大腸の組織切片を H&E 染色し、観察したところ、コントロール群では上皮細胞とクリプト構造の破壊、炎症性細胞の浸潤が観察されたのに対し、アルギン酸投与群ではこれらの病変が軽減しており、病理スコアが有意に低かった。また、腸炎回復に伴う上皮細胞の再生能を評価するために、増殖中の細胞に取り込まれる 5-エチニル-2'-デオキシウリジン（EdU）を検出した。その結果、アルギン酸の投与により EdU 陽性の細胞数が有意に増加した。また、腸炎が引き起こされると、腸管透過性が高くなるが、アルギン酸投与マウスではコントロール群と比べて腸管

透過性が低かった。以上の結果より、アルギン酸は DSS 誘導性大腸炎の回復を促進させることが示唆された。

### 3-3 アルギン酸は腸内細菌叢を変化させる

アルギン酸をラットへ投与すると腸内細菌叢の組成が変化することが報告されている<sup>51</sup>。そこで、マウスに腸炎を誘導後、アルギン酸を 5 日間投与した後の腸内細菌叢の変化を 16S rDNA シークエンスにより解析した。なお、DSS 単独の処理によっても腸内細菌叢が変化することが知られているため、DSS 投与下でのアルギン酸の腸内細菌叢に及ぼす影響に絞り評価した。その結果、アルギン酸の投与により *Bacteroides* 属、*Lactobacillus* 属菌の割合が増加した。以上の結果より、アルギン酸は腸内細菌叢を変化させることがわかった。

### 3-4 一部の *Bacteroides* 属菌はアルギン酸を資化する

次に、アルギン酸の投与により増加した *Bacteroides* 属、*Lactobacillus* 属菌の中でも特に優勢であった *Bacteroides acidifaciens*、*Lactobacillus murinus* がアルギン酸の資化能を有するかを検討した。アルギン酸を唯一の炭素源とする培地で菌を培養し、増殖の指標となる吸光度を 24 時間 1 時間おきに測定した。なお、ポジティブコントロールとして、単糖であり菌が利用しやすいグルコース添加培地群を設けた。その結果、*B. acidifaciens* は、糖非添加培地と比べて、グルコース添加培地およびアルギン酸添加培地において、増殖が促進された。*B. acidifaciens* はマウス腸内では優勢な菌種であるが、ヒトの腸内にはほとんど存在しない。そこで、ヒト由来の *Bacteroides* 属菌である *B. ovatus*、*B. fragilis* にアルギン酸の資化能があるかを検証した。その結果、*B. ovatus* はアルギン酸の存在下で増殖が促進したが、*B. fragilis* はアルギン酸を添加しても糖非添加培地で培養した場合と同等の増殖能を示した。一方、*L. murinus* はグルコースを添加した培地においてのみ増殖が促進されたが、アルギン酸添加培地では増殖は促進されなかった。そのため、*B. acidifaciens* が間接的に *L. murinus* の増殖を促進している可能性を考えた。そこで上記の仮説を検証するために、*B. acidifaciens* をアルギン酸存在

下または非存在下で培養した上清を、*L. murinus* を培養する際に添加し、増殖能を比較した。その結果、アルギン酸非添加培地で *B. acidifaciens* を培養した上清と比べて、アルギン酸添加培地で *B. acidifaciens* を培養した上清を添加した場合において *L. murinus* の増殖が促進された。

これらのことから、アルギン酸の投与によりマウス腸管内で増加した *B. acidifaciens* とヒトの腸管内にも存在する *B. ovatus* はアルギン酸を資化でき、*L. murinus* は *B. acidifaciens* とアルギン酸の存在下で間接的に増殖が促進されることがわかった。

### 3-5 抗生剤の投与下ではアルギン酸の腸炎治療効果は消失する

次に、アルギン酸による腸炎治療効果が腸内細菌依存的であるかを評価するために、抗生剤の投与下でアルギン酸の腸炎治療効果を検証した。抗生剤はその種類によって抗菌スペクトラムが異なるため、使用する抗生剤の違いにより形成される腸内細菌叢も異なる。ストレプトマイシンは *Bacteroidales* 目を増加させることが報告されており<sup>52</sup>、エリスロマイシンは *Bacteroidales* 目を減少させることが過去の実験からわかっている。本実験では、DSS 腸炎を誘導後、対照的なスペクトラムを有するこれらの抗生剤の投与下でアルギン酸の腸炎治療効果を検証した。その結果、いずれの抗生剤投与マウスにおいても、アルギン酸の投与群とコントロール群との間で DSS 投与後の体重変化に差がみられなかった。また、抗生剤非投与下ではアルギン酸の投与により *Bacteroides*、*Lactobacillus* 属菌の増加がみられたが、抗生剤投与下ではアルギン酸投与群とコントロール群と間で *Bacteroides*、*Lactobacillus* 属菌の割合に差はみられなかった。これらの結果から、アルギン酸の腸炎治療効果には *Bacteroides*、*Lactobacillus* 属菌の増加が関与する可能性が考えられる。

### 3-6 アルギン酸の投与により盲腸内容物中の代謝物組成が変化する

腸内細菌は短鎖脂肪酸をはじめとするさまざまな代謝物を産生し、宿主の生理機能に影響を及ぼす。そこで、アルギン酸投与による腸管内の代謝物組成の変化を検証するために、盲腸内容物中のメタボローム解析を行なった。その結果、アルギン酸の投

与により有意に変化した代謝物が多数見出された。その中から、腸炎治療効果に寄与する可能性のある代謝物を絞り込むために、アルギン酸投与で有意に増加した代謝物と、体重および大腸の長さとの相関解析を行った。その結果、ヒドロキシプロリン、3-メチルヒスチジン、乳酸、ジメチルアルギニン（ADMA : asymmetric dimethylarginine）、ドデカン二酸、S-アデノシルメチオニン（SAM : S-adenosylmethionine）、4-ヒドロキシ安息香酸、タウリンがアルギン酸の腸炎治療効果に寄与する候補代謝物として考えられた。

### 3-7 *B. acidifaciens*、*L. murinus* はタウリンの産生に関与する

次に、3-6 で絞り込んだ代謝物が腸内細菌由来であることを検証するために、無菌マウスに *B. acidifaciens*、*L. murinus* をそれぞれ定着させ、盲腸内容物中のメタボローム解析を行なった。その結果、*B. acidifaciens* 単菌定着マウスでは無菌マウスと比較して S-アデノシルメチオニンとタウリンが有意に増加した。一方、*L. murinus* 単菌定着マウスでは無菌マウスと比較して乳酸とタウリンが増加した。両菌で共通の代謝物はタウリンであったことから、アルギン酸による腸炎治療効果の発揮には、*B. acidifaciens*、*L. murinus* 由来のタウリンが重要な役割を担う代謝物である可能性が考えられた。

### 3-8 タウリンの投与は DSS 腸炎からの回復を促進する

次に、タウリンの DSS 腸炎に対する治療効果を検証するために、腸炎誘導後タウリンを飲水投与した。その結果、コントロール群と比較してタウリンの投与により体重低下後の回復が促進し、大腸が有意に長かった。また、炎症マーカーである糞便中リポカリン-2 の濃度はタウリン投与群で低かった。以上の結果より、タウリンは DSS 腸炎に対し治療効果を持つことが確認された。

### 3-9 タウリントランスポーター (*Slc6a6*) のノックアウトマウスではアルギン酸の腸炎治療効果が消失する

タウリンはタウリントランスポーター (TauT / SLC6A6) を介して腸管上皮細胞内に取り込まれることが知られている<sup>53</sup>。そこで、アルギン酸の腸炎治療効果がタウリン依存的かを検証するために、*Slc6a6* のノックアウトマウスに DSS 腸炎を誘発後、アルギン酸を投与する実験を行なった。その結果、コントロール群とアルギン酸投与群の間で、体重の変動、大腸の肥厚、糞便中 LCN2 濃度、腸管透過性に差はみられなかった。これらのことから、アルギン酸の腸炎治療効果には腸管内におけるタウリンの増加が関与する可能性が示唆された。

### 3-10 アルギン酸およびタウリンの投与により腸管組織における遺伝子 Y の発現が上昇する

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検証するために、大腸組織全体及び大腸上皮細胞の遺伝子発現を網羅的に解析する実験を行なった。DSS 腸炎誘発後、コントロール群と比較し、アルギン酸およびタウリンの投与群で共通して発現上昇した遺伝子が腸炎からの回復に寄与している可能性を考えた。そこで、大腸組織の炎症が最も重篤である DSS 投与 10 日後において、コントロール群、アルギン酸投与群、タウリン投与群の大腸組織を採取し RNA シークエンシングを行った。その結果、大腸組織全体及び大腸上皮細胞で、どちらも遺伝子 Y の発現が上昇していた。DSS 腸炎誘導下、アルギン酸およびタウリンによる大腸上皮細胞における遺伝子 Y の発現上昇は、qPCR 法により改めて確認した。

### 3-11 タウリンはマウス大腸由来細胞株において遺伝子 Y の発現を直接誘導する

次に、遺伝子 Y の発現に影響を与える因子や発現部位を検証する実験を行った。まず、遺伝子 Y の発現が DSS 腸炎の誘導により低下するか、DSS 投与群と非投与群の上皮細胞を単離し、qPCR 法により比較した。その結果、遺伝子 Y の発現は DSS 投与により顕著に低下した。また、遺伝子 Y は腸管の上皮細胞に発現することが報告されていることから、胃、小腸上部、小腸下部、大腸のそれぞれの上皮細胞を単離し遺伝子 Y の発現を比較した。その結果、大腸において最も高発現することが確認された。



さらに、無菌マウスと比較してコンベンショナル化したマウス（無菌マウスに腸内細菌を定着させたマウス）の大腸上皮細胞における遺伝子 Y の発現に上昇傾向がみられたことから、遺伝子 Y の発現は腸内細菌によって誘導される可能性が示唆された。最後に、アルギン酸投与によりマウス腸管内で増加するタウリンが遺伝子 Y の発現を直接誘導するかを検証するために、マウス大腸癌細胞株である CMT93 細胞にタウリンを添加し、12 時間後の遺伝子 Y の発現を比較した。その結果、タウリンの添加によって濃度依存的な遺伝子 Y の発現上昇が観察された。以上の結果より、タウリンは直接腸管上皮細胞に作用し、遺伝子 Y の発現を上昇させることが示唆された。

#### 4. 考察

本研究では、アルギン酸を投与することで腸管内におけるタウリン産生菌が増加し、DSS 腸炎からの回復を早めることを見出した。アルギン酸は、コンブ、ワカメなどの褐藻類に含まれる水溶性食物繊維であり、 $\beta$ -D-マンヌロン酸と  $\alpha$ -L-グルロン酸が直鎖重合した構造を持つ<sup>54</sup>。アルギン酸をラットに投与すると腸内細菌叢が変化し、*Bacteroides capillosus* が増加することや<sup>51</sup>、*B. ovatus*、*B. xylanisolvens*、*B. thetaiotaomicron* はアルギン酸を資化することが報告されている<sup>55</sup>。本研究では DSS により大腸炎を誘導したマウスにアルギン酸を治療的に投与することで、同じ *Bacteroides* 属菌である *B. acidifaciens* が増加すること、また *B. acidifaciens* をアルギン酸の存在下で培養すると増殖が促進することを示した。*Bacteroides* 属菌は単糖が到達しにくい大腸に主に存在することから、複雑な糖鎖を資化する能力を獲得したと考えられる<sup>56</sup>。一方、アルギン酸の投与で増加した *L. murinus* は、アルギン酸の添加によっても増殖の促進がみられなかったが、*B. acidifaciens* がアルギン酸を資化した培養上清を用いた場合、間接的に増殖促進された。ヒトの腸内細菌に含まれる *Bacteroides* 属菌はエンド型とエキソ型のアルギン酸リアーゼを有することが報告されており<sup>57</sup>、*B. acidifaciens* がアルギン酸をより単純な糖鎖構造に変化させたことで、*L. murinus* が栄養源として利用しやすくなった可能性がある。また、*B. acidifaciens* の代謝物の中に *L. murinus* の増殖を促進させる因子がある可能性も考えられ、*B. acidifaciens* と *L. murinus* の相互作用の詳細を解明することは今後の課題である。

これら二種の菌は、アルギン酸の投与により盲腸内で増加したタウリンの産生に寄与することが、無菌マウスを用いた実験によりわかった。タウリンは、マウスの腸管内に分泌された主要な抱合型一次胆汁酸であるタウロコール酸やタウロ- $\beta$ -ミューロコール酸が腸内細菌の作用により脱抱合されることで増加し得る。Bile acid hydrolase (BSH) は腸内細菌が持つ胆汁酸脱抱合酵素であり、多くの腸内細菌種が BSH を持つことが知られる<sup>58</sup>。特に *Bacteroides* 属菌と *Lactobacillus* 属菌の一部は BSH を持つことが報告されている<sup>59-61</sup>。本研究においても *B. acidifaciens* と *L. murinus* が BSH 様配列を持つことをゲノムシーケンス解析により確認しており、アルギン酸投与による腸管内タウリン増加にこれらの菌が貢献していると考えられる。

アルギン酸、タウリンの投与は腸管における遺伝子 Y の発現を上昇させ、その発現は消化管の中でも特に大腸において高かった。今後は、遺伝子 Y ノックアウトマウスを用い、腸炎抑制における本遺伝子の役割を解析することが必要である。また、タウリンは、インフラマソームを活性化することにより抗菌ペプチドの産生を誘導し、DSS 誘導性大腸炎に対し防御的（予防的）に働くことが報告されている<sup>62</sup>。本研究において、アルギン酸の腸炎治療効果はタウリン依存的であったことから、アルギン酸-タウリンが遺伝子 Y を介してインフラマソームを活性化している可能性についても検証していく。

近年、潰瘍性大腸炎治療の一つとして、健常人の糞便を患者に移植する糞便微生物移植療法が用いられ、その有効性を調査する臨床研究が行われている。糞便移植後に効果が認められた患者の腸管内では、効果がなかった患者に比べ *Bacteroidetes* 門に属する細菌の割合が有意に高かった<sup>42</sup>。この結果は、*Bacteroidetes* 門に属する細菌が糞便移植療法の治療効果に寄与する可能性を示唆している。実際に *Bacteroidetes* 門である *B. ovatus* や *B. thetaiotaomicron* の投与はマウス DSS 大腸炎モデルの症状を軽減することが報告されている<sup>63,64</sup>。これら両細菌種は前述したように、アルギン酸の資化能を有する。そのため、以上の報告はアルギン酸の IBD 治療への応用の可能性を支持するものであり、アルギン酸の投与と便微生物移植法とを組み合わせることにより、*Bacteroides* 属菌の定着促進、さらに腸管内におけるタウリンの増加を介して相乗的な治療効果を期待できる可能性がある。

IBD の罹患率は世界的に増加しているものの、西欧人よりもアジア人において有病率が少ないことが知られる<sup>65</sup>。アジア人は古来より日常的に海藻を摂取する習慣があるが、海苔の消化酵素遺伝子群は海藻に生息する細菌から日本人の腸内細菌へと水平伝播したと言われ、北米人の腸内細菌はこれらを持たない<sup>66</sup>。アルギン酸リアーゼにおいても同様に、海洋細菌からヒト腸内細菌に移入したと考えられている<sup>57</sup>。こうして形成されたアジア人固有の腸内細菌叢が IBD の発症率を低下させている可能性が考えられ、海藻の成分のうち 30-60%を構成すると言われるアルギン酸がその一端を担っている可能性がある。

アルギン酸のように、特定の細菌の増殖および活性を変化させることより、宿主に有利な影響を与える食物繊維はプレバイオティクスと呼ばれ、それぞれが腸内細菌叢に異なる変化をもたらし、固有の機能を持つと考えられる<sup>67</sup>。本研究では、アルギン酸投与による腸炎治療効果のメカニズムを示した。今後、こうしたプレバイオティクス個々の詳細な機能を明らかにすることで、オーダーメイド医療の一環として、腸内細菌の人為的操作により疾患を予防・治療することが可能になると考えられる。

### 第3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

##### 略語

本論文では以下の略語を使用する。

BPM: biotin-(PEAC)5-maleimide

CSE: cystathionine  $\gamma$ -lyase

GF: germ-free

GSSH: glutathione-S-S-glutathione

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HPE-IAM:  $\beta$ -(4-hydroxyphenyl) ethyl iodoacetamide

HRP: horseradish peroxidase

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1

LC-ESI-MS/MS: liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry

MeHg: methylmercury

SDS: sodium dodecyl sulfate

SPF: specific pathogen free

1,2-NQ: 1,2-naphthoquinone

## 1. 序論

環境中親電子物質であるメチル水銀 (MeHg: methylmercury) は、分子中に電子密度の低い (親電子性) 部位を持つため、電子密度の高い (求核性) タンパク質のシステイン残基 (脱プロトン化したチオール基) と容易に共有結合し、付加体を形成する (親電子修飾) <sup>68</sup>。この MeHg による親電子修飾はタンパク質の三次元構造を変化させ、タンパク質機能を修飾する <sup>69,70</sup>。ヒトゲノム中には約 214,000 個のシステイン残基があると推定されており、その内 80-90%は SH 基や S-S 結合、または亜鉛等と配位した状態で存在し、残りの 10-20%は脱プロトン化した状態 (反応性システイン残基) として存在すると考えられている <sup>71</sup>。実際、生体内に取り込まれた MeHg は、反応性システイン残基を介して様々な細胞内のタンパク質や酵素、またはトランスポーターなどに結合し、その活性や機能を変化させることが報告されている <sup>72-77,69</sup>。そのため、MeHg 曝露の増加によりタンパク質の親電子修飾が過剰に行われると、被修飾タンパク質の担う細胞機能が破綻し、これが MeHg の毒性発現の主因と考えられている。

ヒトの腸管には、約 40 兆個 100 種類の腸内細菌が存在し、様々な二次代謝物を産生することが知られる <sup>78</sup>。これらの代謝物は腸管から吸収され全身を巡ることで、宿主の様々な全身性疾患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が続々と報告されてきている <sup>79,80</sup>。特に、乳酸菌として知られる *Lactobacillus* 属菌は小腸から大腸まで幅広く存在し、宿主の生理機能に広範な影響を及ぼすことが知られる <sup>81</sup>。腸内細菌叢の構成は、食生活や薬剤の使用だけでなく、環境中化学物質への曝露によっても変化し得る <sup>78</sup>。後者のうち、MeHg は食物連鎖によりマグロなどの大型魚に濃縮することが知られ、我々は食事を介して常に MeHg に曝露されている <sup>82</sup>。一部の研究では、MeHg への曝露が腸内細菌叢の構成に影響を与えることが報告されているが、そのメカニズムは解明されていない <sup>83,84</sup>。そこで本研究では、MeHg による腸内細菌タンパク質への修飾を検討し、MeHg 曝露による腸内細菌への影響を *Lactobacillus* 属菌の増殖を指標に評価した。

一方、MeHg に対する生体防御機構として求核低分子であるグルタチオン (GSH) による抱合反応が知られている <sup>85</sup>。また近年、システイン (CysSH) や GSH および硫化水素 (H<sub>2</sub>S) にイオウ原子が付加したポリ硫黄構造 (CysSSH, GSSH や HSSH) を有する生

体内求核低分子（活性イオウ分子）の存在が明らかにされた。活性イオウ分子はイオウ原子付加の  $\alpha$  効果により、その求核性は母化合物である CysSH、GSH および  $H_2S$  と比べて非常に高い<sup>86,87</sup>。さらに、活性イオウ分子内のイオウ原子は可動性を有しており、転移反応を介して親電子物質とイオウ付加体を形成する<sup>88</sup>。これまでに、MeHg が  $H_2S$  や活性イオウ分子と反応し、イオウ付加体である Bismethylmercury sulfide (MeHg)<sub>2</sub>S が産生されることが報告されている<sup>89</sup>。さらに、(MeHg)<sub>2</sub>S は MeHg と比べほとんど親電子性を示さず、細胞毒性も低いため MeHg の解毒代謝物のひとつであると考えられている<sup>89</sup>。実際、活性イオウ分子の産生酵素であるシスタチオニン  $\gamma$ -リアーゼ (CSE: cystathionine  $\gamma$ -lyase) の欠乏マウスでは、MeHg 曝露時に生体内での(MeHg)<sub>2</sub>S 産生がほとんど見られず、野生型と比べて MeHg 曝露に対する脆弱性を示すことが報告されている<sup>90,91</sup>。これらの事から生体内での活性イオウ分子の維持が MeHg に対する生体防御に重要であると考えられている。一方、腸管は豊富な硫黄が存在する器官として知られている。腸管に常在する硫酸還元菌は  $H_2S$  を産生することから<sup>92</sup>、腸内細菌が産生する  $H_2S$  および活性イオウ分子によって、MeHg が捕獲・不活性化されている可能性が考えられた。そこで本研究では、腸内細菌による活性イオウ分子の産生と MeHg 曝露に対する保護的役割を検証した。

## 2. 実験材料と方法

### 2-1 試薬

MeHg はナカライテスクから購入した。HPE-IAM は Molecular Biosciences から、硫化ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{S}$ )、二硫化ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{S}_2$ )、BPM は同仁化学研究所から購入した。HRP 標識抗 biotin およびウサギ IgG 二次抗体は、Cell Signaling Technology から購入した。PD mini Trap™ G-25 は GE Healthcare から購入し、Amicon Ultra 3K 遠心フィルターは Millipore から入手した。特に記載のない物は特級試薬を用いた。試薬等の調整に用いた水は特に記載のない限り超純水装置 Elix Essential/RiOs Essential (Merck Millipore 社) から得た DDW を用いた。

### 2-2 動物実験

SPF (specific pathogen free) C57BL/6 マウス、雄性 MCH マウス、雄性無菌 MCH マウスは、日本クレア株式会社から購入した。明暗周期 12/12 時間 (照明点灯時間 7:00~19:00 に点灯)のもと、温度  $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55\% \pm 5\%$  の環境下で飼育し、雄性無菌 MCH マウスはビニールアイソレーター内で飼育した。C57BL/6 マウスには、抗生剤 (1 mg/mL アンピシリン、0.5 mg/mL バンコマイシン) を 14 日間飲水投与後、MeHg (5 mg/kg) を経口投与した。全ての実験は、日本学会議発行の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に準じて実施した。

### 2-3 BPM 標識アッセイおよびウェスタンブロッティング

タンパク質の反応性システイン残基の量を調べるために、BPM 標識アッセイを行った。BPM 結合量の減少は、親電子修飾されたシステイン残基の量を反映する。SPF または無菌マウスの糞便を 100 mM の HEPES 緩衝液 (pH 7.5) にてホモジナイズし、 $4^\circ\text{C}$ 、 $9,000 \times g$  の条件で遠心分離した。上清を PD mini Trap™ G-25 カラムを用いてろ過し、高分子量画分を得た。続いて MeHg または 1,2-NQ と  $37^\circ\text{C}$  で 5 分間インキュベートした後、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間 BPM とインキュベートした。SDS-PAGE ローディングバッファー [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8) , 8%グリセロール (v/v) , 2%SDS (w/v) , 0.005%ブロモフ



エノールブルー (w/v) ] と混合し、95°Cで 5 分間インキュベートした。インキュベート後のサンプルを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ポリフッ化ビニリデン膜 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) 上にトランスファーした (2 mA/cm<sup>2</sup>、1 時間)。転写後、PVDF 膜を 5%スキムミルクによって 1 時間ブロッッキングした。ブロッッキング後、1 次抗体溶液を 4°Cで一晩反応させた。反応後、1 次抗体に対応する HRP 標識 2 次抗体を室温で 2 時間反応させた後、化学発光検出試薬 (nacalai tesque, Japan) を用いて検出を行った。現像はルミノ・イメージアナライザ LAS-4000 (GE ヘルスケア) により行った。

#### 2-4 *Lactobacillus* 属細菌の増殖能の測定

研究に用いた *Lactobacillus* 属菌は、全て理研微生物材料開発室 (JCM) より購入した。*L. reuteri*、*L. gasseri*、*L. casei*、および *L. acidophilus* は、*Lactobacilli* MRS 寒天プレートおよび *Lactobacilli* MRS 液体培地 (BD, USA) を用いて培養した。MeHg および Na<sub>2</sub>S、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> を添加した各条件の培地に、菌の 24 時間培養液を 1/100 添加し、96 well プレートに 200 μL ずつ添加した。濁度の測定には SpectraMax iD3 (MOLECULAR DEVICES, USA) を用い、好気条件下、37°Cで 24 時間 1 時間ごとに 600 nm の吸光度を測定した。

#### 2-5 LC-ESI-MS/MS による H<sub>2</sub>S および H<sub>2</sub>S<sub>2</sub> の測定

超音波発生機 (Tomy, Japan) を用いて、SPF MCH または無菌 MCH マウスの糞便 100 mg を 1 mL メタノールでホモジナイズし、4°C、9,000 × g で 10 分間遠心分離した。得られた上清に HPE-IAM (5 mM) を添加し、37°Cで 30 分間静置した後、0.1%ギ酸を等量添加した。HPE-IAM 付加体を含むアリコート、既知量の同位体標識内部標準を含む 0.1%ギ酸で 2 倍希釈し、LC-ESI-MS/MS を用いて分析した。その際、Advance™ UHPLC システム (Bruker Daltonics, Billerica, USA) および EVOQ Qube™トリプル四重極質量分析計 (Bruker Daltonics, Billerica, USA) を使用した。

#### 2-6 水銀濃度の測定

マウス臓器中の水銀濃度は、原子吸光水銀検出器（MD-A または MA-2/BC-1; Nippon Instruments）を用いて測定した。

## 2-7 統計処理

統計学的有意性は、分散分析（ANOVA）に基づいて評価し、ポストホック分析での多重比較の補正を行った。すべての統計解析は、GraphPad Prism（Graphpad Software, San Diego, USA）を用いて行った  $p$  値によって\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*\*:  $p < 0.001$  と表記した。また、エラーバーには標準誤差を使用した。

### 3. 結果

#### 3-1 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 (GF: germ-free) マウスの糞便からタンパク質を抽出し、それらタンパク質中の反応性システイン残基を BPM アッセイにて検出した。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、GF マウスの糞便中においてはほとんど検出されなかった。このことから、検出された反応性システイン残基の大部分が腸内細菌由来であることが示唆された。さらに、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 と反応することで減少した。このことは腸内細菌由来のタンパク質中の反応性システイン残基が MeHg によって修飾されていることを示唆している。また、腸内細菌由来タンパク質の反応性システイン残基は、MeHg とは別の親電性物質である 1,2-NQ<sup>88</sup> との反応によっても減少した。さらに、1,2-NQ 抗体を用いたウェ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、MeHg は腸内細菌タンパク質の修飾を介して腸内細菌叢に影響を及ぼす可能性が示された。

#### 3-2 MeHg 曝露による *Lactobacillus* 属菌の増殖への影響

続いて、異なる濃度の MeHg に曝露した際の *Lactobacillus reuteri*, *L. gasseri*, *L. casei*, *L. acidophilus* の増殖を 24 時間 1 時間おきに測定したところ、MeHg は濃度依存的に *L. reuteri*, *L. casei*, *L. acidophilus* の増殖を抑制した。一方、MeHg は *L. gasseri* の増殖にはほとんど影響しなかったことから、MeHg に対する感受性は種レベルで異なる可能性が示唆された。

MeHg は H<sub>2</sub>S や活性イオウ分子と反応して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<sup>89,90</sup>。我々は Na<sub>2</sub>S や Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> をそれぞれ H<sub>2</sub>S および活性イオウ分子のモデル化合物として用い、活性イオウ分子が MeHg 曝露による *Lactobacillus* 属菌の増殖抑制に対して保護効果を示すかどうかを検討した<sup>93-95</sup>。その結果、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> の添加により MeHg による *L. reuteri* の増殖阻害が回復した。一方、Na<sub>2</sub>S はほとんど影響を及ぼさな

かった。以上より、活性イオウ分子は MeHg による *Lactobacillus* 属菌の増殖阻害作用を打ち消すことが確認された。

### 3-3 腸内細菌による活性イオウ分子産生と MeHg 曝露による水銀蓄積の抑制

続いて、腸内細菌が活性イオウ分子種の産生に寄与しているかを検証するために、SPF マウスおよび GF マウス糞便中の  $H_2S$  と  $H_2S_2$  の量を測定した。その結果、GF マウス糞便中では SPF マウス糞便中と比べて  $H_2S$  と  $H_2S_2$  量が有意に減少していた。最後に、腸内細菌の MeHg 曝露に対する保護的役割を検証した。生体への水銀の蓄積量と MeHg による健康リスクに関しては、その相関性が認められていることから<sup>96</sup>、各臓器中の水銀量を MeHg 曝露による生体影響指標とした。マウスを抗生剤処理することで腸内細菌叢を攪乱し、MeHg 曝露後の小脳、肺、肝臓、腎臓への水銀の蓄積量を調べた。その結果、抗生剤処理マウスでは無処理群と比較して、小脳、肺、肝臓における水銀蓄積が増加した。以上より、腸内細菌は MeHg 曝露による生体への水銀蓄積を抑制することで、MeHg による健康リスクに対して保護的な役割を持つことが示された。

#### 4. 考察

本研究では、MeHg などの環境中親電子物質が反応性システイン残基を介して腸内細菌タンパク質を親電子修飾する事を明らかにした。これまで MeHg を含む環境中親電子物質による健康影響は宿主側（体内組織）に対する物が主であり、体外に共存する腸内細菌に対する影響はほとんどなされていない。本研究結果は、MeHg が宿主側だけでなく、体外に存在する腸内細菌叢にも影響を与えている可能性を示した。

実際、単菌培養実験によって、MeHg が主要な乳酸菌である *Lactobacillus* 属菌の増殖を直接的に阻害する事を明らかにした。先行研究において、*Lactobacillus* 属菌は、カドミウム、鉛、ヒ素、水銀などの重金属を収着することが報告されていたが<sup>97</sup>、細菌の増殖に MeHg が直接及ぼす影響を評価した報告はない。*Lactobacillus* 属菌は上部消化管から大腸、膣など多くの組織に常在し、宿主生理機能に様々な影響を与えることが知られる。特に MeHg により顕著に増殖が阻害された *L. reuteri* は、腸管常在菌でありプロバイオティクスとしても用いられ、腸管バリア機能の増強や、過剰な免疫応答を抑制する制御性 T 細胞の誘導に関与することが報告されている<sup>98</sup>。本研究では *Lactobacillus* 属菌の増殖に与える影響のみを評価したが、腸管に 100 種類以上の細菌が常在しており、それらの増殖や機能に対しても MeHg が影響を与える可能性は高い。そのため、MeHg 曝露によって腸内細菌叢の構成異常が引き起こされ、二次的な健康被害をもたらす可能性が考えられる。

一方、活性イオウ分子である  $\text{Na}_2\text{S}_2$  の添加により MeHg による *L. reuteri* の増殖阻害作用が回復したが、 $\text{Na}_2\text{S}$  の添加では回復はみられなかった。この違いは、pKa 値に由来すると考えられ、 $\text{Na}_2\text{S}$  の pKa 値は 7 程度であるが、 $\text{Na}_2\text{S}_2$  の pKa 値は 5 程度である<sup>99</sup>。*Lactobacillus* 属菌は乳酸および酢酸を産生することが知られており、増殖に伴い培地の pH を約 4-5 に低下させる。本研究では、*Lactobacillus* 属菌培養液の pH は、4 付近であったため、*Lactobacillus* 属菌の増殖によって pH が低下したため、 $\text{Na}_2\text{S}$  が脱プロトン化できず、MeHg と反応しなかった可能性が考えられた。また、同じ *Lactobacillus* 属菌の中でも、種の違いにより MeHg に対する感受性の違いがみられた。*Lactobacillus* 属菌は  $\text{H}_2\text{S}$  によって増殖が阻害されることが報告されており、MeHg に対する感受性の違いは、複雑なメカニズムによるものである可能性がある<sup>100</sup>。

さらに我々は、SPF マウスでは無菌マウスと比較して糞便中に含まれる  $\text{H}_2\text{S}$ 、 $\text{H}_2\text{S}_2$  濃度が顕著に高く、抗生剤により腸内細菌叢を攪乱したマウスでは MeHg の組織への蓄積が促進されることを示した。過去の研究において、コンベンショナルマウスと比較して GF マウスでは血漿中の  $\text{H}_2\text{S}$  量が有意に低いことが示されており<sup>101</sup>、腸管内で腸内細菌により産生された  $\text{H}_2\text{S}$  は血中移行する可能性が高いと考えられた。 $\text{H}_2\text{S}$  を産生する主要な腸内細菌として、*Desulfovibrio* 属菌をはじめとする、Deltaproteobacteria 目に属する硫酸還元細菌が知られる<sup>100</sup>。これらの細菌は嫌気性細菌であり、好気性細菌が末端電子受容体として酸素を利用する機構と同様に硫酸塩を  $\text{H}_2\text{S}$  に還元すると考えられている。したがって、主に酸素濃度の低い大腸に常在する細菌によって作られた  $\text{H}_2\text{S}$  が糞便中  $\text{H}_2\text{S}$  濃度に寄与していると考えられる。また、哺乳類の細胞においてもシステインから  $\text{H}_2\text{S}$  が産生されることが知られており<sup>102</sup>、無菌マウスの糞便中において少量検出された  $\text{H}_2\text{S}$  は、宿主上皮細胞由来である可能性が高い。先行研究において、 $\text{H}_2\text{S}$  や活性イオウ分子の産生酵素である CSE のノックアウトマウスでは生体内における活性イオウ分子の減少に伴い MeHg の不活性化が減少し、臓器への水銀蓄積が促進されることが報告されている<sup>103</sup>。このことから、腸内細菌由来の  $\text{H}_2\text{S}$  や  $\text{H}_2\text{S}_2$  は腸管または全身循環において MeHg を捕捉・不活性化することで、組織への MeHg の移行を減少させると考えられた。硫酸還元菌は炎症性腸疾患の患者で増加しており、 $\text{H}_2\text{S}$  が病態に関与することが知られるが<sup>104</sup>、反対に抗炎症作用や組織修復作用があることが報告されている<sup>105,106</sup>。このように、腸内細菌やその代謝物は宿主の恒常性維持に重要である一方で、腸内細菌叢のバランスが破綻するとしばしば宿主に不利益をもたらす場合がある。

本研究により、意図せず体内に侵入した環境中化学物質が腸内細菌の増殖を阻害し腸内細菌叢の構成異常をもたらす可能性があること、また環境中親電子物質の毒性軽減に腸内細菌代謝物が関与する可能性が示された。環境中には MeHg だけでなく、大気汚染物質であるナフトキノロン類、米に含まれるカドミウムなどの親電子物質が存在し、MeHg と同様に腸内細菌のタンパク質に結合することで腸内細菌叢の構成異常をもたらす可能性がある。今後、これらの詳細な機構を解明することは、環境中親電子物質の毒性を軽減するための、腸内細菌をターゲットとした方法の開発に繋がる可能性がある。

## 参考文献

1. Kopelman, P. G. Obesity as a medical problem. *Nature* **404**, 635–643 (2000).
2. Pi-Sunyer, X. The Medical Risks of Obesity. *Postgrad. Med. J.* **121**, 21–33 (2010).
3. Tremaroli, V. & Bäckhed, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* **489**, 242–249 (2012).
4. Bäckhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F. & Gordon, J. I. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 979–984 (2007).
5. Rabot, S. *et al.* Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J.* **24**, 4948–4959 (2010).
6. Ridaura, V. K. *et al.* Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. **341**, 1079–1090 (2013).
7. Everard, A. *et al.* Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 9066–9071 (2013).
8. Yang, J. Y. *et al.* Gut commensal *Bacteroides acidifaciens* prevents obesity and improves insulin sensitivity in mice. *Mucosal Immunol.* **10**, 104–116 (2017).
9. Kimura, I. *et al.* The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat. Commun.* **4**, 1–12 (2013).
10. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65 (2010).
11. Sonnenburg, E. D. & Sonnenburg, J. L. Starving our microbial self: The deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell Metab.* **20**, 779–786 (2014).
12. Sonnenburg, E. D. *et al.* Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature* **529**, 212–215 (2016).
13. Dehghan-Kooshkghazi, M. & Mathers, J. C. Starch digestion, large-bowel fermentation and intestinal mucosal cell proliferation in rats treated with the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor acarbose. *Br. J. Nutr.* **91**, 357–365 (2004).

14. Xu, G. dong *et al.* Comparisons of effects on intestinal short-chain fatty acid concentration after exposure of two glycosidase inhibitors in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **41**, 1024–1033 (2018).
15. Smith, B. J. *et al.* Changes in the gut microbiome and fermentation products concurrent with enhanced longevity in acarbose-treated mice. *BMC Microbiol.* **19**, 1–16 (2019).
16. Baxter, N. T., Lesniak, N. A., Sinani, H., Schloss, P. D. & Koropatkin, N. M. The Glucoamylase Inhibitor Acarbose Has a Diet-Dependent and Reversible Effect on the Murine Gut Microbiome. *mSphere* **4**, 1–12 (2019).
17. Zhang, X. *et al.* Effects of Acarbose on the Gut Microbiota of Prediabetic Patients: A Randomized, Double-blind, Controlled Crossover Trial. *Diabetes Ther.* **8**, 293–307 (2017).
18. Su, B. *et al.* Acarbose treatment affects the serum levels of inflammatory cytokines and the gut content of bifidobacteria in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes* **7**, 729–739 (2015).
19. Li, Y. *et al.* Acarbose monotherapy and weight loss in Eastern and Western populations with hyperglycaemia: An ethnicity-specific meta-analysis. *Int. J. Clin. Pract.* **68**, 1318–1332 (2014).
20. Caporaso, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nat. Methods* **7**, 335–336 (2010).
21. Aronesty, E. Comparison of Sequencing Utility Programs. *Open Bioinforma. J.* **7**, 1–8 (2013).
22. Compeau, P. E. C. *et al.* Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads kenkyuhi hojokin gan rinsho kenkyu jigyo. *EMBnet.journal* **17**, 10–12 (2013).
23. Bligh, E.G. and Dyer, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, (1959).
24. Toshima, G., Iwama, Y. & Kimura, F. LipoSEARCH : Analytical GP-HPLC method for lipoprotein profiling and its applications. *J. Biol. Macromol.* **13**, 21–32 (2013).



25. Holt, P. R. *et al.* Effects of acarbose on fecal nutrients, colonic pH, and short-chain fatty acids and rectal proliferative indices. *Metabolism*. **45**, 1179–1187 (1996).
26. Mills, E. L. *et al.* Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis. *Nature* **560**, 102–106 (2018).
27. Yoshino, J., Mills, K. F., Yoon, M. J. & Imai, S. I. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD<sup>+</sup> intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab.* **14**, 528–536 (2011).
28. Shintaro Yamaguchi, J. Y. Adipose Tissue NAD<sup>+</sup> Biology in Obesity and Insulin Resistance: From Mechanism to Therapy. *Bioessays* **39**, (2017).
29. Roh, E. *et al.* Effects of Chronic NAD Supplementation on Energy Metabolism and Diurnal Rhythm in Obese Mice. *Obesity* **26**, 1448–1456 (2018).
30. Stancu, C. & Sima, A. Statins: Mechanism of action and effects. *J. Cell. Mol. Med.* **5**, 378–387 (2001).
31. Kazeen Abdullah, A. R. Statins: Practical Considerations – A Review. *Eur. Soc. Cardiol.* **9**, 71–75 (2014).
32. Swerdlow, D. I. *et al.* HMG-coenzyme A reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: Evidence from genetic analysis and randomised trials. *Lancet* **385**, 351–361 (2015).
33. Adhyaru, B. B. & Jacobson, T. A. Safety and efficacy of statin therapy. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 757–769 (2018).
34. Aguirre, L. *et al.* Several statins increase body and liver fat accumulation in a model of metabolic syndrome. *J. Physiol. Pharmacol.* **64**, 281–288 (2013).
35. Alatab, S. *et al.* The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 17–30 (2020).
36. Seyedian, S. S., Nokhostin, F. & Malamir, M. D. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *J. Med. Life* **12**, 113–122 (2019).
37. Tsui, J. J. & Huynh, H. Q. Is top-down therapy a more effective alternative to conventional step-up therapy for crohn’s disease? *Ann. Gastroenterol.* **31**, 413–424 (2018).

38. Franzosa, E. A. *et al.* Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. *Nat. Microbiol.* **4**, 293–305 (2019).
39. Matsuoka, K. & Kanai, T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin. Immunopathol.* **37**, 47–55 (2015).
40. Ohkusa, T. & Koido, S. Intestinal microbiota and ulcerative colitis. *J. Infect. Chemother.* **21**, 761–768 (2015).
41. Weingarden, A. R. & Vaughn, B. P. Intestinal microbiota, fecal microbiota transplantation, and inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* **8**, 238–252 (2017).
42. Ishikawa, D. *et al.* Changes in intestinal microbiota following combination therapy with fecal microbial transplantation and antibiotics for ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **23**, 116–125 (2017).
43. Cantu-Jungles, T. M. & Hamaker, B. R. New view on dietary fiber selection for predictable shifts in gut microbiota. *MBio* **11**, 1 (2020).
44. Chatellard, L., Trably, E. & Carrère, H. The type of carbohydrates specifically selects microbial community structures and fermentation patterns. *Bioresour. Technol.* **221**, 541–549 (2016).
45. Yamamoto, A., Itoh, T., Nasu, R. & Nishida, R. Effect of Sodium Alginate on Dextran Sulfate Sodium- and 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Experimental Colitis in Mice. *Pharmacology* **92**, 108–116 (2013).
46. Razavi, A., Khodadadi, A., Eslami, M. B., Eshraghi, S. & Mirshafiey, A. Therapeutic effect of sodium alginate in experimental chronic ulcerative colitis. *Iran. J. Allergy, Asthma Immunol.* **7**, 13–18 (2008).
47. Onitake, T. *et al.* Pulverized konjac glucomannan ameliorates oxazolone-induced colitis in mice. *Eur. J. Nutr.* **54**, 959–969 (2015).
48. Videla, S. *et al.* Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. *Am. J. Gastroenterol.* **96**, 1486–1493 (2001).
49. Nagy-Szakal, D. *et al.* Cellulose Supplementation Early in Life Ameliorates Colitis in Adult Mice. *PLoS One* **8**, 1–9 (2013).

50. Tang, C. *et al.* Inhibition of dectin-1 signaling ameliorates colitis by inducing lactobacillus-mediated regulatory T cell expansion in the intestine. *Cell Host Microbe* **18**, 183–197 (2015).
51. An, C., Kuda, T., Yazaki, T., Takahashi, H. & Kimura, B. Flx pyrosequencing analysis of the effects of the brown-algal fermentable polysaccharides alginate and laminaran on rat cecal microbiotas. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 860–866 (2013).
52. Schubert, A. M., Sinani, H. & Schloss, P. D. Antibiotic-induced alterations of the murine gut microbiota and subsequent effects on colonization resistance against *Clostridium difficile*. *MBio* **6**, 1–10 (2015).
53. Baliou, S. *et al.* Significance of taurine transporter (TauT) in homeostasis and its layers of regulation (review). *Mol. Med. Rep.* **22**, 2163–2173 (2020).
54. Guo, X., Wang, Y., Qin, Y., Shen, P. & Peng, Q. Structures, properties and application of alginic acid: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **162**, 618–628 (2020).
55. Li, M. *et al.* In vitro fermentation of alginate and its derivatives by human gut microbiota. *Anaerobe* **39**, 19–25 (2016).
56. Martens, E. C. *et al.* Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. *PLoS Biol.* **9**, (2011).
57. Mathieu, S. *et al.* Ancient acquisition of ‘alginate utilization loci’ by human gut microbiota. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).
58. Gérard, P. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. *Pathogens* **3**, 14–24 (2013).
59. Yao, L. *et al.* A selective gut bacterial bile salt hydrolase alters host metabolism. *Elife* **7**, 1–32 (2018).
60. Yoon, S. *et al.* Bile salt hydrolase-mediated inhibitory effect of *Bacteroides ovatus* on growth of *Clostridium difficile*. *J. Microbiol.* **55**, 892–899 (2017).
61. Sarah O’Flaherty, Alexandra Briner Crawley, Casey M. Theriot, R. B. The Lactobacillus Bile Salt Hydrolase Repertoire Reveals Niche-Specific Adaptation. *mSphere* **3**, 1–13 (2018).

62. Levy, M. *et al.* Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell* **163**, 1428–1443 (2015).
63. Ihekweazu, F. D. *et al.* *Bacteroides ovatus* ATCC 8483 monotherapy is superior to traditional fecal transplant and multi-strain bacteriotherapy in a murine colitis model. *Gut Microbes* **10**, 504–520 (2019).
64. Delday, M., Mulder, I., Logan, E. T. & Grant, G. *Bacteroides thetaiotaomicron* ameliorates colon inflammation in preclinical models of Crohn’s disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **25**, 85–96 (2019).
65. Prideaux, L., Kamm, M. A., De Cruz, P. P., Chan, F. K. L. & Ng, S. C. Inflammatory bowel disease in Asia: A systematic review. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **27**, 1266–1280 (2012).
66. Hehemann, J. H. *et al.* Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature* **464**, 908–912 (2010).
67. Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R. & Rastall, R. A. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 605–616 (2019).
68. Rabenstein, D. L. & Saetre, R. Mercury-Based Electrochemical Detector for Liquid Chromatography for the Detection of Glutathione and Other Sulfur-Containing Compounds. *Anal. Chem.* **49**, 1036–1039 (1977).
69. Kanda, H., Shinkai, Y. & Kumagai, Y. S-mercuration of cellular proteins by methylmercury and its toxicological implications. *J. Toxicol. Sci.* **39**, 687–700 (2014).
70. Yang, L. *et al.* Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere* **245**, (2020).
71. Jones, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **295**, (2008).
72. Robitaille, S., Mailloux, R. J. & Chan, H. M. Methylmercury alters glutathione homeostasis by inhibiting glutaredoxin 1 and enhancing glutathione biosynthesis in cultured human astrocytoma cells. *Toxicol. Lett.* **256**, 1–10 (2016).
73. Franco, J. L. *et al.* Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 449–457 (2009).

74. Carvalho, C. M. L., Chew, E. H., Hashemy, S. I., Lu, J. & Holmgren, A. Inhibition of the human thioredoxin system: A molecular mechanism of mercury toxicity. *J. Biol. Chem.* **283**, 11913–11923 (2008).
75. Shinyashiki, M. *et al.* Selective inhibition of the mouse brain Mn-SOD by methylmercury. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2**, 359–366 (1996).
76. Shinyashiki, M. *et al.* Differential changes in rat brain nitric oxide synthase in vivo and in vitro by methylmercury. *Brain Res.* **798**, 147–155 (1998).
77. Toyama, T. *et al.* Cytoprotective role of Nrf2/Keap1 system in methylmercury toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **363**, 645–650 (2007).
78. Costea, P. I. *et al.* Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat. Microbiol.* **3**, 8–16 (2017).
79. Sekirov, I., Russell, S. L., Caetano M Antunes, L. & Finlay, B. B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* **90**, 859–904 (2010).
80. Fan, Y. & Pedersen, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* (2020) doi:10.1038/s41579-020-0433-9.
81. Heeney, D. D., Gareau, M. G. & Marco, M. L. Intestinal Lactobacillus in health and disease, a driver or just along for the ride? *Curr. Opin. Biotechnol.* **49**, 140–147 (2018).
82. Grandjean, P., Satoh, H., Murata, K. & Eto, K. Adverse effects of methylmercury: Environmental health research implications. *Environ. Health Perspect.* **118**, 1137–1145 (2010).
83. Bridges, K. N. *et al.* Alterations to the Intestinal Microbiome and Metabolome of *Pimephales promelas* and *Mus musculus* Following Exposure to Dietary Methylmercury. *Environ. Sci. Technol.* **52**, 8774–8784 (2018).
84. Lin, X. *et al.* Acute oral methylmercury exposure perturbs the gut microbiome and alters gut-brain axis related metabolites in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **190**, 110130 (2020).
85. Kumagai, Y., Kanda, H., Shinkai, Y. & Toyama, T. The role of the Keap1/Nrf2 pathway in the cellular response to methylmercury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, (2013).
86. Ono, K. *et al.* Redox chemistry and chemical biology of H<sub>2</sub>S, hydropersulfides, and derived species: Implications of their possible biological activity and utility. *Free Radic. Biol. Med.* **77**, 82–94 (2014).

87. Ida, T. *et al.* Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 7606–7611 (2014).
88. Kumagai, Y. & Abiko, Y. Environmental electrophiles: Protein adducts, modulation of redox signaling, and interaction with persulfides/polysulfides. *Chem. Res. Toxicol.* **30**, 203–219 (2017).
89. Yoshida, E. *et al.* Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide-producing enzyme in mammalian cells. *Chem. Res. Toxicol.* **24**, 1633–1635 (2011).
90. Abiko, Y. *et al.* Involvement of Reactive Persulfides in Biological Bismethylmercury Sulfide Formation. *Chem. Res. Toxicol.* **28**, 1301–1306 (2015).
91. Akiyama, M. *et al.* Environmental electrophile-mediated toxicity in mice lacking Nrf2, CSE, or both. *Environ. Health Perspect.* **127**, 1–11 (2019).
92. Rey, F. E. *et al.* Metabolic niche of a prominent sulfate-reducing human gut bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 13582–13587 (2013).
93. Yu, B. *et al.* Toward Direct Protein S-Persulfidation: A Prodrug Approach That Directly Delivers Hydrogen Persulfide. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 30–33 (2018).
94. Agné, A. M. *et al.* Hydrogen sulfide decreases  $\beta$ -adrenergic agonist-stimulated lung liquid clearance by inhibiting ENaC-mediated transepithelial sodium absorption. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **308**, R636–R649 (2015).
95. Bogdándi, V. *et al.* Speciation of reactive sulfur species and their reactions with alkylating agents: do we have any clue about what is present inside the cell? *Br. J. Pharmacol.* **176**, 646–670 (2019).
96. Choi, A. L. *et al.* Methylmercury exposure and adverse cardiovascular effects in Faroese Whaling men. *Environ. Health Perspect.* **117**, 367–372 (2009).
97. Kinoshita, H. *et al.* Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Res. Microbiol.* **164**, 701–709 (2013).
98. Mu, Q., Tavella, V. J. & Luo, X. M. Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Front. Microbiol.* **9**, 1–17 (2018).
99. Kawagoe, R., Takashima, I., Uchinomiya, S. & Ojida, A. Reversible ratiometric detection of highly reactive hydropersulfides using a FRET-based dual emission fluorescent probe. *Chem. Sci.* **8**, 1134–1140 (2017).

100. Dordević, D., Jančíková, S., Vítězová, M. & Kushkevych, I. Hydrogen sulfide toxicity in the gut environment: Meta-analysis of sulfate-reducing and lactic acid bacteria in inflammatory processes. *J. Adv. Res.* **27**, 55–69 (2020).
101. Shen, X. *et al.* Microbial regulation of host hydrogen sulfide bioavailability and metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **60**, 195–200 (2013).
102. Pouokam, E. & Althaus, M. Epithelial electrolyte transport physiology and the gasotransmitter hydrogen sulfide. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, (2016).
103. Akiyama, M. *et al.* Repression of mercury accumulation and adverse effects of methylmercury exposure is mediated by cystathionine  $\gamma$ -lyase to produce reactive sulfur species in mouse brain. *Toxicol. Lett.* **330**, 128–133 (2020).
104. Guo, F. F., Yu, T. C., Hong, J. & Fang, J. Y. Emerging roles of hydrogen sulfide in inflammatory and neoplastic colonic diseases. *Front. Physiol.* **7**, 1–8 (2016).
105. Wallace, J. L., Dicay, M., McKnight, W. & Martin, G. R. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. *FASEB J.* **21**, 4070–4076 (2007).
106. Wallace, J. L., Caliendo, G., Santagada, V. & Cirino, G. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346). *Br. J. Pharmacol.* **159**, 1236–1246 (2010).

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、研究全般に渡って直接御指導を賜りました慶應義塾大学薬学部 創薬研究センターの金倫基教授、秋山雅博特任講師に心から感謝いたします。また、多大なご指導ご鞭撻を賜りました、生化学講座の長谷耕二教授に深く感謝いたします。

本研究を行うに際して有益なる御助言と御指導を賜りました慶應義塾大学薬学部 生化学講座の木村俊介准教授、高橋大輔助教に深く感謝いたします。

本研究を行うに際して実験・解析に多大な御協力を賜りました慶應義塾大学医学部 杉浦悠毅専任講師、末松誠教授、慶應義塾大学先端生命科学研究所 福田真嗣特任教授、慶應義塾大学薬学部 永沼達郎助教、有田誠教授、ミシガン大学 猪原直弘教授、Gabriel Núñez 教授、筑波大学医学医療系 熊谷嘉人教授、山川寛人様に深く感謝いたします。

本研究に御協力下さいました慶應義塾大学薬学部 藤村由美子様に深く感謝いたします。

楽しい大学院生活を過ごさせていただいた慶應義塾大学薬学部生化学講座および創薬研究センターの皆様に深く感謝いたします。

最後に、どんなときも私を支えてくれた実家の家族と、愛犬モモに深く感謝いたします。