博士学位論文 2023 年度

精製飼料摂取が腸上皮細胞および 腸内細菌叢に与える影響の解明

慶應義塾大学大学院薬学研究科

白鳥 弘明

目次 P. 略語リスト 1. 序論 3-4 2. 実験材料 5-9 2.1. 試薬 2.2. 溶液 2.3. 抗体・レクチン・ストレプトアビジン 2.4. 実験機器および器具 3. 方法 10-15 3.1. 実験動物·飼料 3.2. 組織学的解析・免疫染色およびレクチン染色 3.3. FITC-dextran による腸上皮透過性試験 3.4. 腸上皮単層シートの単離 3.5. 腸上皮 RNA sequencing (RNA-seq) 解析 3.6. cDNA 合成および定量 PCR (qPCR) 3.7. イムノブロット 3.8. 腸上皮細胞のフローサイトメトリー解析 3.9. 腸内細菌ゲノム DNA 抽出および 16S rRNA 遺伝子解析 3.10. 腸内細菌叢解析 3.11. qPCR 法による総菌数の定量 3.12. 走査型電子顕微鏡による回腸上皮接着細菌の観察 3.13. 管腔内容物中有機酸濃度の測定 3.14. 小腸粘膜固有層からの免疫細胞の単離およびフローサイトメトリー解析 3.15. 統計解析 4. 結果 16-21 4.1. PD は回腸上皮ターンオーバーを抑制する 4.2. PD は抗菌タンパク質産生を抑制する 4.3. PD は回腸において脂肪酸酸化とケトン体合成を誘導する 4.4. PD は回腸において上皮フコシル化を誘導する 4.5. PD は腸内細菌叢を変動させる 4.6. PD は回腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度に影響を与えない 4.7. PD は SFB を減少させることで腸上皮の増殖とバリア機能を抑制する 5. 考察 22-25

 6. 図・表
 26-50

 7. 参考文献
 51-55

 8. 謝辞
 56

略語リスト

- ILC3 (group3 innate lymphoid cells)
- ILCs (innate lymphoid cells)
- インターロイキン (interleukin, IL)
- REG3y (Regenerating islet-derived protein 3-gamma)
- CD (Crude diet)
- PD (Purified diet)
- SPF (Specific pathogen-free)
- BSA (Bovine serum albumin)
- PBS (phosphate-buffered saline)
- EdU (5-ethynil-2'-deoxyuridine)
- EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)
- HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)
- cDNA (complementary DNA)
- PCR (Polymerase Chain Reaction)
- SDS (Sodium dodecyl sulfate)
- SDS-PAGE (SDS Polyacrylamide gel electrophoresis)
- 2-ME (2-mercaptoethanol)
- TBS-T (Tris Buffered Saline with Tween 20)
- HRP (Horseradish peroxidase)
- 7-AAD (7-Amino-Actinomycin D)
- 16S rRNA (16S ribosomal RNA)
- CFU (Colony Forming Unit)
- GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometry)
- Fixable Viability Stain 780 (FVS 780)
- HE (Hematoxylin Eosin) 染色
- GO (gene ontology)
- KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
- DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery)
- Th (helper T)

1. 序論

腸管は栄養素の消化・吸収の場として機能する一方で、腸管内には腸内細菌や病原 性微生物など様々な異物が存在する。そのため、腸上皮には異物の侵入を防ぐためのバ リア機構が形成されている。例えば、腸上皮細胞同士はタイトジャンクションにより強 固に結合している他¹、腸上皮細胞は 3-5 日間で代謝回転(ターンオーバー)²し、感染 細胞や物理的に傷害を受けた細胞を絶えず新しい細胞へと置き換えることで、そのバリ アを維持している^{3,4}。また、腸上皮細胞の一種である杯細胞はムチンと呼ばれる粘液成 分を産生する他、腸上皮細胞の表面には様々な糖鎖が発現しており、異物の接着を防ぐ ことで、物理的なバリアを形成している⁵。さらに、腸管陰窩 (クリプト)に存在するパ ネート細胞は、抗菌タンパク質を産生することで病原菌に対する化学的なバリアを形成 している⁶。このように、腸上皮には複雑で多様なバリア機構が構築されており、病原 体や常在微生物の体内への侵入を防いでいる。腸上皮バリアの破綻による腸管透過性の 亢進は、リーキーガット症候群を引き起こし、自己免疫性肝炎⁷や関節リウマチ⁸、多 発性硬化症⁹など、様々な全身疾患の発症に関与している¹⁰。これらの報告は、腸上皮 バリア機能が生体恒常性の維持に重要であることを示唆する。

近年の研究により、腸上皮バリア機能の維持において、腸内細菌の存在が重要であ ることが報告されている。例えば一部の腸内細菌は、回腸において 3 型自然リンパ球 (group 3 innate lymphoid cells: ILC3)からの IL-22 産生を誘導することにより、腸上皮表 面に発現する糖鎖末端への α-1,2-フコース付加 (フコシル化)を誘導し、腸管感染症の 発症リスクを抑制する^{11,12}。また、腸内細菌が保有するフラジェリンやリポ多糖などの 微生物関連分子パターン (microbiota-associated molecular pattern)は、粘液や抗菌タンパ ク質 (REG3γ や Lipocalin 2 など)の産生を誘導する^{13,14}。そのため、無菌マウスでは粘 液層が薄くなり¹⁵、抗菌タンパク質の産生が減少する¹⁶。また、腸内細菌叢のバランス 異常 (ディスバイオーシス)は、タイトジャンクションを破綻させる¹⁰ことにより、腸 管透過性を亢進させる¹⁷。これらの報告から、腸内細菌叢は腸上皮バリア機能の維持に 重要であることが示唆される。

腸内細菌による腸上皮バリア機能維持には食事が大きな影響を及ぼす。例えば腸内 細菌は食物繊維を発酵代謝することにより、短鎖脂肪酸(酢酸、プロピオン酸、酪酸な ど)や乳酸を産生する^{18,19}。酪酸は杯細胞においてムチンの主成分である MUC2 の産生 を促進し²⁰、酢酸、プロピオン酸、および酪酸は、腸上皮細胞のターンオーバーを誘導 する²¹。また、酪酸は低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor 1α: HIF-1α)を誘導するこ とで、タイトジャンクションを強固にする²²。さらに、*Lactobacillus* が産生する乳酸は、 絶食後の再摂食時に腸上皮細胞の増殖を誘導する。乳酸はパネート細胞と、その上皮下 層に存在する間葉系細胞の Gpr81 受容体に作用し、Wnt3/β-catenin 依存的に腸上皮幹細 胞の増殖と分化を誘導する²³。そのため低繊維食を与えたマウスでは、粘液層の厚さが 減少し、*Citrobacter rodentium* 感染による腸炎が悪化する²⁴。また、高脂肪食を摂餌させ たマウスでは、Bifidobacterium や Lactobacillus, Clostridium, Bacteroides などが減少し、 Oscillibacter や Desulfovibrio などが増加する²⁵。Bifidobacterium や Lactobacillus はタイ トジャンクションを強固にする一方で^{26,27}、Oscillibacter や Desulfovibrio は腸管透過性 を亢進させる²⁸。そのため、高脂肪食摂餌によりタイトジャンクションの破綻²⁹や粘液 層の薄層化が誘導され³⁰、腸管粘膜固有層への細菌由来エンドトキシンの流入が促進す る^{13,25,31}。

本研究において私は、食事がマウス腸管恒常性に与える影響に着目した。実験動物用 の飼料は、標準飼料(Crude diet: CD)と精製飼料 (Purified diet: PD)の大きく2種類に 分類される (以下、標準飼料を CD、精製飼料を PD とそれぞれ称する)。CD は大豆や トウモロコシ、フィッシュミールなどの天然由来原料で構成されている。通常の飼育に 用いられ、比較的安価である一方、天然由来原料を精製することなく使用しているため、 用途に応じて特定の栄養素を添加または欠損させることは困難である³²。また、CDの 正確な配合比率は公開されていないことが多く、製造業者が穀物の収穫高などに応じて 原材料を変更することがあることから、ロット間で栄養成分のバラツキがあると言われ ている³²。一方、PD は、カゼインやコーンスターチ、セルロースといった精製された 原材料で構成されており、その配合比率が公開されていることから、特定の栄養素を添 加または欠損させることが可能である³²。そのため PD は様々な医学、栄養学分野の研 究に汎用されている³²。しかしながら、CD と PD では栄養組成が異なり、例えば CD は 腸内細菌のエネルギー源となる食物繊維を豊富に含有(総重量の約20%)しているが、 PD の食物繊維含有量は約 5%程度であり、またそのほとんどは不溶性食物繊維である セルロースで構成されている。先行研究により、PD 摂餌が宿主に与える影響が報告さ れ、例えば PD 摂餌マウスでは絶食時の血中インスリン濃度やトランスアミナーゼ濃度 が上昇し、肝臓における脂質合成が増加する³³。PD 摂餌は慢性的拘束ストレスモデル マウスにおいて腸上皮幹細胞の再生を阻害することにより、デキストラン硫酸ナトリウ ム (DSS) 誘導性大腸炎を増悪させる³⁴。一方、PD 摂餌マウスでは、大腸管腔内容物中 のアミノ酸濃度が低下することにより、Clostridioides difficile 感染が緩和される³⁵。これ らの報告は、食事成分が宿主生理機能に及ぼす影響の重要性を示唆している。しかし、 PD が腸上皮細胞や腸内細菌叢に及ぼす影響については不明な点が多い。そこで本研究 では、PD 摂取が腸上皮細胞および腸内細菌叢に与える影響を解明することを目的とし た。

2. 実験材料

2.1. 試薬

本研究に際し、使用した主な試薬を以下に記載する。

- Mildform (Fujifilm Wako)
- D-PBS (Nacalai Tesque)
- ・ エタノール (Nacalai Tesque)
- Hematoxylin (Agilent Technologies)
- Mount-Quick (Cosmo Bio)
- Click-iT Plus EdU Cell Proliferation Kit for Imaging and Alexa Fluor 594 dye (Life Technologies)
- OCT Compound (サクラファインテック)
- ・ メタノール (Nacalai Tesque)
- Avidin/Biotin Blocking kit (Vector)
- Hoechest33342 (H3570, Life Technologies)
- ProLongTM Gold Antifade Mountant (Invitrogen)
- 4 kDa FITC-dextran (Sigma Aldrich)
- ・ ヘパリン (持田製薬)
- RPMI1640 培地 (Nacalai Tesque)
- Newborn calf serum (NBCS) (gibco)
- Fetal calf serum (FCS) (gibco)
- HEPES (Nacalai Tesque)
- Penicillin/Streptomycin (Nacalai Tesque)
- Dithiothreitol (Nacalai Tesque)
- Liberase (Roche)
- DNase I (Roche Diagnostics)
- Percoll (Cytiva)
- eBioscienceTM Protein Transport Inhibitor Cocktail (500X) (Thermo Fisher Scientific)
- FVS780 (BD Biosciences)
- 7-AAD (BioLegend)
- NucleoSpin RNA Plus kit (タカラバイオ)
- Qubit RNA BR Assay Kit (Q10210, Invitrogen)
- Collibri 3' mRNA Library Prep Kit for Illumina Systems (Invitrogen)
- AMPure XP beads (Beckman Coulter Life Sciences)
- Sepasol (Nacalai Tesque)
- ・ クロロホルム (Nacalai Tesque)
- $2 \mathcal{T} \square \mathcal{N} / \mathcal{V}$ (Nacalai Tesque)

- 滅菌水 (Nacalai Tesque)
- ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)
- SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories)
- Pierce Rapid Gold BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)
- PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (TOYOBO)
- Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO)
- Chemi-Lumi One L (Nacalai Tesque)
- Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque)
- QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen)
- ・ トリス・塩酸緩衝液 pH 8.0 (Nacalai Tesque)
- 塩酸 (Nacalai Tesque)
- ・ ジエチルエーテル (Nacalai Tesque)
- 5-sulfosalicylic acid (Fujifilm Wako)
- ethylbutyric acid (Fujifilm Wako)
- *N*-methyl-*N*-trifluoroacetamide (Sigma Aldrich)

2.2. 溶液

本研究に際し、調製した主な溶液を以下に記載する。

20 mM EDTA in HBSS (20EH)

試薬	最終濃度
HBSS	-
0.5 M EDTA	20 mM
1M HEPES	10 mM
Penicillin-Streptomycin	100 U/mL penicillin & 100 µg/mL streptomycin

2% NBCS in RPMI (2R)

試薬	最終濃度
RPMI 1640 L-Glu (+)	-
1M HEPES	10 mM
inactivated NBCS	2%
Penicillin-Streptomycin	100 U/mL penicillin & 100 µg/mL streptomycin

2% NBCS in PBS (2P)

試薬	最終濃度
D-PBS	-
inactivated NBCS	2%

10% FBS in RPMI (10R)

試薬	最終濃度
RPMI 1640 L-Glu (+)	-
inactivated FBS	10%
1M HEPES	10 mM
Glutamax (100 x)	2 mM
55 mM 2-Mercaptoethanol	55 μΜ
Penicillin-Streptomycin	100 U/mL penicillin & 100 µg/mL streptomycin

酵素液

試薬	最終濃度
2R	-
Libearase	0.2 U/mL
DNase I	0.1 mg/mL

Percoll 溶液

	90% Percoll	2R	体積
40% Percoll (4:5)	2.22 mL/tube	2.78 mL/tube	5 mL/tube
80% Percoll (8:1)	1.78 mL/tube	0.22 mL/tube	2 mL/tube

2.3. 抗体・レクチン・ストレプトアビジン

本研究に際し、使用した主な抗体・レクチン・ストレプトアビジンを以下に記載する。

Antibody	Cat:	Clone	Conjugate	Source
Immunohistochemistry				
Anti-Ki67	GTX16667	SP6		GeneTex
Anti-Lysozyme C	sc-27958	ployclonal		SANTA CRUZ
Anti-TFF3	RQ4090	ployclonal		NSJ Bioreagents
Anti-Muc2	sc-15334	ployclonal		SANTA CRUZ
biotinylated UEA-1	B-1065-2			Vector
Goat anti-Rabbit IgG	A-11070	ployclonal	AF488	invitrogen

Donkey anti-Goat IgG	A32814	polyclonal	AF488	invitrogen
Donkey anti-Rabbit IgG	A32794	polyclonal	AF555	invitrogen
Streptavidin	405237		AF647	BioLegend
Immunoblotting				
Anti-REG3G	ab198216	polyclonal		abcam
Anti-HMGCS2	AV41563	polyclonal		Sigma-Aldrich
Anti-PDK4	ab214938	EPR19727-		abcam
		245		
Anti-PPARa	sc-398394	Н-2		SANTA CRUZ
Anti-FABP1	13368	D2A3X		Cell signaling
Anti-pSTAT3	9145	Tyr705		Cell signaling
Anti-STAT3	9139	124H6		Cell signaling
Anti-β-actin	010-27841	6D1		Fujifilm Wako
Anti-rabbit IgG	7074S	polyclonal	HRP	Cell signaling
Anti-mouse IgG	7076S	polyclonal	HRP	Cell signaling
Flow cytometry				
Anti-CD16/32	101302	93		BioLegend
Anti-CD24	567383	30-F1	PE	BD Biosciences
Anti-CD326 (EpCAM)	11-5791-82	G8.8	FITC	Thermo Fisher Scientific
Anti-CD44	17-0441-82	IM7	APC	Thermo Fisher Scientific
Anti-CD45	25-4317-82	30-F11	BV510	Thermo Fisher Scientific
Anti-CD4	103137	GK1.5	BV786	BioLegend
Anti-CD3e	563877	145-2C11	FITC	BD Biosciences
Anti-CD11c	100204	N418	APC	BioLegend
Anti-F4/80	20-0114-	BM8	APC	TONBO
	U025			
Anti-B220	123116	RA3-6B2	APC	BioLegend
Anti-CD8a	17-0452-82	53-6.7	APC	Thermo Fisher Scientific
Anti-Foxp3	100712	FJK-16s	FITC	BioLegend
Anti-RORyt	11-5773-82	Q31-378	PE-	Thermo Fisher Scientific
			CF594	
Anti-IL-22	562684	1H8PWSR	PE	BD Biosciences
Streptavidin	12-7221-82		PE-Cy7	Thermo Fisher Scientific

2.4. 実験機器および器具

- FV3000 (Olympus)
- 実体顕微鏡 (Leica Microsystems)
- Infinite 2000 (Tecan)
- T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories)
- CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories)
- NovaSeq 6000 (Illumina)
- ・ ミニプロティアン Tetra セル (Bio-Rad Laboratories)
- ・ パワーパック HC (Bio-Rad Laboratories)
- Amersham ImageQuant 800 (Cytiva)
- Shake Master Neo (Biomedical Sciences)
- Mupid-2plus (タカラバイオ)
- Printgraph Gel Documentation System $(\mathcal{T} \vdash -)$
- MiSeq (Illumina)
- FACS LSRFortessa (BD Biosciences)
- FACS Celesta (BD Biosciences)
- GC-MS : JMS-Q1500GC (Japan Electron Optics Laboratory)

3. 方法

3.1. 実験動物・飼料

3 週齢の BALB/cAJcl マウスおよび BALB/cCrSlc マウスを、それぞれ日本クレア株式 会社(富士生育場)および三共ラボサービス株式会社(引佐生育場)より購入した。Lgr5-EGFP-ires-creERT2 マウスは、Jackson Laboratory より購入した。マウスに標準飼料(CD) として CE-2(日本クレア)または精製飼料(PD)として AIN-93G(オリエンタル酵母) を摂餌させた後、各実験に使用した。

マウスは慶應義塾大学薬学部動物飼育施設、または国立国際医療研究センター 肝 炎・免疫研究センター 動物飼育施設において SPF 環境下で飼育した。全ての動物実験 は、慶應義塾大学動物実験委員会(絶食が腸管の免疫システムに与える影響の解明,承 認番号 A2022-009)および国立国際医療研究センター動物実験委員会(消化管の形態と 機能における食物摂取の影響,承認番号 2023-A044)の承認の下実施した。

3.2. 組織学的解析・免疫染色およびレクチン染色

CDまたはPDを3週間摂餌させたマウスから小腸を摘出し、小腸の長さを測定した。 腸管内容物をPBS で洗い流した後、解剖バサミで切り開き、濾紙に挟んで Mildform で 一晩浸漬固定した。PBS に腸管組織を置換後、パラフィンに包埋し、5 µm の組織切片 を作成した。組織切片をキシレンで脱パラフィンし、エタノール水溶液中で水和させた 後、ヘマトキシリンおよびエオジンで染色した。スライドは Mount-Quick を用いて封入 した。

脱パラフィンした切片を 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中、電子レンジで 10 分間 沸騰させることにより、抗原賦活化を行った。冷却後、メタノール中で透過処理を行い、 3% BSA 含有 PBS 溶液でブロッキングした。レクチン染色を行う場合は、Avidin/Biotin Blocking kit を用いて、内在性ビオチンのブロッキングを追加で実施した。その後一次 抗体またはビオチン標識レクチンを希釈した溶液中にて切片を 4℃ で一晩インキュベ ートした。PBS で洗浄後、蛍光標識二次抗体または蛍光標識ストレプトアビジンと Hoechest33342 を希釈した溶液中、室温で 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、 ProLongTM Gold Antifade Mountant を用いてスライドを封入した。スライドは FV3000 (Olympus) を用いて観察・画像撮影を行い、Fiji (ImageJ) で解析を行った。

EdU 投与による増殖細胞の標識は、先行研究^{36,37}に記載された方法を参考に実施した。解剖 24 時間前に 5 mg/kg の EdU を腹腔内投与し、24 時間経過後、上記の方法により小腸組織を採取、固定した。PBS に置換後、組織を 30%スクロース溶液に置換した。 置換した組織を OCT compound に包埋し、液体窒素中で凍結させた。作製した凍結ブロックから、クライオスタットを用いて 5 µm の凍結切片を作製した。その後、Click-iT Plus EdU Cell Proliferation Kit (Life Technologies)の製品プロトコルに従い、EdU のシグナルを検出した。

3.3. FITC-dextran による腸上皮透過性試験

FITC-dextran assay は、Ishihara らの論文³⁸を参考に実施した。CD または PD を 3 週 間摂餌させたマウスを 4 時間絶食させた後、4 kDa FITC-dextran を体重 100 g あたり 60 mg 経口投与した。投与開始 45 分後、解剖を行い、心採血により血液を採取した。採取 した血液は直ちにヘパリンと混合した。血液を 4°C, 1,000 × g で 10 分間遠心し、血漿画 分を採取した。血漿を PBS で 5 倍希釈し、蛍光分光光度計 (Infinite 2,000, Tecan) を用 いて、励起波長 485 nm、発光波長 535 nm で血漿中 FITC-dextran 濃度を測定した。検量 線は、PBS で段階希釈した 4-kDa FITC-dextran を用いて作成した。

3.4. 腸上皮単層シートの単離

腸上皮単層シートは Kimura らの上皮剥離法³⁷により採取した。マウスを解剖後、腸 管組織を 30 mM EDTA 含有 HBSS に浸漬した。氷上で 10 分間インキュベートした後、 実体顕微鏡下で 26G 針付きシリンジを用いて、腸上皮単層シートを剥離した。採取し た腸上皮単層シートは、HBSS で洗浄後、以下の実験 (3.5-3.7) に使用した。

3.5. 腸上皮 RNA sequencing (RNA-seq) 解析

上記の方法 (3.4) により腸上皮単層シートを採取し、NucleoSpin RNA Plus kit (MACHEREY-NAGEL) を用いて total RNA を抽出した。Qubit RNA BR Assay Kit (Invitrogen) を用いて RNA 濃度を定量後、Collibri 3' mRNA Library Prep Kit for Illumina Systems (Invitrogen) を用いて、製品プロトコルに従い cDNA ライブラリーを合成した。 cDNA ライブラリーは AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter Life Sciences) を用いて精製・濃縮し、NovaSeq 6000 (Illumina) で 300 bp paired-end read でシーケンスした。

データ解析は、まず、FASTQ ファイルを、STAR (version 5.01) を用いてマウスリファレ ンスゲノム (mm10) にマッピングした³⁹。その後 RStudio (RStudio Inc.) を用いて R で遺伝 子発現の変動解析を行った。生データを R にインポートし、その後 DESeq2 パッケージを 用いて解析した。全サンプルで合計 10 カウント未満の遺伝子を除去し、正規化を行った。 q 値 <0.05、| Log₂ (Fold Change) | >1 の遺伝子を「差次的発現遺伝子 (differentially expressed gene)」と定義し、更に解析を進めた⁴⁰。Volcano plot は R コマンド EnhancedVolcano (https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano) を用いて作成した。Gene Ontology (GO) エンリッチメントおよび Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) パスウェイ 解 析 は、 Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID, https://david.ncifcrf.gov/)⁴¹を用いて実施した。Biological process ontology の GO カテゴリ ーと KEGG パスウェイは、q 値 <0.05、| Log₂ (Fold Change) | >1 として同定した。

3.6. cDNA 合成および定量 PCR (qPCR)

上記の方法 (3.4) により腸上皮単層シートを採取し、1 mL の Sepasol (Nacalai

Tesque) 中で破砕した。その後、製品プロトコルに従い、腸上皮単層シートより total RNA を抽出した。抽出した total RNA を鋳型とし、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて cDNA を合成した。その後、SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) を用いて、製品プロトコルに従い qPCR を行った。PCR は CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories) を用いて実施した。遺伝子発現は *Rpl32* をハウスキーピング遺伝子とし、ΔΔCt 法により解析した。本研究で使用したプライマーを、以下の表に示す。

Target gene		Sequence			
Hmgcs2	Forward	5'- ATACCACCAACGCCTGTTATGG-3'			
	Reverse	5'- CAATGTCACCACAGACCACCAG-3'			
Dall-4	Forward	5'-AGGGAGGTCGAGCTGTTCTC-3'			
Гак4	Reverse	5'-GGAGTGTTCACTAAGCGGTCA-3'			
Eabral	Forward	5'-GGGAAGAAAATCAAACTCACCATC-3'			
гаорт	Reverse	5'-AGTTGTCACCATTTTATTGTCACC-3'			
D	Forward	5'-AGAGCCCCATCTGTCCTCTC-3'			
Ppara	Reverse	5'-ACTGGTAGTCTGCAAAACCAAA-3'			
Est 1	Forward	5'- CAGTGGGTGGGCATCAAT -3'			
FutI	Reverse	5'- CCACAGACATACAACAAAGC -3'			
Est 2	Forward	5'-TGTGACTTCCACCATCATCC-3'			
Fut2	Reverse	5'-TCTGACAGGGTTTGGAGCTT-3'			
D-122	Forward	5'-TTCCTGGTCCACAATGTCAA-3'			
κρι32	Reverse	5'-GGCTTTTCGGTTCTTAGAGGA-3'			
Dogth	Forward	5'-CAGACAAGATGCTTCCCCGT-3'			
ледэр	Reverse	5'-CTAATGCGTGCGGAGGGTAT-3'			
Dog2g	Forward	5'-CAGACAAGATGCTTCCCCGT-3'			
кедэд	Reverse	5'-GCAACTTCACCTTGCACCTG-3'			

3.7. イムノブロット

上記の方法(3.4)により腸上皮単層シートを単離し、1 mL の RIPA buffer (0.1% SDS および 10 mM NaF を含有)中で破砕した。氷上で 30 分間インキュベートした後、サン プルを 4°C、10,000 × g で 10 分間遠心し、上清を回収した。タンパク質濃度は、Pierce Rapid Gold BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。上清に 2-ME を含むサンプルバッファー溶液を加え、95°Cで 5 分間変性させた。その後、サンプ ルを SDS-PAGE に供し、メンブレン (Immobilon-P, Merck)に転写した。転写後、メン ブレンを PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (TOYOBO)でブロッキングした後、 ー次抗体を希釈した溶液中に入れ、室温で1時間インキュベートした。TBS-T でメンブ レンを洗浄後、HRP 標識二次抗体を希釈した溶液中にて室温で1時間インキュベート した。TBS-T で洗浄後、Chemi-Lumi One L (Nacalai Tesque)または Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque)を用いて化学発光させ、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)を用いて検出した。バンドの強度は Fiji (ImageJ)を用いて定量した。

3.8. 腸上皮細胞のフローサイトメトリー解析

腸管組織を 2% FBS、1 mM EDTA、および 1 mM dithiothreitol を含む HBSS 中、穏や かに振盪しながら 30 分間インキュベートした。ピンセットで上皮層を粘膜固有層から 剥離させた後、0.125 mg/mL Collagenase (和光純薬) および 0.5 mg/mL DNase I (Roche Diagnostics) を含む RPMI1640 溶液中にて 37°C で 5 分間インキュベートすることで、 腸上皮細胞を単離した。採取した細胞を抗 CD16/32 (FcγR) 抗体によりブロッキングし た後、蛍光標識抗体で染色した。その後、7-AAD により死細胞を染色し、FACS LSRFortessa (BD Biosciences) で解析した。

3.9. 腸内細菌ゲノム DNA 抽出および 16S rRNA 遺伝子解析

マウスを解剖後、回腸内容物および回腸組織を採取した。サンプルと QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen) 付属の抽出液を2 mL ハードチューブに入れ、、Shake Master Neo (Biomedical Sciences) で 10 分間ビーズ破砕した。その後、QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen) の製品プロトコルに従って腸内細菌ゲノム DNA を抽出した。

16S リボソーム RNA (rRNA) ゲノムライブラリーは、Komiyama らの論文⁴²に記載さ れた方法で合成した。抽出したゲノム DNA を 10 mM Tris-HCl buffer で希釈後、16S rRNA V3-V4 領域に特異的なプライマー (Forward: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3', Reverse: 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') と KAPA HiFi HotStart Ready Mix を用い、Amplicon PCR を実施した。PCR 産物を AMPure XP beads によって精製した後、Nextera XT Index kit および KAPA HiFi HotStart Ready Mix を用いて、サンプルごとに配列が異なるインデ ックス配列を付加した。PCR 産物を再度 AMPure XP beads によって精製した後、10 mM Tris-HCl buffer で希釈し、プールした。合成した 16S rRNA ゲノムライブラリーは MiSeq (Illumina) で 300 bp paired-end read でシーケンスした。

3.10. 腸内細菌叢解析

腸内細菌叢の解析は、Komiyama らの論文⁴²に記載の方法を用いて実施した。Bowtie2 を用いて宿主ゲノム DNA 配列を除去した後、QIIME2 (version 2020.8)を用いて FASTQ ファイルを解析した。シーケンスデータは Qiime2 paired-end demux を用いて統合した。 その後 QIIME2 の dada2 プラグインを使用してトリミングし、エラー配列を除去した。 細菌の分類学的分類は、SILVA_132 reference database (SSURef_NR99_132_SILVA) に対 して、QIIME2 の feature classifier plugin を用いて学習させた naïve Bayes classifier を用い て行った⁴³⁻⁴⁵。系統樹は QIIME2 の align-to-tree-mafft-fast tree を用いて作成した。多様 性解析は QIIME2 core-metrics-phylogenetic analysis を用いて実施した。各細菌の相対存 在量は taxa collapse QIIME2 plugin を用いて計算した。

3.11. qPCR 法による総菌数の定量

腸内細菌の総菌数は、Komiyama らの論文⁴²を参考に、qPCR により定量した。上記 の方法 (3.9) により抽出した腸内細菌ゲノム DNA および SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix、16S rRNA V3-V4 領域に特異的なプライマーを混合し、CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories) を用いて PCR を実施した。検量線は、大腸菌から抽出し たゲノム DNA スタンダード (1×10¹-1×10⁸ CFU) を用いて作成した。

3.12. 走査型電子顕微鏡による回腸上皮接着細菌の観察

回腸組織を摘出し、腸管内容物を PBS で洗い流した。組織を切り開き、シリコン台 にピンで固定した。組織を 2.5%グルタルアルデヒド中、4℃ で一晩浸漬固定した。0.1 M PBS で洗浄後、1.0%四酸化オスミウム中、4℃ で 2 時間二次固定した。サンプルをエ タノールで脱水し、臨界点乾燥機 (CPD300, Leica Biosystems) で乾燥させた。サンプル をステージに置き、導電性クイックコーター (sc-701, SANYU ELECTRON) を用いて、 5 mA の電流で 60 秒間、Pt-Pt を 2 回コーティングした。コーティングしたサンプルは、 走査型電子顕微鏡 (SU6600, 日立ハイテク) を用いて 5 kV で画像化した。

3.13. 管腔内容物中有機酸濃度の測定

回腸内容物および盲腸内容物中の有機酸濃度は、Furusawa、Isobe ら論文^{46,47}を参考 に、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS)を用いて分析した。回腸内容物およ び盲腸内容物を2 mL ハードチューブに入れ、超純水中で3 mm のジルコニアビーズを 用い、Shake Master Neo (Biomedical Sciences) で10分間破砕した。破砕抽出物を4°C、 10,000×gで5分間遠心し、上清を回収した。上清に20%の5-スルホサリチル酸および 1 mM のエチル酪酸を加えた。サンプルを室温で10分間インキュベートし、20°C、15,000 ×gで15分遠心した。サンプルに37%塩酸溶液を加えた後、ジエチルエーテルを加え、 室温で15分間ボルテックスした。20°C、

15,000×gで5分遠心後、上層を回収し、1 g/mLの*N*-methyl-*N*-trifluoroacetamideを加 えた。サンプルを室温でインキュベートし、GC-MS (JMS-Q1500GC, Japan Electron Optics Laboratory)を用いて分析した。

3.14. 小腸粘膜固有層からの免疫細胞の単離およびフローサイトメトリー解析

小腸粘膜固有層からの免疫細胞の単離は、Furusawa、Shiratori らの論文^{46,48}を参考

に、一部改変して実施した。小腸を 20EH 溶液中、37°C で 30 分間インキュベートし、 粘液および腸上皮細胞を取り除いた。組織をハサミで細断した後、酵素液を加え、37°C で 30 分間インキュベートした。その後 100 µm セルストレーナーで細胞懸濁液を濾過 した。細胞懸濁液を 4°C、500 × g で 5 分間遠心後、細胞を 40% Percoll に再懸濁し、パ スツールを用いて 40% Percoll の下層に 80% Percoll を注入した。室温にて 780 × g で 20 分間遠心した。界面の細胞を回収し、4°C、500 × g で 5 分遠心することで小腸粘膜固有 層から免疫細胞を単離した。

ex vivo におけるサイトカイン産生能の検証は、Talbot らの論文⁴⁹を参考に、一部改 変して実施した。単離した細胞を、10R 溶液中にて 37℃ で 1.5 時間インキュベートし、 その後タンパク質輸送阻害剤カクテルを含む 10R 溶液中、37℃ でさらに 1.5 時間イン キュベートした。2P 溶液で洗浄後、抗 CD16/32 (FcγR) 抗体溶液で細胞の Fc 受容体を ブロッキング後、蛍光標識抗体を添加し、遮光条件にて 4℃、30 分間インキュベートす ることで細胞表面抗原を染色した。2P 溶液で洗浄後、Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set を用いて氷上で 45 分間インキュベートすることで、細胞固定と透過処理を行 った。2P 溶液で洗浄後、蛍光標識抗体を添加し、室温にて 45 分間インキュベートする ことで細胞内抗原を染色した。2P 溶液で洗浄後、FACS Celesta (BD Biosciences) を用い てフローサイトメトリー解析を行った。

3.15. 統計解析

統計解析には GraphPad version 9 を使用した。値は平均値±分散 (SD) で表した。2 群間の平均値の差の統計解析には、等分散性が見られた場合は unpaired t 検定、不等 分散の場合には Mann–Whitney の U検定を行った。3 群以上の平均値の差の統計解析 には、一元配置分散分析 (one-way ANOVA)または二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を行い、等分散性を確認後、Tukey 検定または Šídák 多重比較検定を用いて 分析した。p < 0.05 未満を統計学的有意差と判定した。統計的有意性は、p < 0.05*、p< 0.01***、<math>p < 0.001****、p < 0.0001**** と表記した。

細菌分類群の存在量の比較は、linear discriminant analysis effect size (LEfSe)を用いて Web サイト上 (https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/root) で実施した。2 群間のβ 多様性の差は QIIME2 上で PERMANOVA を用いて分析した。

4. 結果

4.1. PD は回腸上皮ターンオーバーを抑制する

まず 3 週齢の BALB/cAJcl マウスに、CD または PD を 3 週間摂餌させ、PD 摂餌が腸 管に与える影響を検証した。PD に比べて CD では単位重量あたりの栄養価が約 15%低 いが (表 1)、CD 摂餌マウスと比べ、PD 摂餌マウスでは 1 日あたりの摂餌量が約 10~20% 少なかった (図 1A)。そのため、1 日あたりの摂取カロリーは両群で概ね同等であり (図 1B)、PD 摂餌による体重の有意な変動は認められなかった (図 1C)。一方、3 週間の摂 餌終了時点で小腸の形態を観察した結果、PD 摂餌マウスでは CD 摂餌マウスに比べて 小腸の長さが有意に短縮していた (図 1D)。

そこで、組織染色により腸上皮の形態を観察した。HE 染色の結果、PD 摂餌マウス の回腸では、クリプト長および絨毛長の有意な短縮が認められた (図 1E)。細胞増殖マ ーカーである Ki67 の免疫染色を行ったところ、PD 摂餌マウスでは Ki67 陽性細胞数が 有意に減少していた (図 1F)。PD 摂餌によるクリプト長と絨毛長の短縮が腸上皮細胞の ターンオーバーの減少に起因するかどうか調べるため、EdU を用いて増殖細胞の標識 実験を行った。その結果、PD 摂餌マウスでは、CD 摂餌マウスに比べてクリプト底部か ら EdU 標識細胞の先端までの移動距離が有意に短縮した (図 1G)。このことから、PD は回腸上皮細胞のターンオーバーを抑制することが示唆された。

一方、十二指腸では、回腸と同様に PD 摂餌によりクリプト長が短縮したが、絨毛長 は両群で概ね同等であり (図 2A)、PD 摂餌による Ki67 陽性細胞の有意な変動も認めら れなかった (図 2B)。また、PD 摂餌マウスの十二指腸では EdU 標識細胞の移距離が有 意に短縮したが (図 2C)、回腸 (図 1G) と比較してその差は小さかった。これらの結果 から、PD 摂餌は特に回腸において上皮細胞のターンオーバーを抑制することが示唆さ れた。一方、FITC-dextran 投与により PD 摂餌が腸管透過性に与える影響を検証した結 果、両群で血漿中の FITC-dextran 濃度に有意な差は認められなかった (図 2D)。このこ とから、PD 摂餌は腸管の物理的なバリア機能には影響を与えないと考えられた。

続いて PD 摂餌が回腸において上皮細胞組成に与える影響を観察した。杯細胞マー カーである Trefoil factor 3 (TFF3)の染色を行った結果、PD 摂餌による杯細胞数の有意 な変動は認められなかった (図 3A)。一方、CD 摂餌マウスに比べて PD 摂餌マウスでは lysozyme 陽性パネート細胞数が有意に減少していたたが、その差は僅かであった (図 3B)。また、Lgr5 陽性腸上皮幹細胞数は両群で概ね同等であった (図 3C)。従って、PD 摂餌が腸上皮細胞の分化に与える影響は小さいと考えられた。

4.2. PD は抗菌タンパク質産生を抑制する

PD 摂餌が腸上皮細胞に与える影響の全体像を明らかにするため、回腸上皮および十二指腸上皮の RNA-seq 解析を実施した。その結果、CD 摂餌マウスと比較し、PD 摂餌マウスの回腸上皮では 2,750 遺伝子の発現が有意に減少し、3,013 遺伝子の発現が有意

に上昇していた (図 4A)。PD 摂餌マウスにおいて発現が減少した遺伝子について GO エ ンリッチメント解析により機能を推定した結果、生体防御や細菌応答、免疫応答など (response to other organism, response to bacterium, defense response, immune response, imgue to active of the active of the

一方、十二指腸では PD 摂餌マウスにおいて 2,741 遺伝子の発現が有意に減少、3,017 遺伝子の発現が有意に上昇した (図 5A)。PD 摂餌マウスにおいて発現が減少した遺伝 子について GO エンリッチメント解析を行った結果、免疫系の制御 (regulation of immune system process) や脂質代謝 (lipid metabolic process)、有機酸代謝 (organic acid metabolic process)、カルボン酸代謝 (organic acid metabolic process) に関連することが明らかにな った (図 5B,表 3A)。KEGG パスウェイ解析の結果、cytochrome P450 ファミリーを含む 代謝経路 (Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, Drug metabolism – cytochrome P450 など)が PD 摂餌マウスで抑制されることが示された (図 5C,表 3B)。回腸と同様 に、PD 摂餌マウスの十二指腸においても *Reg3b* および *Reg3g* の発現が減少していたが (図 5D)、これらの遺伝子の発現レベルは回腸 (図 4D) と比較して十二指腸では低かっ た。これらの結果から、PD は特に回腸において抗菌タンパク質の産生を抑制すること が示唆された。

4.3. PD は回腸において脂肪酸酸化とケトン体合成を誘導する

続いて PD 摂餌マウスで発現が増加した遺伝子について GO エンリッチメント解析 を行った結果、回腸上皮では脂質及び脂肪酸代謝に関連する遺伝子 (lipid metabolic process, fatty acid metabolic process など)の発現が著しく増加することが明らかになった (図 6A, 表 2C)。KEGG パスウェイ解析を行ったところ、レチノール代謝 (retinol metabolism) や脂肪酸分解 (fatty acid degradation)、peroxisome proliferator-activated receptor シグナル経路 (PPAR signaling pathway) などの代謝経路に関連する遺伝子群が PD 摂餌 により発現上昇することが示された (図 6B, 表 2D)。これらの遺伝子クラスターには、 PPARa やその標的分子である 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (HMGCS2), Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4), fatty acid binding protein 1 (FABP1) をそれぞれコ ードする遺伝子 (*Ppara*, *Hmgcs2*, *Pdk4*, *Fabp1* など) が含まれていた (表 2C, D)。同様に、 qPCR の結果、PD 摂餌マウスの回腸では *Ppara*, *Hmgcs2*, *Pdk4*, *Fabp1* の遺伝子発現が有 意に増加していた (図 6C)。また、PD 摂餌マウスでは HMGCS2, PDK4, FABP1 の発現が タンパク質レベルでも有意に増加していたが、PPARa の有意な変動は認められなかっ た (図 6D)。PPARa は核内受容体の一種であり、絶食などの低栄養状態において誘導さ れる。PPARa は PDK4 や FABP1、HMGCS2 などの発現を誘導することで、脂肪酸酸化 やケトン体合成を促進し、末梢組織中のエネルギー源を維持する機能を持つ^{50,51}。この ことから、PD 摂餌マウスの回腸では、脂肪酸酸化やケトン体合成が誘導されており、 絶食時と類似した代謝状態をとることが示唆された。

一方 PD 摂餌マウスの十二指腸で発現が増加した遺伝子について GO エンリッチメ ント解析を行った結果、シグナル伝達や分子機能、刺激応答 (regulation of signaling, regulation of molecular function, positive regulation of response to stimulus) などの制御に関 連することが明らかになった (図 7A,表 3C)。また、KEGG パスウェイ解析の結果、糖 質の消化吸収 (carbohydrate digestion and absorption) や、フルクトースおよびマンノース 代謝 (fructose and mannose metabolism)、解糖系/糖新生 (glycolysis/gluconeogenesis) など、 糖質代謝経路に関連する遺伝子クラスターの発現が上昇していた (図 7B,表 3D)。これ らの遺伝子クラスターには、Glucose transporter type 5 (GLUT5), aldolase 1A, retrogene 1 (Aldoart1), glucose-6-phosphatase catalytic subunit 1 (GP6C), aldolase, fructose-bisphosphate B (Aldob), and fructose 1,6-bisphosphate (FBP) をそれぞれコードする遺伝子である、*Slc2a5*, *Aldoart1, Gp6c, Aldob, Fbp1* が含まれていた (表 3D)。これらの分子は、腸管管腔内から腸管 上皮へのフルクトースの輸送およびその後の代謝を担っている³⁶。このことから、PD は十 二指腸上皮において糖質代謝を促進する可能性が考えられ、PD 摂餌は十二指腸と回腸で異 なる代謝状態を誘導することが示唆された。

4.4. PD は回腸において上皮フコシル化を誘導する

RNA-seq 解析のデータから、PD 摂餌マウスの回腸では腸上皮の糖鎖末端への α1,2-フコース転移酵素をコードする遺伝子である *fucosyltransferase 2 (Fut2)*の発現が有意 に低下 (0.095 倍) することが示された。さらに、杯細胞においてムチン *O*-結合型糖鎖 のフコシル化を誘導する酵素である *B3gnt7*⁵²の遺伝子発現が、PD 摂餌マウスで有意 に低下していた (0.43 倍)。腸上皮のフコシル化は、主に Fut1 および Fut2 によって制 御される ⁵³。Fut1 は恒常的に発現している一方、Fut2 は腸内細菌によって誘導される ことが知られている ⁵³。qPCR 解析の結果、CD 群と比較して、PD 群では *Fut2* の発現 が有意に減少していたが、*Fut1* の発現に有意な変化は認められなかった (図 8A)。そ こで、α1,2-フコースと特異的に反応するレクチンである Ulex europaeus agglutinin-1 (UEA-1)を用いて、PD 摂餌が腸上皮のフコシル化に及ぼす影響を調べた。CD 摂餌マ ウスでは絨毛上皮表面と、TFF3⁺杯細胞および lysozyme 陽性パネート細胞内の顆粒が いずれも UEA-1 陽性であり、先行研究と同様の染色像が得られた ^{54,55} (図 8B, C)。一 方、PD 摂餌マウスでは、パネート細胞は UEA-1 陽性であったが、絨毛上皮および杯 細胞は UEA-1 陰性であった (図 8C)。さらに、回腸上皮細胞のフローサイトメトリー 解析を行ったところ、CD 摂餌マウスに比べて、PD 摂餌マウスでは UEA-1⁺CD24⁻細 胞の割合が顕著に減少していた (図 8D)。しかしながら、UEA-1⁺CD24⁺細胞の割合に 有意な変動は認められなかった (図 8D)。CD24 はパネート細胞および腸内分泌細胞に 発現することが知られている ⁵⁶。これらの結果から、PD 摂餌は Fut2 の発現を抑制す ることで絨毛上皮細胞および杯細胞のフコシル化を抑制する一方、パネート細胞のフ コシル化には影響を与えないことが示唆された。

4.5. PD は腸内細菌叢を変動させる

続いて、PD 摂餌が腸内細菌叢に与える影響を、16S rRNA 遺伝子解析により検証し た。先行研究において、腸管内容物と粘膜層では異なる腸内細菌構成を持つことが報 告されている⁵。そのため回腸内容物および粘膜層を分けて採取し、解析を行なった。 本実験では、内容物を PBS で洗浄した後の回腸組織を破砕することにより、粘膜層か ら細菌ゲノム DNA を抽出した。その結果、PD 摂餌マウスの回腸内容物では腸内細菌 叢の多様性を示す指標である α 多様性 (Shannon index および Observed ASV) の変動を 認めなかったが (図 9A)、粘膜層では有意に増加していた (図 9B)。また、weighted UniFrac 距離に基づく主座標分析 (principal coordinate analysis: PCoA) により、個体間 のサンプルの多様性の相違度を表すβ多様性を解析したところ、腸管内容物 [p= 0.004 (PERMANOVA)] および粘膜層 [p = 0.003 (PERMANOVA)] の両者において、PD 摂餌による有意なβ多様性の変動が認められた (図 9C, D)。各腸内細菌の構成割合お よび LEfSe による各細菌の存在量の比較を細菌属レベルで行った結果、CD 摂餌マウ スの腸管内容物では Candidatus Arthromitus (通称 segmented filamentous bacteria: SFB) と 呼ばれる)が多く存在していたのに対し、PD 摂餌マウスでは Lactococcus や *Romboutsia, Turicibacter* が有意に増加していた (図 9E, G)。一方、粘膜層においては、 CD 摂餌群では SFB が優勢 (約 50-80%) であったのに対し、PD 摂餌群ではほとんど存 在せず、Lactobacillus や Romboutsia, Turicibacter, Bacteriodes, Bifidobacterium などの細 菌属が PD 群で有意に増加していた (図 9F, H)。走査型電子顕微鏡を用いて回腸粘膜を 観察した結果、CD 摂餌マウスでは上皮細胞表面に SFB が接着している様子が確認さ れた。一方、PD 摂餌マウスではほとんど観察されなかった (図 9I)。さらに、qPCR 法 により腸内細菌の総菌数を定量したところ、CD 摂餌マウスと比較し、PD 摂餌マウス の粘膜層において細菌数が有意に減少したが、腸管内容物においては有意な変動を認 めなかった (図 9J,K)。これらの結果から、PD 摂餌は回腸腸内細菌叢、特に粘膜細菌 叢に大きな影響を与えることが示唆された。

4.6. PD は回腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度に影響を与えない

腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸と乳酸は、腸上皮のターンオーバーを促進すること が報告されている^{19,21}。そこで、PD 摂餌が腸管内有機酸濃度に与える影響を検討した。 CD 摂餌マウスと比べ、PD 摂餌マウスの盲腸内容物中では酢酸および酪酸の濃度が有 意に減少していたが、プロピオン酸および乳酸の濃度は有意な変動を認めなかった(図 10A-D)。一方、回腸内容物中の酢酸、プロピオン酸、酪酸、および乳酸のいずれにおい ても両群で有意な差はなかった(図 10A-D)。したがって、PD 摂餌による回腸上皮ター ンオーバーの抑制は、管腔内の有機酸濃度の変化には起因しないと考えられた。

4.7. PD は SFB を減少させることで腸上皮の増殖とバリア機能を抑制する

SFB は回腸上皮のターンオーバー⁵⁷ やフコシル化¹²、抗菌タンパク質 REG3 γ ⁵⁸の産生 を誘導することにより、腸上皮のバリア機能を強化し、腸管感染症の発症リスクを抑制 する。そこで、PD 摂餌による SFB の減少が、腸上皮バリア機能抑制の原因であるか検 証するため、腸内細菌叢の異なる 2 つの生育場由来の BALB/c マウスにおいて PD 摂餌 が腸管恒常性に与える影響を検証した。これまでの実験では、日本クレア富士生育場由 来のマウス (以下、富士マウスと称する)を用いており、CD を摂餌させた富士マウス では回腸に SFB が多く定着している (図 9E-I)。一方三協ラボサービス引佐生育場由来 のマウス (以下、引佐マウスと称する)では CD 摂餌条件下においても SFB が存在しな い (図 11A)。weighted UniFrac 距離に基づく β 多様性の解析を行ったところ、腸管内容 物および粘膜層のいずれにおいても富士マウスと引佐マウスでは異なるクラスターを 構成しており、特に CD 摂餌条件下において顕著であった (図 11B, C)。引佐マウスにお ける各腸内細菌の構成割合の比較を細菌属レベルで行った結果、引佐マウスでは PD 摂 餌により桿菌 (Bacilli)の、*Faecalibaculum*の増加が見られた (図 11D, E)。また、富士 マウスと同様に、引佐マウスにおいても PD により粘膜層の総細菌数が有意に減少した (図 11F, G)。

続いて、SFB 存在下 (富士マウス) および非存在下 (引佐マウス) において、PD 摂 餌が腸上皮バリア機能に与える影響を比較した。その結果、富士マウスおよび引佐マ ウスいずれにおいても、CD 摂餌群に比べて PD 摂餌群において小腸の長さが短縮した が、体重には有意な変動を認めなかった (図 12A, B)。一方、クリプト長および EdU 標識細胞の移動距離は、富士マウスでは PD 摂餌により有意に減少したが、引佐マウ スでは PD 摂餌による影響は見られなかった (図 12C, D)。さらに、富士マウスに比べ て引佐マウスではクリプト長および EdU 標識細胞の移動距離が短く(図 12C, D)、引佐 マウスでは腸上皮のターンオーバーが遅いことが示唆された。UEA-1 によるレクチン 染色の結果、富士マウスの CD 摂餌群では絨毛上皮は UEA-1 陽性であったのに対し、 PD 摂餌群では UEA-1 陰性であった (図 12E)。一方、引佐マウスでは CD 摂餌群にお いても絨毛上皮は UEA-1 陰性であった (図 12E)。さらに、富士マウスでは PD 摂餌に より Fut2 の遺伝子発現が抑制されたのに対し、引佐マウスでは富士マウスに比べて Fut2 の発現が低く、PD 摂餌による変動は認められなかった (図 12F)。Reg3g の遺伝子 発現を比較したところ、富士マウスでは PD 摂餌により Reg3g の発現が有意に減少し たが、引佐マウスでは富士マウスに比べて Reg3g の発現が低く、PD 摂餌による変動は 認められなかった (図 12G)。これらの変化は粘膜層における SFB の存在割合 (図 11A) と挙動が合致していたことから、PD が SFB の定着を阻害することにより、回腸上皮 のターンオーバー、フコシル化、および抗菌タンパク質産生を抑制していると考えら れた。

SFB は回腸において 3 型自然リンパ球 (group 3 innate lymphoid cell: ILC3) からの IL-22 産生を誘導することにより、上皮細胞における Fut2 の発現を誘導する¹²。ま た、ILC3 が産生する IL-22 は、回腸上皮細胞に発現する転写因子 STAT3 のリン酸化を 促進することにより、REG3 γ の産生を誘導する⁵⁸。さらに、SFB は Th17 細胞分化を 誘導することにより、CD4⁺T 細胞における IL-22 産生を促進する⁵⁹。そこで PD 摂餌 が腸管免疫系に与える影響を、フローサイトメトリーにより検証した (図 13A)。その 結果、PD 摂餌マウスの回腸では、CD 摂餌マウスに比べて ILC3 が有意に減少してい た (図 13B)。また、PD 摂餌マウスでは IL-22 産生 CD3 ROR γ t⁺ 細胞 (ILC3) および IL-22 産生 CD3⁻ROR γ t⁻ 細胞の割合が有意に減少していた。さらに、イムノブロット の結果、PD 摂餌マウスの回腸上皮では、STAT3 のリン酸化が有意に抑制されていた (図 13D)。一方、PD 摂餌マウスでは Th17 細胞が有意に減少していたが (図 14A)、 Th17 細胞による IL-22 産生能は ILC と比較して非常に少なく、PD 摂餌による IL-22 産 生の変動は認められなかった (図 14B, C)。これらの結果から、PD 摂餌は回腸におけ る ILC からの IL-22 産生および STAT3 のリン酸化を抑制することが示唆された。

5. 考察

食事が腸管恒常性に与える影響については、これまで様々な研究により報告されて いる。しかし、これらの研究の多くは PD を用いたものであり、PD と CD の違いに着 目した研究は少なかった。一方、私は本研究において、PD 摂餌が腸内細菌叢を変動さ せることにより、回腸における上皮ターンオーバーやフコシル化、抗菌タンパク質の産 生を抑制することを明らかにした。また、PD 摂餌マウスの回腸上皮細胞では、PPARa シグナルが誘導され、脂肪酸酸化やケトン体合成が亢進することが明らかになった。こ れらの結果から、PD は CD とは大きく異なる腸内細菌構成と腸上皮細胞機能を誘導す ることが示唆された。

PD を摂餌させたマウスでは回腸上皮のターンオーバーが抑制されていたが、十二 指腸ではその差が小さかった。十二指腸に比べて回腸に多く腸内細菌が存在すること から ^{5,60}、PD 摂餌は腸内細菌叢の変動を介して腸上皮のターンオーバーを抑制してい る可能性が考えられた。腸内細菌は短鎖脂肪酸や乳酸などの有機酸を産生することに より、腸上皮のターンオーバーを促進することが知られている⁶¹。しかし、PD 摂餌に よる回腸管腔内の有機酸濃度の有意な変動は認められなかったことから、PD 摂餌は有 機酸非依存的に腸上皮のターンオーバーを抑制していると考えられた。一方本研究で は、PD 摂餌により回腸において SFB が著しく減少することを見出した。SFB はレチ ノイン酸を産生することにより、上皮細胞の増殖を促進する⁶²。レチノイン酸受容体 (retinoic acid receptor: RAR)の活性化は、一酸化窒素合成酵素 2 (Nos2)を誘導し、 *Citrobacter rodentium* による腸管感染を抑制する^{62,63}。また、SFB が産生するレチノイ ン酸は、腸上皮のターンオーバーを促進することでロタウイルスによる腸管感染リス クを抑制する^{57,62}。本研究で RNA-seq 解析を行った結果、PD 摂餌マウスの回腸上皮で は Nos2 の発現が有意に抑制される (0.13 倍) ことが明らかになった。また、SFB が存 在しない引佐マウスでは腸上皮のターンオーバーが遅く、PD 摂餌による腸上皮のター ンオーバーの抑制は認められなかった。そのため PD 摂餌は SFB の定着を抑制するこ とにより回腸上皮のターンオーバーを抑制していると考えられる。しかし、本研究で は十二指腸においても PD 摂餌マウスで EdU 標識細胞の移動距離が短縮することか ら、PD 摂餌は十二指腸においても上皮のターンオーバーを抑制する可能性が考えられ る。SFB は十二指腸には存在しないことから、そのメカニズムについては更なる検証 が必要である。

CD 摂餌条件下では、富士マウスに比べて引佐マウスにおいて小腸が有意に短縮していた。この原因の一部は、富士マウスの小腸には SFB が定着している一方、引佐マウスには定着していないことが関係していると推測される。また、富士マウスと同様に、引佐マウスにおいても PD 摂餌により小腸が有意に短縮していた。これは PD と CD の食物繊維の含有量の違いに起因している可能性がある。PD は CD に比べて水溶

性の食物繊維が少ない³²。食物繊維は栄養の消化吸収を遅らせる作用があり⁶⁴、栄養 吸収を促進するための適応反応として小腸が長くなることが報告されている^{65.66}。

PD 摂餌マウスでは、REG3γ をはじめとする抗菌タンパク質の産生が抑制されてい た。腸内細菌は、主に腸上皮において STAT3 シグナルまたは TLR-Myd88 シグナルを 活性化することによって抗菌タンパク質の産生を促進する^{6,67}。特に、SFB は回腸にお いて ILC3 からの IL-22 産生を誘導することにより、STAT3 のリン酸化を促進する⁵⁸。 RNA-seq 解析では、PD 摂餌による *Myd88* の遺伝子発現に有意な発現変動は認められ なかった。一方、PD 摂餌マウスにおいて ILC3 とその IL-22 産生、STAT3 のリン酸化 がいずれも有意に減少することが示された。また、富士マウスに比べ、引佐マウスで は *Reg3g* の遺伝子発現が有意に低下しており、PD 摂餌による有意な発現変動は認めら れなかった。これらの結果から、PD 摂餌は SFB を減少させることにより、回腸上皮 の STAT3 シグナルを低下させ、抗菌タンパク質産生を抑制することが示唆された。

UEA-1 レクチン染色により、CD 摂餌マウスの回腸上皮では絨毛上皮 (吸収上皮)、 杯細胞、およびパネート細胞がいずれもフコシル化されていることが示された。一方 PD 摂餌マウスでは、杯細胞と吸収上皮細胞のフコシル化が抑制されていたが、パネー ト細胞のフコシル化は維持されていた。これらの結果は、パネート細胞と他の腸上皮 細胞のフコシル化制御機構の違いによるものだと考えられる。パネート細胞のフコシ ル化は、Fut1 と Fut2 の両者によって誘導されるのに対し 54、絨毛上皮細胞では主に Fut2 により制御される。PD 摂餌マウスの回腸上皮では Fut2 が有意に抑制されていた が、Futl の発現に有意な変動は認められなかった。そのため、PD 摂餌マウスでは Fut2の抑制により吸収上皮細胞および杯細胞のフコシル化が抑制された一方で、Fut1 によりパネート細胞のフコシル化が維持されたと考えられる。Bacteroides や SFB な ど、一部の腸内細菌は腸上皮のフコシル化を誘導する^{12,68}。16S rRNA 遺伝子解析の結 果、PD 摂餌マウスでは Bacteroides は減少せず、むしろ粘膜層において増加すること が示された。一方、PD 摂餌マウスの回腸では SFB が顕著に減少していた。SFB は ILC3 からの IL-22 産生を促進することにより、回腸上皮のフコシル化を誘導する¹²。 また、IL-22 は STAT3 を活性化することにより、Fut2 および B3GNT7 の発現を誘導す る。RNA-seq 解析の結果、PD 摂餌マウスの回腸上皮では、Fut2 及び B3gnt7 の両者の 発現が抑制されていた。さらに、PD 摂餌マウスでは STAT3 のリン酸化が抑制されて いた。これらの結果から、PD 摂餌により SFB が減少し、ILC3 - IL-22 - STAT3 シグナ ルが抑制されることにより、回腸上皮のフコシル化が抑制されたと考えられる。

ILC3 による IL-22 産生が腸上皮幹細胞および上皮細胞増殖に与える影響について は、複数の論文により報告されている。例えば ILC3 欠損 Lgr5 レポーターマウスで は、メトトレキサート誘発性消化管傷害モデルにおいて、Lgr5⁺ 幹細胞の数が有意に 減少することが示されている⁶⁹。また、IL-22 添加により小腸オルガノイド上の Lgr5-GFP^{high} 幹細胞数が増加し、オルガノイドの増殖が促進される⁷⁰。同様に、IL-22 投与

23

は、移植片対宿主病 (GVHD) モデルマウスにおいて、Lgr5⁺ 幹細胞の再生と上皮増殖 を促進させる⁷⁰。対照的に、IL-22 は腸オルガノイドの成長を促進する一方で、Lgr5⁺ 幹細胞数を減少させることが示されている^{71,72}。同様に、*in vivo* における IL-22 の投与 は、Wnt および Notch シグナル伝達を阻害することにより、Lgr5⁺ 幹細胞数を減少さ せる⁷¹。このように、腸管幹細胞形成における IL-22 の役割については、様々な見解 が存在する。一方本研究では、PD 摂餌が ILC による IL-22 産生を有意に減少させ、 Lgr5⁺ 幹細胞の数に影響を与えることなく上皮細胞のターンオーバーを減少させるこ とを見出した。IL-22 の受容体である IL-22Ral が transient-amplifying (TA) 前駆細胞に 発現しており、IL-22 が TA 細胞の増殖を促進することから⁷²、PD 飼育マウスにおけ る上皮細胞のターンオーバーの減少は、IL-22 の減少による TA 細胞の増殖減少に起因 していると考えられる。

PD 摂餌マウスの回腸では、PPARα およびその標的分子の発現が著しく上昇してい た。PPARα シグナルは、絶食により主に肝臓において活性化され、脂肪酸のβ酸化お よびケトン体合成を促進する⁵⁰。近年の研究により、絶食による PPARα シグナルの活 性化は、肝臓だけでなく小腸においても認められ、絶食マウスの腸上皮細胞では HMGCS2 や PDK4、FABP1 などの PPARα 標的分子の発現が誘導される⁵¹。本研究で は、PD 摂餌マウスの回腸上皮において、これらの PPARα 標的分子の発現が有意に上 昇することが明らかになった。HMGCS2 はケトン体合成の律速酵素であり、アセチル CoA 及びアセトアセチル CoA を、HMG-CoA 及び CoA に変換する機能を持つ^{50,73}。 PDK4 は、解糖系により生じたピルビン酸からアセチル CoA への合成を阻害すること により、細胞内のエネルギー源を糖質から脂質へと変換する機能を持つ⁷⁴。FABP1 は 肝臓や腸上皮細胞において高く発現しており、脂肪酸の取り込みや側基底面への分泌 機能を持つ細胞内タンパク質である^{75,76}。また、FABP1 は PPARα とヘテロダイマーを 形成し、その転写活性を亢進させる⁷⁷。このことから、PD 摂餌は回腸上皮において脂 肪酸酸化やケトン体合成を亢進させ、絶食マウスと類似する代謝状態を誘導すること が示唆された。先行研究において、短期間 (12 時間) の絶食は、SFB を減少させるこ とにより REG3γ をはじめとする抗菌タンパク質の産生を抑制することが報告されてい る⁵⁸。本研究では、PD 摂餌により SFB が減少し、腸上皮のターンオーバーやフコシ ル化、抗菌タンパク質産生が抑制されることを明らかにした。これらの結果から、PD 摂餌は回腸粘膜層においても絶食マウスと類似した腸内細菌構成を誘導することを示 唆している。一方、RNA-seq 解析の結果、PD 摂餌マウスの十二指腸上皮では糖質・炭 水化物の代謝に関連する遺伝子の発現が亢進しており、十二指腸上皮が炭水化物を主 なエネルギー源として利用していることが示唆された。そのため PD に含有される栄 養素、特に炭水化物の多くが回腸に到達する前に小腸上部で消化吸収され、回腸が低 栄養状態に陥っていると推測される。SFB の回腸上皮への定着は絶食により抑制され ることから、SFB の増殖には食事による回腸への十分な栄養供給が必須であると示唆

される。したがって、PD 摂餌マウスでは回腸管腔内が低栄養状態になったことにより、SFB の増殖が阻害された可能性が考えられる。

本研究では、PD 摂餌により SFB の減少をはじめとする腸内細菌叢の変化を誘導 し、回腸上皮のターンオーバーやフコシル化、抗菌タンパク質産生をはじめとする腸 上皮細胞機能が抑制されることを見出した (図 15)。また、PD 摂餌により回腸上皮に おいて PPARa シグナルが活性化され、脂肪酸酸化やケトン体合成が促進されることが 明らかになった。このことから、PD を実験に使用する際は、腸管恒常性に与える影響 を十分考慮する必要があると言える。今後、腸管恒常性の維持に重要な栄養素を明ら かにすることで、より最適な精製飼料の提案に繋がると期待できる。

図・表 6.



256250

X 1. Purified diet (PD) attenuates epithelial proliferation and turnover in the ileum. Three-week-old mice were fed crude diet (CD) or PD for 3 week and the small intestine was analyzed. (A, B) Food intake (A) and calorie intake (B) CD- and BD- fed to a n = 1 (4-6 mice/cage). (C) Body weights. $n \ge 13$ mice per group. (D) Length of the small mestine of the and CD-fed mice are shown. Images of the $\frac{1}{1000}$ $\frac{1}{1000}$ μ m (top) or 100 μ m (bottom). *n* ≥ 80 crypt regions from 4 individual make per group were analyzed for crypt depth. $n \geq 60$ villi regions from 4 individual mice per group for villus length. (FPImminonofluorescence images of Ki67 in the ileal crypts. Ki67+ cells only in the epithelial monolayer in the crypt region were counted. The green staining merged with nuclei was recognized as the specific signal. Scale bars: 50 μ m. $n \ge 35$ crypt regions from 4 individual mice per group were analyzed. (G) Representative images of EdU fluorescence and distance from the crypt base to the farthest EdU-labeled cells. Scale bars: 100 μ m. $n \ge 30$ crypt-villus regions from 3 individual mice per group were analyzed. The data represent the mean \pm SD. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. pvalues were determined by unpaired t-test (C, D) or Mann-Whitney test (E-G). CD: crude diet, PD: purified diet.



🗵 2. The impacts of PD on the duodenal epithelium

(A) Representative images of hematoxylin and eosin (H&E)-staining and crypt depth and villus length of the duodenum. Images of the Swiss roll-like sections (top) and ileal epithelium (bottom). Scale bars: 2,000 μ m (top) or 100 μ m (bottom). $n \ge 25$ crypt regions from 4 individual mice per group were analyzed for crypt depth. $n \ge 60$ villi regions from 4 individual mice per group were analyzed for villus length. (B) Representative immunofluorescent images of Ki67 and the number of Ki67⁺ cells in the duodenal crypts. Scale bars: 50 μ m. $n \ge 35$ crypt regions from 4 individual mice per group were analyzed. (C) Representative images of EdU and distance from the crypt base to the farthest EdU-labeled cells in the duodenum. Scale bars: 100 μ m. $n \ge 35$ crypt-villi regions from 3 individual mice per group were analyzed. (D) The fluorescent intensity of FITC-dextran was measured in the plasma after feeding CD or PD for three weeks. The data represent the mean \pm SD. The data represent the mean \pm SD. ***p < 0.001, ****p < 0.0001. p values were determined by unpaired *t*-test (A, B, D) or Mann-Whitney test (A, C). CD: crude diet, PD: purified diet.



🗵 3. The effect of PD-feeding on the epithelial differentiation in the ileum.

(A) Representative immunofluorescence images of TFF3 and number of TFF3⁺ cells per ileal villus. Scale bars: 100 μ m. $n \ge 35$ villi regions from 4 individual mice per group were analyzed. (B) Immunofluorescence images of lysozyme and the number of lysozyme⁺ cells per crypt. Scale bars: 50 μ m. $n \ge 30$ crypt regions from 4 individual mice per group were analyzed. (C) Fluorescent images of Lgr5 and number of Lgr5⁺ cells per ileal crypt. Scale bars: 100 μ m. $n \ge 35$ crypt regions from 4 individual mice per group were analyzed. (C) Fluorescent images of Lgr5 and number of Lgr5⁺ cells per ileal crypt. Scale bars: 100 μ m. $n \ge 35$ crypt regions from 4 individual mice per group were analyzed. The data represent the mean \pm SD. ***p < 0.001. p values were determined by unpaired *t*-test. CD: crude diet, PD: purified diet.



図 4. Impact of PD on the gene expression pattern in the ileal epithelium.

Volcano plots comparing the ileal epithelium of CD- versus PD-fed mice based on RNA-sequencing data. n = 6. Genes up- or downregulated (Log₂(fold change) > 1 or q < 0.05) are highlighted. (B, C) Gene ontology (GO) enrichment (B) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analyses (C) of downregulated genes in PD-fed mice. The 20 most significant GO terms are represented in the accompanying bubble plot. Bubble colors represent -log10 (*p* values). Bubble sizes indicate fold enrichment. (D) Relative mRNA expression of *Reg3b*, *Reg3g*, and *Lyz1* in the ileal epithelium of CD- and PD-fed mice. n = 4 mice per group. (E) Representative immunoblot of the ileal epithelium from CD- and PD-fed mice for detecting REG3 γ and β -actin (loading control). Band intensities were measured using densitometry. n = 4 mice per group. The data represent the mean \pm SD. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. *p* values were determined by unpaired *t*-test (D) or Mann-Whitney test (E). CD: crude diet, PD: purified diet.



🗵 5. Global changes of gene expression and downregulated genes by PD in the duodenal epithelium.

(A) Volcano plots for the comparison of duodenal epithelium from CD- versus PD-fed mice based on RNAsequencing data. n = 6. Genes up- or down-regulated (Log₂(fold change) > 1 or q < 0.05) are highlighted. (B, C) GO enrichment analysis (B) and KEGG pathway analysis (C) of downregulated genes in PD-fed mice. The 20 most significant GO terms are represented in the accompanying bubble plot. Bubble colors represent $-\log_{10}$ (p values). Bubble sizes indicate fold enrichment. (D) Relative mRNA expression of *Reg3b* and *Reg3g* in the duodenal epithelium from CD- and PD-fed mice. n = 4 mice per group. The data represent the mean \pm SD. *p< 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. p values were determined by Mann-Whitney test (D). CD: crude diet, PD: purified diet.





☑ 6. PD feeding induces fatty acid oxidation and ketogenesis in the ileal epithelium.

(A, B) GO enrichment (A) and KEGG pathway analyses (B) of upregulated genes in PD-fed mice. The 20 most significant GO terms are represented in the accompanying bubble plot. Bubble colors represent -log10 (*p* values). Bubble sizes indicate fold enrichment. (C) Relative mRNA expression of *Ppara*, *Hmgcs2*, *Pdk4*, and *Fabp1* in the ileal epithelium of CD- and PD-fed mice. n = 4 mice per group. (D) Representative immunoblots of the ileal epithelium of CD- and PD-fed mice, with detection of HMGCS2, PDK4, PPAR α , FABP1, and β -actin (loading control). Band intensities were measured using densitometry. n = 4 mice per group. The data represent the mean \pm SD. *p < 0.05. *p* values were determined by Mann-Whitney test (C, D). CD: crude diet, PD: purified diet.

A upregulated in PD



図 7. Upregulated genes by PD in the duodenal epithelium

(A, B) GO enrichment analysis (A) and KEGG pathway analysis (B) of upregulated genes in PD-fed mice. The 20 most significant GO terms are represented in the accompanying bubble plot. Bubble colors represent – $\log_{10}(p \text{ values})$. Bubble sizes indicate fold enrichment.



☑ 8. PD suppresses epithelial fucosylation in the ileum.

(A) Relative mRNA expression of *Fut1* and *Fut2* in the ileal epithelium of CD- and PD-fed mice. n > 3 mice per group. (B) Top: Immunofluorescent images of TFF3 and UEA-1 in the villus region. Scale bars: 10 µm. Lower: Immunofluorescent images of lysozyme and UEA-1 in the crypt region. Scale bars: 40 µm. (C) Immunofluorescent images of TFF3 and UEA-1 in the ileum of CD- and PD-fed mice. Scale bar = 100 µm. (D) Representative plots of flow cytometry and percentage of UEA-1⁺CD24⁺ and UEA-1⁺CD24⁺ cell subsets in the ileum of CD- and PD-fed mice. n = 4 mice per group. The data represent the mean \pm SD. **p < 0.01. pvalues were determined by unpaired *t*-test (A) or Mann-Whitney test (D). CD: crude diet, PD: purified diet.



I 9. PD alters the gut microbiota in the ileum.

(A, B) α -diversities (Shannon index and observed ASVs) of the microbiota in the ileal contents (A) and ileal mucus layer (B) in CD- and PD-fed mice. (C, D) Principal coordinate analysis of weighted UniFrac distances between microbiota in the ileal contents (C) and ileal mucus layer (D). (E, F) Composition of the microbiota at the genus level in the ileal contents (E) and ileal mucus layers (F). (G, H) Discriminating taxa between CD- and PD-fed mice in the ileal contents (G) and ileal mucus layer (H) as determined using LEfSe analysis. (I) Scanning electron microscopy of the ileal villi from CD- or PD-fed mice. (J, K) The total bacterial load in the ileal contents (I) and ileal mucus layer (J) was analyzed using qPCR for the 16S rRNA V3-V4 region. The data represent the mean \pm SD. *p < 0.05, **p < 0.01. p values were determined by unpaired *t*-test (J) or Mann-Whitney test (A, B, K). CD: crude diet, PD: purified diet.



\boxtimes 10. The effect of PD on luminal concentration of organic acids.

Amounts of organic acids in the small intestinal and cecal contents from CD- and PD-fed mice were measured by GC-MS. (A-D) Concentrations of Acetate (A), Propionate (B), Butyrate (C), and Lactate (D). n > 4 mice per group. The data represent the mean \pm SD. **p < 0.01, ***p < 0.001. p values were determined by two-way ANOVA followed by Šídák's multiple comparison test. CD: crude diet, PD: purified diet.



☑ 11. Gut microbiota changes in Inasa mice

(A) Relative abundance of SFB in the ileal mucus layers of Fuji and Inasa mice. (B, C) Principal component analysis of weighted UniFrac distances among the microbiota in the ileal contents (B) and ileal mucus layer (C). (D, E) Bacterial composition of the microbiota at the genus level in the ileal contents (D) and ileal mucus layer (E). (F, G) The total bacterial load in the ileal contents (F) and ileal mucus layer (G) was analyzed by qPCR using universal primers for the 16S rRNA V3-V4 region. The data represent the mean \pm SD. ***p < 0.001, ****p < 0.0001. p values were determined by one-way ANOVA followed by Kruskal-Wallis test (A), or unpaired *t*-test (F, G). CD: crude diet, PD: purified diet.



⊠ 12. PD affects intestinal turnover and barrier functions by reducing segmented filamentous bacteria. The effect of PD on epithelial turnover and functions in the ileal epithelium was investigated in mice from two vendors: Fuji and Inasa. (A) Body weight, $n \ge 10$ mice per group. (B) Small intestine length, $n \ge 10$ mice per group. (C) Crypt depth, $n \ge 40$ crypt regions from 4 individual mice per group were analyzed. (D) Representative images of EdU fluorescence and distance from the crypt base to the farthest EdU-labeled cells. Scale bars: 100 µm. $n \ge 30$ crypt-villi regions from 3 individual mice per group were analyzed. (E) Immunofluorescent images of UEA-1 in the ileum. Scale bars: 100 µm. (F, G) Relative mRNA expression of *Fut2* (F) and *Reg3g* (G) in the ileal epithelium of CD- and PD-fed mice. n = 4 mice per group. p values were determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (A, C, G) or Kruskal-Wallis test (B, D, F). CD: crude diet, PD: purified diet. ns: not significant.



⊠ 13. PD reduced IL-22 production from ILCs and phosphorylation of STAT3 in the ileum. (A) Gating strategy of ILCs and Th17 cells. Linage: CD8α, CD11c, B220, F4/80. (B) The number of ILC3 (RORγt⁺ CD3ε⁻linage⁻ cells). $n \ge 5$ mice per group. (C) Representative flow cytometry plots of IL-22 and RORγt gated on CD3ε⁻linage⁻ cells (top) and percentage of IL-22⁺RORγt⁺ cells and IL-22⁺RORγt⁻ cell in CD3ε⁻linage⁻ cells. $n \ge 5$ mice per group. (E) Representative immunoblot of the ileal epithelium in CD- and PD-fed Fuji mice, with detection of pSTAT3 and STAT3. n = 4 mice per group. *p < 0.05, **p < 0.01. pvalues were determined by unpaired *t*-test (B, C) or Mann-Whitney test (D).



☑ 14. PD decreased Th17 cells in the ileum.

(A) Representative flow cytometry plots of Th17 cells ($ROR\gamma t^+Foxp3^-$ cells) gated on CD4⁺ T ($CD3\varepsilon^+CD4^+$ cells). (B) Representative flow cytometry plots of IL-22 and $ROR\gamma t$ gated on $CD3^+CD4^+$ cells.(C) Percentage of IL-22⁺ in ILCs ($CD3\varepsilon^-linage^-$) cells and $CD4^+T$ ($CD3\varepsilon^+CD4^+$ cells). CD: crude diet, PD: purified diet. *p* values were determined by Mann-Whitney test (A) or two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (C). CD: crude diet, PD: purified diet. ns: not significant.





Diet	CD*	PD
Protein (gm%)	25.05	20
Fat (gm%)	4.77	7
Carbohydrate (gm%)	49.82 (Nitrogen Free Extract)	64
kcal/gm	3.424	4

* 2022年 定期分析平均值

表 1. Nutritional formula of CD and PD

A) The 20 most significant (Category	30 terms downregulated in the ileum of PD-fed mid GO Term	ce Count	PValue	Genes
GOTERM_BP_FAT	immune response	99	1.70E-29	LIGHZA, GIMAP3, SLA2, IFI44L, C4B, LGALS3, DMBT1, TRBC2, ZC3H12A, CD177, HERC6, ZBP1, CD96, GBP7, PRKCH, SP110, TAP1, IRT1181, JUNC130, IGHC28, CD84, IGTP, CD225, TRIMI5, SH2D181, SKAP1, ID01, REG3B, CD274, NLR74, CFI, H2-4M, DLG25, REG3G, COOR1A, C2, H2-4, DLB0, STGGALL, OPR17, H2-4B1, DEFA5, IRGM2, NKG7, IIGP1, IL7, KLRD1, H2-AB1, PIGR, CXCL9, GITA, CD36, CD36, CD30, IL18BP, DEFA41, CASP4, INKRIZ, IGLC3, CD38, MBL2, APOBEC3, GRPX, UMP7, DEFA36, DEFA43, TLR11, LA172, ZAP70, LC4X, DC4X, TLR2, SASH3, SLFN2, H2-DMA, WAS, MPTX2, CAPG, NDD1, CXCR6, USP18, CCL5, H2-DMB1, SERPINBBB, GBP2, GBP4, CO74, CD209B, PL4220D, GBP5, NOS2, TRAT1, CASP4, ISA51, IL27B, CO7, CD247, CCL28
GOTERM_BP_FAT	regulation of immune system process	88	5.38E-27	PIGR, GIMAP3, CD3E, SLA2, ETS1, C4B, LGALS3, TRBC2, CASP3, CASP4, ZC3H12A, NFKBIZ, IGLC3, CD38, CD177, MBL2, ZBP1, CD86, APOBEC3, GP2, GBP7, PRKCH, ITGA4, TAP1, RHOH, IFTTIBL1, UNC13D, TLR1, LAT2, IGHC42B, ZAP70, LCK, CD8A, IGTP, PFECAM1, CD52E, TRIMIS, SH2D1B1, HCST, SKAP1, TLR2, LD01, SASH3, CD274, NLRX1, H2-DMA, H2-M3, 573050701FIK, CFI, WAS, DTX1, MPTX2, NOD1, PLA2GS, FEG3G, IL2R6, USP18, CORD14, C2, CNN2, H2-EA, THPO, H2-MB1, CC1S, SKAP1NBB9, GBP2, GBP4, CD74, CARR2, GPR17, GBP28, CD209B, PLA2C2D, H2-EB1, CDNR2A, TRAT1, TNFRSF9, GPR55, IRGM2, H2-AA, IL7, CEACAM10, KLRD1, CD274, CCL28, KLRH1, LGMN, H2-AB1
GOTERM_BP_FAT	response to biotic stimulus	80	7.55E-25	FITM3, CXCL9, IF44L, DEFA41, LGALS3, DMBT1, RGS1, TRBC2, CASP3, CASP4, ZC3H12A, NFKBIZ, CAPN2, (BLC3, MBL2, HERG6, ZBP1, CDS2, CD96, APOBECS, GPV2, GBP7, MMP7, SP110, ATG10, DEFA36, PLAAT3, SLC30A1, DEFA34, IFTH1B1, LYPDBL, UNC13D, LTH1, IGHC2B, TIC39AOS1, CD84, IGTP, CD226, TRMH5, LYGA, TLR2, ID01, REG3B, CD274, NLRX1, SLFN2, SAA3, H2-M3, NOD1, PLA2G5, REG3G, USP18, C2, CCL5, SEPRIMB8, GBP2, GBP4, DUOX2, GSTM3, GBP26, CD208, NOS2, 1810065E05RK, SLC1042, GZMA, DEFA5, IRGM2, GZMB, NKG7, AA467197, B3GALT5, LSM5, IIGP1, ASS1, PSMB9, LRG1, GSTA1, SAA1, CCL28, KLRH1
GOTERM_BP_FAT	response to other organism	78	1.30E-24	IFTM3, CXCL9, IFI44L, DEFA41, LGALS3, DMBT1, RGS1, TRBC2, CASP3, CASP4, ZC3H12A, NFKBIZ, CAPN2, IGLC3, MBL2, HERC6, ZBP1, CD52, CD96, APOBEC3, GPX2, GBP7, MMP7, SP110, DEFA36, PLAAT3, SLC30A1, DEFA34, IFT18L1, LYPDBL, UNC130, TLAH, IGHC28, TTC39AOGS1, CD8A, IGFP, TRIMT5, LY6A, TLR2, ID01, REC3B, CD274, NLFX1, SLFN2, SAA3, H2-M3, NOD1, PLA2G5, REC3G, USP18, C2, CCL5, SERPINB98, GBP2, GBP4, DUX2, SCFM3, GBP28, DC2089, NO22, I 8100665D671K, SLC10A2, C3MA, DEFA5, IRGM2, GZMB, NKG7, AA467197, B3GALT5, LSM5, IIGP1, ASS1, PSMB9, LRG1, GSTA1, SAA1, CCL28, KLRH1
GOTERM_BP_FAT	response to external biotic stimulus	78	1.52E-24	IFITM3, CXCL9, IFI44L, DEFA41, LGALS3, DMBT1, RGS1, TRBC2, CASP3, CASP4, ZC3H12A, NFKBIZ, CAPN2, IGLC3, MBL2, HERO6, ZBP1, CD52, CD96, APOBEC3, GPX2, GBP7, MMP7, SP110, DEFA36, PLAAT3, SLC30A1, DEFA34, IFITL11, LYPDBL, UNC130, TLR1, IGHC2B, TC39A0OS, OEA, IGTP, THIM5, LY6A, TLR2, IDO1, REG3B, CD274, NLFX1, SLFN2, SAA3, H2-M3, NOD1, PLA2G5, REG3G, USP18, C2, CCL5, SERPINB9B, GBP2, GBP4, DUO2, GSTM3, GBP2B, CD208B, NOS2, 1810065E05IRK, SLC10A2, C3MA, DEFA5, IRGM2, GZMB, NKG7, AA467197, B3GALT5, LSM5, IIGP1, ASS1, PSMB9, LRG1, GSTA1, SAA1, CCL28, KLRH1
GOTERM_BP_FAT	defense response	87	1.88E-23	IFTM3, CXC19, CIITA, GIMAP3, ET51, IF441, DEFA1, C4B, LGALS3, DMET1, TBEC2, CASP4, ZC3H12A, NFK90Z, DUXXX2, CLC3, CD177, MB2, ZHEC5, ZB1C, LGB8, APOBEC3, DFX, GBP7, MMP7, SP110, DEFA58, TAP1, SLC30A1, DEFA34, IFTH IB1, JUNC130, TLP1, IGHC2B, ZAP70, TTCS3AOS1, LCK, CD8A, IGT7, CD228, TFMIH5, SH20151, TLF2, ID01, FEG3B, NLEXT, IAXNA, SAA, 12-XA, CF1, WAS, MF72C, CAP6, NIOT, CXCR6, PLA2G5, FEG3G, USP18, COR01A, C2, NT5E, UBD, CCL5, SERPINB9B, GBP2, GME431, GBP4, DUOX2, C074, GPH17, GBP2B, PLA2G2D, H2-E31, NOS2, DEFA5, IRGM2, GZMB, NKG7, IF147, H2-AA, IIGP1, ASS1, ALOXSAP, SAA1, KLR01, KLH71, H2-AB1
GOTERM_BP_FAT	response to external stimulus	110	2.54E-23	FITMS, ETS1, IFA4L, LSALSS, DMETT, RBS1, TBBC2, ZOSH12A, DUOXA2, CAPN2, HEROG, ZBP1, CDB9, GBP7, PRKCH, SP110, SLC30A1, IFTTBL1, UNC13D, IGHC2B, HOXB9, TTC39AOS1, BN2, CDBA, IGTP, TRIMTS, LYGA, IDO1, REG3B, CD274, NLPX1, ARVA, CFI, H2-MA, PLA2GS, REG3G, CORO1A, C2, CNN2, SLC38A, GSTM3, GPR17, OPN3, 181006505RIK, SLC10A2, DEFAS, IRGM2, MTHFR, NKG7, ASNS, AA467197, B3GALT5, LSM5, INEP1, BGLAP3, LGM4, CXL2D, CD8D, DEFA41, C10TNF1, CASP3, CASP4, NRFB2, IGL03, UPP1, MB2, CD52, APOBECS, GPX2, MMF7, DEFA86, RHOH, PLAAT3, DEFA34, LYPD6L, TLR1, TMIGD1, LCK, DOCK2, TLR2, SLFN2, SAA3, NOD1, CKR6, USP1, B17TE, CCL5, SLTIRKS, SEPRIMBER, GP2, GBP4, OLV02, CD74, C0208B, PLA2G2D, GBP2B, NOS2, GZMA, PDX1, GZMB, BMP8B, SUOX, ASS1, PSMB9, LRG1, GSTA1, ALOXSAP, SAA1, CIC28, KLFH1
GOTERM_BP_FAT	regulation of immune response	63	5.58E-22	PGR GIMAP3, CD55, SL42, C48, LGALS3, TEBC2, CASPA, ZC3H12A, JNFRBZ, IGLC3, CD58, CD177, MEL2, ZBP1, C056, GPP2, GBP7, PRKCH, TAP1, UIXC130, TLR1, LAT2, IGHG2B, ZAP70, LCK, CD8A, IGTP, ICD236, TRIMIT5, SH220151, HCST, SKAPT, TLR2, IDD1, SASH5, C0274, NLFX1, Hz, DMA, H2-MA, CFI, WAS, JMFTX2, MD1, PLA2G5, FEG3G, USP18, C2, H2-GA, H2-DM51, SEPFIN58B, GBP2, CD74, GPR17, GBP2B, PLA2G2D, H2-EB1, TRAT1, IRGM2, H2-A4, NLRD1, CD247, H2-A51
GOTERM_BP_FAT	response to bacterium	63	8.46E-21	CXCL9, DEFA41, DMET1, RGS1, TERC2, CASP3, CASP4, ZC3H12A, NF-RB2, CAFP4, [GLC3, MBL2, HEFC6, COS2, COS6, GP24, GBP7, MMP7, SP110, DEFA68, PLAAT3, SLC30A1, DEFA34, LYPBG1, LTH, IGHCB8, TICS3AOS1, IGTP, LY6A, TLP2, IDO1, REG3B, CD274, SLFN2, SAA3, H2-M3, NOD1, REG3G, USP18, C2, CCL5, SEPPINB9B, GBP2, GBP4, GSTM3, GBP28, CD2069B, NOS2, H10056EDSR1K, SLC10A2, GZMA, DEFA5, IRGM2, GZMB, AA467197, B3GALT5, LSM5, IIGP1, ASS1, PSMB9, LRG1, GSTA1, SAA1
GOTERM_BP_FAT	innate immune response	62	1.18E-20	IFTIM3. CIITA, GIMAP3. DEFA41, C4B, LGALS3, TBRC2, CASP4, NFKBIZ, ELC3, CD177, MBL2, HERC6, ZBP1, C068, APOBECS, GBP7, SP110, DEFA36, TAP1, DEFA34, IFTIFILIA, UNC130, TLR1, GHC82, A2P70, LCK, IGTP, CD226, FINIH5, SH2D1B1, TLR2, NLRXH, H2:M3, CFI, WAS, MPTX2, CAPG, NOD1, PLA2GS, REG3G, USP18, CORO14, C2, UBD, CCL5, SEPRIN989, GBP2, GBP4, CD74, GBP2B, H2-EB1, NOS2, DEFA5, IRGM2, GZMB, NKG7, H2:AA, IIGP1, ASS1, KLRD1, H2-AB1
GOTERM_BP_FAT	positive regulation of immune system process	66	1.55E-20	GIMAPS, CDSE, SLA2, ETS1, C4B, LGALS3, TFBC2, CASP4, ZC3H12A, NFKBIZ, IGLC3, CDSB, CD177, MBL2, ZBP1, GBP7, PRKCH, TGA4, RHOH, UNC13D, TLH1, LAT2, IGH2B2, ZAP70, LCK, CDSB, IGTP, PECAMI, CD282, FTIIMTS, SH2D1B1, SKAP1, TLP2, IDO1, SASH3, CD274, NLRX1, H2-OMA, H2-M3, CFI, MPTX2, NOD1, PLA2G5, REG3G, LI2RG, COROTA, C2, H2-EX, THPO, H2-DMB1, CL5, GBP2, CD74, CAR2, GBP2B, CD209B, H2-EB1, TRAT1, IRGM2, H2-AA, IL7, KLRD1, CD247, KLRH1, LGMN, H2-AB1
GOTERM_BP_FAT	leukocyte cell-cell adhesion	39	1.67E-18	SASH3, C0274, SELPLG, H2-OMA, GIMAP3, DTX1, PLA2G5, C03E, IL2RG, CORO1A, ETS1, LGALS3, NZ-EA, NT5E, CASP3, CCL5, H2-OMB1, ZCGH12A, NFKBIZ, C0177, C074, PLA2G2D, C020B, H2-EB1, TIGA4, CDKN2A, TNFRSF9, RHOH, H2-AA, ASS1, ZAP70, LBG1, IL7, LCK, PECAM1, CCL28, SKAP1, H2-AB1, IDO1
GOTERM_BP_FAT	positive regulation of immune response	52	3.41E-18	GIMAP3, CD8E, SLA2, CAB, LGALS3, TREC2, CASP4, ZC3H12A, NFKBZ, (GLC3, CD38, CD177, MBL2, ZBP1, GBP7, PRKCH, TLH1, LAT2, IGHC2B, ZAP70, LCK, CD8A, IGTP, CD226, TRIM15, SH2D1B1, SKAP1, TLP2, IDO1, SASH3, CD274, NLEX1, H2-DMA, H2-M3, CF, IMTTX2, NOD1, PLA2G5, REG3G, C2, H2-EA, H2-DMB1, GBP2, CD74, GBP2B, H2-EB1, TRAT1, IRGM2, H2-AA, KLRD1, CD247, H2-AB1
GOTERM_BP_FAT	immune effector process	55	1.42E-16	(FITMS, CXC19, GIMAP3, IF44L, C4B, LGALS3, TBEC2, CASP4, ZC3H12A, NFKBIZ, IGLC3, CD177, MEL2, ZBP1, CD96, APOBEC3, GBP7, TAP1, IFIT1BL1, UNC13D, LAT2, IGHC2B, CD8A, IGTP, CD226, TRIMI5, SH2D1B1, DOCK2, TLR2, SASH3, NLRXI, SLFN2, H2-DMA, H2-M3, CFI, WAS, MPTX2, NOD1, PLA2G5, COF0A1, C2, H2-EA, H2-DMB1, CCL5, SERPINB9B, ST3GAL1, GBP4, CD74, GBP2B, IRGM2, GZMB, NKG7, IL2RB, KLRD1, H2-AB1
GOTERM_BP_FAT	regulation of leukocyte cell-cell adhesion	34	2.12E-15	SASH3, C0274, H2-DMA, GIMAP3, DTX1, PLA2G5, CD8E, IL2RG, CORD1A, ET51, LGALS3, H2-EA, CASP3, CCL5, H2-DMB1, ZC3H12A, NFKBIZ, CD74, PLA2G2D, CD209B, H2-EB1, ITGA4, CDKN2A, TNFRSF9, RHOH, H2-AA, AS51, ZAF70, IL7, ILCK, CCL2B, SKAP1, H2-AB1, IDD1
GOTERM_BP_FAT	leukocyte activation	57	2.81E-15	GMM493 (D96, C05E; 51.42, CD9D, LGALS3, TREC2, CASP3, 2C0H12A, INFKBZ, (ELC3, CD88, CD177, FHOH), MUC10J, TL11, LAT7, IGHC2B, 2AP70, LCK, CD84, IGFP, LY80, CD228, SH201BF, DOCKX, TLE2, D01, SASH3, C0274, SELPLG, SLFN2, H2-DMA, H2-M3, WAS, DTX1, PLA2GS, IL2RG, CORO1A, H2-EA, H2-DMB1, LIBD, CCL5, ST3GAL1, CD74, CD209B, PLA2G2D, H2-EB1, CDKN2A, TNFRSF9, NKG7, H2-AA, IL7, IL2RB, KLRD1, KLRH1, H2- MB1
GOTERM_BP_FAT	regulation of cell-cell adhesion	37	6.33E-15	SASH3, CD274, AKNA, H2-DMA, GIMAP3, DTX1, PLA2G5, CO3E, IL2RG, ZDHHC2, CORO1A, ETS1, LGALS3, H2-EA, CIOTINT1, CASH3, CCL5, H2-DMB1, ZCSH124, NKR/BZ, CD74, PLA2G2D, CD2908, H2-EB1, ITGA4, CDKN2A, TNFRSF9, RHOH, H2-AA, ASS1, ZAP70, IL7, LCK, CCL28, SKAP1, H2-AB1, IDO1
GOTERM_BP_FAT	regulation of defense response	45	6.34E-15	NLRX1, AKNA, H2-M8, CFI, GIMAP3, NOD1, PLA2G5, REG3G, USP18, ETS1, NT5E, CCL5, CASP4, ZC3H12A, NFKBIZ, DUCXA2, SERPIN98B, GBP2, GBP4, MBL2, ZBP1, CD96, GPR17, CD74, GBP2B, PLA2G2D, APOBEC3, GPX2, GBP7, NOS2, IRGM2, TAY, INK37, IFIT1BL1, TLR1, IGHG2B, ALOXSAP, IGTP, KLRD1, CD226, TRIM15, SH2D1B1, KLRH1, TLR2, IDO1
GOTERM_BP_FAT	cell killing	28	6.96E-15	CXCL9, H2-M3, GIMAP3, REG3G, CORO1A, DEFA41, LGALS3, H2-EA, SERPINB9B, GBP2, MBL2, GBP2B, GBP7, NOS2, GZMA, DEFA5, IRGM2, GZMB, TAP1, NKG7, DEFA34, UNC13D, IGTP, KLRD1, CD226, SH2D1B1, CCL28, KLRH1
GOTERM_BP_FAT	adaptive immune response	43	9.61E-15	SASH3, C1274, SLFN2, H2-DMA, H2-M3, CFI, WAS, GIMAP3, MPTX2, CD0G, CD3E, SLA2, CD3D, IL188P, C2, C48, H2-EA, H2-DMB, ITREC2, C26H2, AN KH28 (LGC3, SEPRINBBS MEI2, CD74, H2-EB, ITATI, G20MB, TAP1, H2- AA, UNC13D, LAT2, IGHG2B, ZAP70, CD8A, CD7, IL2RB, KLRD1, CD226, CD247, SH2D1B1, SKAP1, H2-AB1

B) The 20 most significant pathways downregulated in the ileum of PD-fed mice						
Category	Term	Count	PValue	Genes		
KEGG_PATHWAY	Hematopoietic cell lineage	15	3.40E-10	H2-EB1, ITGA4, H2-DMA, CD3G, CD3E, H2-AA, CD3D, H2-EA, THPO, IL7, CD8A, H2-DMB1, CD7, CD38, H2-AB1		
KEGG_PATHWAY	Th1 and Th2 cell differentiation	14	1.66E-09	H2-EB1, H2-DMA, CD3G, CD3E, IL2RG, H2-AA, CD3D, H2-EA, ZAP70, LCK, H2-DMB1, IL2RB, CD247, H2-AB1		
KEGG_PATHWAY	Th17 cell differentiation	14	1.52E-08	H2-EB1, H2-DMA, CD3G, CD3E, IL2RG, H2-AA, CD3D, H2-EA, ZAP70, LCK, H2-DMB1, IL2RB, CD247, H2-AB1		
KEGG_PATHWAY	Staphylococcus aureus infection	15	2.10E-08	H2-EB1, SELPLG, H2-DMA, CFI, DEFA5, DEFA36, DEFA34, H2-AA, C2, DEFA41, C4B, H2-EA, H2-DMB1, MBL2, H2-AB1		
KEGG_PATHWAY	Antigen processing and presentation	13	2.39E-08	CD74, CIITA, H2-EB1, H2-DMA, H2-M3, TAP1, H2-AA, H2-EA, CD8A, H2-DMB1, KLRD1, LGMN, H2-AB1		
KEGG_PATHWAY	Leishmaniasis	11	1.89E-07	H2-EA, H2-EB1, MARCKSL1, ITGA4, NOS2, H2-DMA, H2-DMB1, NCF4, H2-AA, H2-AB1, TLR2		
KEGG_PATHWAY	Intestinal immune network for IgA production	9	4.06E-07	H2-EA, PIGR, H2-EB1, ITGA4, H2-DMA, H2-DMB1, H2-AA, CCL28, H2-AB1		
KEGG_PATHWAY	Human T-cell leukemia virus 1 infection	18	7.09E-07	H2-EB1, MMP7, CDKN2A, H2-DMA, H2-M3, RASL2-9, ADCY4, CD3G, CD3E, IL2RG, H2-AA, CD3D, ETS1, H2-EA, LCK, H2-DMB1, IL2RB, H2-AB1		
KEGG_PATHWAY	Primary immunodeficiency	8	1.62E-06	ZAP70, CIITA, LCK, CD8A, TAP1, CD3E, IL2RG, CD3D		
KEGG_PATHWAY	Toxoplasmosis	12	1.80E-06	H2-EA, H2-EB1, CIITA, NOS2, H2-DMA, H2-DMB1, CASP3, IGTP, IRGM2, H2-AA, H2-AB1, TLR2		
KEGG_PATHWAY	Tuberculosis	14	8.07E-06	CD74, CIITA, CD209B, H2-EB1, NOS2, H2-DMA, H2-AA, CORO1A, TLR1, H2-EA, CASP3, H2-DMB1, H2-AB1, TLR2		
KEGG_PATHWAY	Graft-versus-host disease	9	8.21E-06	H2-EA, H2-EB1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-M3, GZMB, KLRD1, H2-AA, H2-AB1		
KEGG_PATHWAY	Cell adhesion molecules	14	9.10E-06	CD274, H2-EB1, SELPLG, ITGA4, H2-DMA, H2-M3, H2-AA, H2-EA, CD8A, H2-DMB1, SLITRK6, PECAM1, CD226, H2-AB1		
KEGG_PATHWAY	Phagosome	13	4.51E-05	CD209B, H2-EB1, H2-DMA, H2-M3, NCF4, TAP1, H2-AA, CORO1A, H2-EA, H2-DMB1, MBL2, H2-AB1, TLR2		
KEGG_PATHWAY	Asthma	6	4.66E-05	H2-EA, H2-EB1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-AA, H2-AB1		
KEGG_PATHWAY	Inflammatory bowel disease	8	6.67E-05	H2-EA, H2-EB1, H2-DMA, H2-DMB1, IL2RG, H2-AA, H2-AB1, TLR2		
KEGG_PATHWAY	Allograft rejection	8	7.40E-05	H2-EA, H2-EB1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-M3, GZMB, H2-AA, H2-AB1		
KEGG_PATHWAY	Epstein-Barr virus infection	14	1.11E-04	H2-EB1, H2-DMA, H2-M3, TAP1, CD3G, CD3E, H2-AA, CD3D, H2-EA, CASP3, H2-DMB1, CD247, H2-AB1, TLR2		
KEGG_PATHWAY	Type I diabetes mellitus	8	1.46E-04	H2-EA, H2-EB1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-M3, GZMB, H2-AA, H2-AB1		
KEGG_PATHWAY	Autoimmune thyroid disease	8	3.11E-04	H2-EA, H2-EB1, H2-DMA, H2-DMB1, H2-M3, GZMB, H2-AA, H2-AB1		

C) The 20 most significant GO terms upregulated in the ileum of PD-fed mice					
Category	Term	Count	PValue		

C) The 20 most significant	GO terms upregulated in the ileum of PD-fed mice			
Category	Term	Count	PValue	Genes
GOTERM_BP_FAT	lipid metabolic process	90	6.41E-31	ACAA2, ABC03, AOP8, RDH7, ZBT820, ACSM5, LIPA, PLB1, CES28, EDNIBB, CES26, CYP4V3, PDK4, HMGCS2, SC01, CD86, GALST2, PDGFRA, DDFA7, LUBN, SREBF1, ABCA8A, ABCA8B, CYPA10, SPHK1, ASC146, GPL CYP2026, ALDL43A2, RDH16F2, ALDH1A3, POR, BDH2, CYP2113, CYP2111, EHHADH, ALDH1A1, CAT, RGN, CYP2040, ACC12, ACC11, TRB5, ANGPT4L, GALST3EB, PPARA, LCT, SLC7742, MGLL, BI4GALT, ACCT3, REIDH, ANDL1A2, CDL17, MUTA, ABCA1, CYP23B, FBCB82, EPK2, CYP23B, MR119, FERB3, BFR57, FGF15, NCEH1, CYP2C23, FABB44, CYP2C66, AAAAC, CES1D, CYP2C65, P2RX1, CES1G, PXMP4, FGFR4, GSTM7
GOTERM_BP_FAT	monocarboxylic acid metabolic process	61	4.54E-28	ACAA2, ABC03, 28T820, ACSM6, LIPA, CES2B, CES2G, CVP4V3, PDK4, MET, UGT2A3, SCD1, CD66, SREEF1, ABC02, CVPAU10, SPHK1, ACSL6, GP, CVP206, ALDHA2, PDMF67, ALDHA12, POR, BDH2, CVP2113, CVP2U1, EHHADH, ALDH1A1, RGN, CVP2040, ACOT2, ACOT1, TRIB3, PPARA, SLC27A2, MGLL, ACOT3, HSD1784, SLC1A3, ACAA1B, LTC45, PTG31, ADH4, ADH1, HA02, CVP219, EPHK2, CVP219, NR1D1, FABP1, FGF15, WN1, CVP2C23, FABP4, CVP2060, CES1D, CVP2065, CES1G, FGFH4, GSTM/T
GOTERM_BP_FAT	cellular lipid metabolic process	73	6.13E-27	ACAA2, ABCD3, RDH7, ACSM5, LIPA, PLB1, CES2B, CES2G, CYP4V3, PDK4, HIMGCS2, SCD1, CD36, GAL3ST2, PDGFRB, PDGFRA, SREBF1, ABCABA, ABCABB, CYP4A10, SPHK1, ACSL6, GIP, CYP2D26, ALDH3A2, RDH16F2, ALDH1A3, POR, BDH2, CYP2J1, CYP2J1, EHNDHA, IALDH1A1, CAT, RGN, CYP2D26, ALDH3A2, RDH16F2, GALSST2B, PPARA, LCT, SLC27A2, MGLL, B4GALT5, ACOT3, RETSAT, HSD1784, ACAA1B, FITM2, LTC4S, PTGS1, ADH4, ADH1, HAO2, CCL21A, CYP2J6, EPNK2, CYP2J6, FRSB, DHRS3, FABP1, NCEH1, CYP2C23, FABP4, CYP2C66, AADAC, CES1D, CYP2C65, P2RX1, CES1G, PXMP4, GSTM7
GOTERM_BP_FAT	fatty acid metabolic process	48	6.41E-25	ABCD3, ACAA2, HSD17B4, ACAA1B, ACSM5, LTC4S, LIPA, PTGS1, CES2B, ADH4, CES2G, CYP4V3, PDK4, CD36, SCD1, HAO2, SREBF1, CYP2J6, EPHX2, SPHK1, CYP4A10, CYP2J9, ACSL6, GIP, CYP2D26, FABP1, ALDH3A2, POR, BDH2, CYP2C37, FABP4, CYP2C66, CYP2L1, CES1D, CYP2J13, CYP2C65, EHHADH, CES1G, ACOT2, RGN, CYP2C40, ACOT1, TRIB3, PPARA, GSTM7, SLC27A2, MGLL, ACOT3
GOTERM_BP_FAT	carboxylic acid metabolic process	65	4.91E-23	ACAA2, ABC03, ZBTEB0, ACSM6, LIPA, CES2B, IYO, CES2G, CYP4V3, PIX4, ME1, UGT2A3, SCD1, C038, SREBF1, ABCC2, CYP4A10, SPHK1, ACSL6, RENBP, GIP, CYP2D26, ALDH3A2, RDH16F2, ALDH1A3, POR, BDH2, CYP2J1, S1 CYP2U1, TST, EHHADH, ALDH1A1, RGN, CYP2C40, ACOT2, ACGT1, THIB3, PPARA, SLC27A2, MBLL, ACOT3, HSD1784, SLC1A3, ACAA1B, NPL, LTC4S, PTGS1, ADH4, ADH1, HA02, CYP2J6, EPHX2, CYP2J9, NR1D1, FABP1, FGF15, WN1, CYP2C23, FABP4, CYP2C66, CST0, CST46, GSTM/
GOTERM_BP_FAT	oxoacid metabolic process	67	1.44E-22	AGAA2, ABC03, ZBTE20, ACSM5, LIPA, CES2B, EDNRB, VID, CES2G, CYP4V3, PDK4, ME1, UGT2A3, SCD1, CD36, SREBF1, ABCC2, CYP4A10, SPHK1, ACSL6, RENBP, GIP, CYP2D26, ALDH3A2, RDH16F2, ALDH3A, POR, BDH2, CYP2J13, CYP2U17, STF, BHAABH, ALDH1A1, RGN, CYP2C40, ACC012, ACO11, TMB5, PPARA, SL27A2, MGLL, ACO13, MTARC1, HSD17B4, SLC1A3, ACGA1B, MPL, LTC45, PTG51, ADH4, ADH1, HA02, CYP2A6, DET1C, CYP2J8, NRTID, FABP1, FGF1A, SMTM, CYP2J9, NRTID, FABP1, FGF1A, NN1, CYP2C23, FABP4, CYP2C66, CES1D, CYP2C66,
GOTERM_BP_FAT	organic acid metabolic process	67	3.22E-22	ACAA2, ABCD3, ZBTE20, ACSM5, LIPA, CES2B, EDNRB, IYD, CES2G, CYP4V3, PDK4, ME1, UGT2A3, SCD1, CD36, SREBF1, ABCC2, CYP4A10, SPHK1, ACSL6, RENBP, GIP, CYP2D26, ALDH3A2, RDH1672, ALDH1A3, POR, BDH2; CYP2J13, CYP2U1, TST, EHHAAH, ALDH1A1, RGN, CYP2C40, AC072, ACOT1, HBS, PPARA, SL27A2, MGLL, ACOT3, MTARC1, HSD17B4, SLC1A3, ACAA1B, NPL, LTC45, PTG51, ADH4, ADH1, HA02, CYP236, EPHX2, CYP2J9, NTAID, HSBP1, FGF1, NW1, CYP2C26, SRE9L, CYP2G6, CES1L, CYP4G64, CH41, C
GOTERM_BP_FAT	long-chain fatty acid metabolic process	23	3.81E-17	ABCD3, CYP2J6, EPHX2, SPHK1, CYP4A10, CYP2J9, ACSL6, LTC4S, CYP2D26, PTGS1, CYP2C23, CYP2C66, CYP2J13, CYP2U1, CYP2C65, ACOT2, CYP2C40, ACOT1, CD36, GSTM7, SLC27A2, MGLL, ACOT3
GOTERM_BP_FAT	lipid biosynthetic process	42	1.93E-14	ABCD3, AQP8, ZBTE20, HSD17B13, ACSM5, FITM2, LTC4S, HSD17B11, LIPA, CYP17A1, PTGS1, SEC14L2, PDK4, HMGCS2, SCD1, GALSST2, WNT4, SREBF1, ABCA8A, HSD3B3, ABCA8B, SPHK1, ACSL6, NR1D1, GIP, RDH16F2, ALDH1A3, FGF15, POR, CES1D, P2RX1, CES1G, ALDH1A1, RGN, TRIB3, PPARA, GAL3ST2B, FGFR4, GSTM7, SLC27A2, MGLL, B4GALT5
GOTERM_BP_FAT	regulation of hormone levels	40	1.06E-13	SLC22A3, RETSAT, RDN7, WIK4, ITPR1, HSD17A4, SLC2A2, AFP, HSD17B11, PLB1, CYP17A1, PTG51, GHR, NEUROD1, ADH4, ADH1, GJA1, EDNRB, CLTRN, IYO, WNT4, CHS18, GPR39, PDGFRA, SREBF1, ABCC2, HSD3B3, IZO4, OPRK1, NR101, DHRS3, GJR, PCH16F2, ALDH1A3, SFRP1, POR, SLC7A8, ALDH1A1, NMU, FGFR4
GOTERM_BP_FAT	organic hydroxy compound metabolic process	36	2.41E-13	ABCOB, MAOB, RETSAT, ADPB, RDH7, ACAA1B, LIPA, SLC6A3, PLB1, SEC14L2, ADH4, ADH1, EDNBB, IYD, HMGCS2, HAO2, WNT4, ABCA1, CUBN, SREBF1, SPHK1, NRTD1, DHRS3, ALDH3A2, RDH16F2, ALDH1A3, FGF15, POR, CES1D, CAT, CES1G, ALDH1A1, FGFR4, LCT, SLC27A2, ALDH1A7
GOTERM_BP_FAT	steroid metabolic process	29	1.12E-12	ABCD3, ADP8, RDH7, HSD17B4, ACAA1B, AFP, HSD17B11, LIPA, CYP17A1, SEC14L2, EDNRB, HM3CS2, SCD1, WNT4, ABCA1, PDGFRA, CUBN, SREBF1, HSD3B3, EPHX2, NR1D1, RDH16F2, FGF15, POR, CES1D, CAT, CES1G, FGFR4, SLC27A2
GOTERM_BP_FAT	regulation of lipid metabolic process	31	3.72E-12	AOP8, ZETB20, HSD17B13, FITM2, CYP17A1, SEC14L2, PDK4, CD26, SCD1, CCL21A, WNT4, POGFR8, CPR39, POGFRA, SREBF1, EPHX2, SPHK1, NR1D1, GIP, FABP1, RDH16F2, FGF15, POR, CES1D, AADAC, CES1G, RGN, TRIB2, ANGFTL4, PPARA, FGFR4
GOTERM_BP_FAT	response to xenobiotic stimulus	33	1.27E-11	ABCD3, MAOB, WINK4, SLC1A3, ACAA1B, LIPA, SLC6A3, CPYZ, NEUROD1, NCAM1, HMGCS2, BCHE, SREBF1, ABCC2, CYP2J6, CYP2J9, MMP9, GIP, CYP2D26, SFRP1, POR, NCEH1, CYP2C3, CYP2C66, CYP2U1, CYP2J13, CYP2C65, CAT, ALDH1A1, CYP2C40, PLINZ, LCT, GSTIM7
GOTERM_BP_FAT	positive regulation of lipid metabolic process	21	5.55E-11	PDGFRB, PDGFRA, SREBF1, ZBTB20, HSD17B13, NR1D1, CYP17A1, FABP1, SEC14L2, RDH16F2, POR, AADAC, CES1D, CES1G, RGN, CD36, ANGPTL4, SCD1, PPARA, CCL21A, WNT4
GOTERM_BP_FAT	unsaturated fatty acid metabolic process	19	1.07E-10	CYP2J6, EPHX2, SPHK1, CYP4A10, CYP2J9, LTC4S, CYP2D26, PTGS1, CES2B, CYP2C23, CYP2C66, CYP2J13, CYP2U1, CYP2C65, CES2G, CYP2C40, SCD1, GSTM7, MGLL
GOTERM_BP_FAT	regulation of lipid biosynthetic process	21	2.57E-10	SREBF1, AQP8, SPHK1, ZBTB20, HSD17B13, FITM2, NR1D1, GIP, CYP17A1, SEC14L2, RDH16F2, POR, FGF15, CES1D, CES1G, PDK4, RGN, TRIB3, PPARA, FGFR4, WNT4
GOTERM_BP_FAT	cellular hormone metabolic process	17	2.74E-10	PDGFRA, RETSAT, HSD3B3, RDH7, HSD17B4, AFP, HSD17B11, DHRS3, PLB1, CYP17A1, RDH16F2, ALDH1A3, ADH4, ADH1, EDNRB, ALDH1A1, WNT4
GOTERM_BP_FAT	hormone metabolic process	21	6.69E-10	CHST8, PDGFRA, RETSAT, HSD3B3, RDH7, HSD17B4, AFP, HSD17B11, DHRS3, PLB1, CYP17A1, GHR, RDH16F2, ALDH1A3, ADH4, ADH1, POR, EDNRB, IYD, ALDH1A1, WNT4
GOTERM_BP_FAT	alcohol metabolic process	24	9.59E-10	ABCA1, CUBN, SREBF1, RETSAT, AQP8, SPHK1, RDH7, LIPA, DHRS3, PLB1, SEC14L2, ALDH3A2, RDH16F2, ALDH1A3, ADH4, ADH1, POR, CES1D, CAT, CES1G, ALDH1A1, HMGCS2, FGFR4, ALDH1A7
D) The 20 most significant Category	pathways upregulated in the ileum of PD-fed mice Pathway	Count	PValue	Genes CYP4A10, ACSL6, AOP7, ACAA1B, FABP1, FABP4, EHHADH, ME1, PLIN2, HMGCS2, CD36, ANGPTL4, SCD1, PPARA, SLC27A2

D) The 20 most significant pathways upregulated in the ileum of PD-fed mice						
Category	Pathway	Count	PValue	Genes		
KEGG_PATHWAY	PPAR signaling pathway	15	5.63E-10	CYP4A10, ACSL6, AQP7, ACAA1B, FABP1, FABP4, EHHADH, ME1, PLIN2, HMGCS2, CD36, ANGPTL4, SCD1, PPARA, SLC27A2		
KEGG_PATHWAY	Retinol metabolism	15	1.82E-09	RETSAT, CYP4A10, RDH7, DHRS3, RDH16F2, ALDH1A3, ADH4, ADH1, CYP2C23, CYP2C66, CYP2C65, ALDH1A1, CYP2C40, UGT2A3, ALDH1A7		
KEGG_PATHWAY	Arachidonic acid metabolism	13	3.55E-08	CYP2J6, EPHX2, CYP4A10, CYP2J9, LTC4S, PLB1, PTGS1, CYP2C3, CYP2C66, CYP2J13, CYP2U1, CYP2C65, CYP2C40		
KEGG_PATHWAY	Metabolic pathways	58	1.54E-07	CDA.ACAA2, RDH7, ACSM6, SAT2, PLB1, MET, UGT2A3, HMGCS2, SCD1, CH5T8, GUCY1A1, CYP4A10, SPHK1, ACSL9, RENBP, ALDH3A2, RDH1672, ALDH1A3, CYP2J13, CYP2U1, TST, EHHADH, ALDH1A1, CAT, RGN, CYP2C40, ACOT2, ACOT1, LCT, ALDH1A7, MGLL, B4GALT3, ACOT3, MAOB, HSD17B4, PLD4, ACAATB, NPL, LTC45, CYP17A1, PTGS1, ADH4, ADH1, PRDM16, HAO2, CYP2J6, HSD3B3, EPHX2, CYP2J9, BBOX1, DHRS3, VMN1, CYP2C23, CYP2C66, CSTM7, GSTM6		
KEGG_PATHWAY	Fatty acid degradation	9	3.77E-06	ALDH3A2, ADH4, ADH1, ACAA2, CYP2U1, EHHADH, CYP4A10, ACSL6, ACAA1B		
KEGG_PATHWAY	Peroxisome	10	2.37E-05	ABCD3, EHHADH, EPHX2, CAT, ACSL6, HSD17B4, PXMP4, ACAA1B, HAO2, SLC27A2		
KEGG_PATHWAY	Linoleic acid metabolism	8	2.94E-05	CYP2C23, CYP2C66, CYP2J6, CYP2J13, CYP2C65, CYP2J9, CYP2C40, PLB1		
KEGG_PATHWAY	Serotonergic synapse	11	1.28E-04	CYP2C23, CYP2C66, MAOB, CYP2J6, CYP2J13, CYP2C65, CYP2J9, ITPR1, CYP2C40, CYP2D26, PTGS1		
KEGG_PATHWAY	Ovarian steroidogenesis	8	1.34E-04	CYP2J6, CYP2J13, HSD3B3, CYP2J9, ACOT2, ACOT1, CYP17A1, ACOT3		
KEGG_PATHWAY	Steroid hormone biosynthesis	9	2.71E-04	CYP2C23, CYP2C66, HSD3B3, CYP2C65, CYP2C40, UGT2A3, HSD17B11, CYP17A1, CYP2D26		
KEGG_PATHWAY	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	6	3.35E-04	ACOT2, HSD17B4, ACOT1, ACAA1B, SCD1, ACOT3		
KEGG_PATHWAY	Inflammatory mediator regulation of TRP channels	10	4.85E-04	CYP2C23, CYP2C66, CYP2J6, CYP2J13, CYP2C65, CYP4A10, CYP2J9, ITPR1, CYP2C40, IL1RAP		
KEGG_PATHWAY	Chemical carcinogenesis - DNA adducts	7	0.00411	CYP2C23, CYP2C66, CYP2C65, CYP2C40, UGT2A3, GSTM7, GSTM6		
KEGG_PATHWAY	Fatty acid metabolism	6	0.005189	ACAA2, EHHADH, ACSL6, HSD17B4, ACAA1B, SCD1		
KEGG_PATHWAY	Basal cell carcinoma	6	0.005555	BMP4, FZD2, GADD45B, FZD4, HHIP, WNT4		
KEGG_PATHWAY	Drug metabolism - other enzymes	7	0.006406	CDA, CES2B, CES1D, CES2G, UGT2A3, GSTM7, GSTM6		
KEGG_PATHWAY	Vitamin digestion and absorption	4	0.008954	CUBN, CBLIF, SLC23A1, PLB1		
KEGG_PATHWAY	Drug metabolism - cytochrome P450	6	0.009169	ADH4, ADH1, MAOB, UGT2A3, GSTM7, GSTM6		
KEGG_PATHWAY	Cholesterol metabolism	5	0.012556	ABCA1, NCEH1, ANGPTL4, CD36, LIPA		
KEGG_PATHWAY	ABC transporters	5	0.014356	ABCA1, ABCD3, ABCC2, ABCA8A, ABCA8B		

表 2. Enriched gene clusters in the ileum of PD-fed mice

A) The 20 most signi	ficant GO terms downregulated in the duodenum of PD-fed mice	Count	D\/aluo	Ganas	Fold Enrichmont	TEND
GOTERM_BP_FAT	GO:0002682-regulation of immune system process	49	8.93E-0	Lens TMEMI31L, SLA2, AQP3, MECOM, TRBC2, MYC, GPX2, TRIM62, PRKCH, EDN3, FREG, ZAP70, CDBA, KIT, CD226, DNASE1, TLAV, NBL1, SKAP1, SASH3, BILM H2-DMA, ST3050701RK (C, DTX1, MPT2, LPA265, REG30, LPA6, GRAMDA, CCL5, PCK1, CCL24, CAP2, FY22, CDNVA2, THAT1, BMX, MEIS2, H2- AA, MEHAS1, WN1, SELL, KLPN, CD247, KLPH1, DAA, H2-AB1	2.26468599	2.70E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:5008629-lipid metabolic process	47	7 1.11E-0	SCARB1, ADP8, CYP3A11, MGST2, PLA'06, SLA2, HSD/TB11, AKR1B8, CYP17A1, CBS2A, CSE28, HHN1, CSE2, CYP265, CYP2810, PCK1, HA02, BNP7, GSTM4, GSTM2, GSTM1, UGT1A1, UGT2838, CYP4A10, PLA264C, ME0AT1, ACGT12, PLAAT3, GCPT01, BAAT, CYP2220, CYP4F15, PLC84, CYP2068, ACGV2, GSTA3, CYP2068, CES1F, GSTA1, KIT, CES1G, ALDH1A1, CYP1A1, UGT28, ACGT1, TLM4, ABCG1	2.676370387	5.85E-07
GOTERM_BP_FAT	GO:0006082-organic acid metabolic process	41	2.63E-1	OVPAN1, MGST2, GLVAT, PLA2G5, OES2A, CES2B, CES2G, CYP2OS, MVC, CYP2B10, SLC16A9, PCK1, HAO2, GSTM, GSTM2, GSTM1, UGT1A1, BHMT1B, D UGT28B8, CYPAND, ACOT12, CTFS2, BAAT, CYP2C29, CYP4F15, WN1, CYP2OB6, ACOX2, TST, PSAT1, CYP2C65, CES1F, GSTA1, CES1G, ALDH1A1, CYP1A1, UGT285, SARDH, ACOT1, TLRA, ASPA	3.103500113	\$ 2.23E-07
GOTERM_BP_FAT	GO:0019752-carboxylic acid metabolic process	40) 5.75E-1	CYP3411, MGST2, GLYAT, PLA265, GES2A, GES2E, CES2C, CYP2055, MPC, CYP2810, PCK1, HA02, GSTM, GSTM2, GSTM1, UGT1A1, BHMT1B, UGT2B38, FOP4A10, ACOTT2, CIT52, BAAT, CYP2C29, CYP4F15, NNN1, CYP2068, ACOX2 TST, PSAT1, CYP2058, GES1F, GSTA1, CES1G, ALDH1A1, CYP1A1, UGT2B5, SARDH, ACOTT, TER, ASPA	3.334052439	# 8.88E-08
GOTERM_BP_FAT	GO-0043436oxoacid metabolic process	40) 6.17E-1	CYP3411, MG512, GLYAT, PLA265, GES2A, GES2B, CES2C, CYP2G55, MYC, CYP2910, PCX, HA2C, GSTM, GSTM2, GSTM, IGT131, BHHTI BUT2B8, 0 CYP4A10, ACOT12, CTP52, BAAT, CYP2C29, CYP4F15, WN1, CYP2G66, ACOX2 TGT, PSAT1, CYP2G65, GES1F, GSTA1, CES1G, ALDH1A1, CYP1A1, UGT2B5, SARDH, ACOT1, LIPA, ASPA	3.073075599	1 3.73E-07
GOTERM_BP_FAT	GO:0002684~positive regulation of immune system process	38	7.55E-0	SASH3, BLM, H2-DMA, CFI, MPTX2, PLA2G5, REG3G, SLA2, IL2RG, GRAMD4, 7 ADR3, CCL5, TRBC2, PCK1, CCL24, CAR2, TRIM62, FYB2, PRKCH, EDN3, TRAT1, BMX, H2-A3, EREG, MFHAST, ZAP70, WN1, SELL, CD8A, KIT, KLRD1, CD226, CD247, TLR4, SKAP1, KLRH1, ADA, H2-AB1	2.431782131	2.00E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0044255-cellular lipid metabolic process	37	2.52E-0	SCABRI, OYPA11, MISTZ, PLAGS, SLAZ, AKRIBS, CESA, CES26, CES2C, CYP2C55, CYP2E016, PCK1, HAC2, ENPP7, GSTMA, GSTM2, GSTM1, CYPA10, B (PLAGAC, MBOATI, ACOT12, PLAAT3, GPCPD1, BAAT, CYP2C28, CYPAF15, CYP2C98, ACO22, CYP2C95, CES1F, GSTA1, KIT, CES1G, ALDH1A1, CYP1A1, ACOT1, TLR4	2.840097043	8.20E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0032787-monocarboxylic acid metabolic process	35	3.61E-1	CYP3411, MGST2, GLYAT, PLA2G5, CES2A, CES2B, CES2C, CYP2C55, MYC, 2 CYP2B10, PCK1, HA02, GSTM4, GSTM2, GSTM1, UGT1A1, UGT2B38, CYP4A10, ACOT12, BAAT, CYP2C29, CYP4F15, VMN1, CYP2C66, ACOX2, CYP2C65, CES1F GSTA1, CES1G, ALDH1A1, CYP1A1, UGT2B5, ACOT1, TLR4, ASPA	4.153975662	1.53E-08
GOTERM_BP_FAT	GO:0006631~fatty acid metabolic process	26	4.60E-1	MGST2, PLA2G5, CES2A, CES2B, CES2C, CYP2C55, CYP2B10, PCK1, HAO2, 0 GSTM4, GSTM2, GSTM1, CYP4A10, ACOT12, BAAT, CYP2C29, CYP4F15, CYP2C66, ACOV2, CYP2C65, CES1F, GSTA1, CES10, CYP1A1, ACOT1, TLR4	4.616171792	3.25E-07
GOTERM_BP_FAT	GO:0009410~response to xenobiotic stimulus	22	8.07E-0	GSTM4, GSTM2, GSTM2, BLM, GSTM1, UGT1A1, CDKN2A, UGT2B38, PDX1, 7 CYP3A11, CYP2C29, GSTA5, CYP2C66, CYP2C55, GSTA3, CYP2C65, CYP2B10, MYC, GSTA1, ALDH1A1, CYP1A1, UGT2B5	3.625939295	5 2.01E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0071466~cellular response to xenobiotic stimulus	19	1.06E-1	GSTM4, GSTM3, GSTM2, BLM, GSTM1, UGT1A1, UGT2B38, CYP3A11, CYP2C29, 0 GSTA5, CYP2C66, CYP2C55, GSTA3, CYP2C65, CYP2B10, MYC, GSTA1, CYP1A1, UGT2B5	7.40933618	1.12E-07
GOTERM_BP_FAT	GO:0008202~steroid metabolic process	17	5.41E-0	6 SCARB1, UGT1A1, UGT2B38, AQP8, CYP3A11, HSD17B11, BAAT, CYP17A1,	4.035290643	3 0.00127089
GOTERM_BP_FAT	GO:0006805~xenobiotic metabolic process	16	6.29E-1	1 GSTM4, GSTM2, GSTM1, UGT1A1, UGT2B38, CYP3A11, CYP2C29, GSTA5,	10.05492649	8.88E-08
GOTERM BP EAT	GO:0033559~upsaturated fatty acid metabolic process	16	1.64E-0	GSTM2, GSTM1, CYP4A10, MGST2, PLA2G5, CYP2C9, CES2A, CYP4F15,	7 986484472	7 71E-07
COTERM RR EAT	CO-0020217_T coll differentiation	16	7.005.0	CES2B, CES2C, CYP2C66, CYP2C55, CYP2C65, CYP2B10, GSTA1, TLR4 SASH3, BLM, CDKN2A, FLT3, H2-DMA, DTX1, CD3G, TMEM131L, IL2RG, H2-AA,	4 107101440	0.00156026
GOTERM BP FAT	GD-0006690-icosanoid metabolic process	15	2 70E-0	ZAP70, VNN1, CD8A, KIT, PCK1, ADA GSTM1, CYP4A10, MGST2, PLA2G5, CYP2C29, CES2A, CYP4F15, CES2B,	8 508328628	1 135-06
GOTERM BP FAT	G0-1901568-fatty acid darivative metabolic process	15	2.94E-0	CES2C, CYP2C66, CYP2C55, CYP2C65, CYP2B10, GSTA1, TLR4 GSTM1, CYP4A10, MGST2, PLA2G5, CYP2C29, CES2A, CYP4F15, CES2B,	8 453436185	1 13E-06
GOTERM BP FAT	GO-0001676-long-chain fatty acid metabolic process	12	3 99E-0	CES2C, CYP2C66, CYP2C55, CYP2C65, CYP2B10, GSTA1, TLR4 GSTM4, CYP4F15, GSTM2, GSTM1, CYP2C66, CYP2C55, CYP2C65, CYP2B10,	7 822582738	1 135-04
GOTERM_BP_FAT	G0:0042178~xenobiotic catabolic process	12	3.55E-0	CYP4A10, CYP1A1, ACOT1, CYP2C29 9 GSTM4, GSTM2, GSTA5, GSTM1, UGT1A1, CYP2B10, GSTA1, CYP1A1, CYP3A11	23.12263427	1.13E-04
GOTERM_BP_FAT	G0:0019755-one-carbon compound transport	6	8.12E-0	6 CAR2, AQP8, AQP7, AQP3, AQP1, CAR4	20.96452174	0.00171882
B) The 20 most signi Category	ficant pathways downregulated in the duodenum of PD-fed mice Pathway	Count	PValue	Genes	Fold Enrichment	TEDR
KEGG_PATHWAY	mmu05204:Chemical carcinogenesis - DNA adducts	17	4.47E-1	GSTM4, GSTM3, GSTM2, GSTM1, UGT1A1, UGT2B38, CYP3A11, MGST2, 4 CYP2C29, GSTA5, CYP2C66, CYP2C55, GSTA3, CYP2C65, GSTA1, CYP1A1, UGT296	13.80987654	1.05E-11
KEGG_PATHWAY	mmu00983:Drug metabolism - other enzymes	16	3.16E-1	2 GSTM4, GSTM3, GSTM2, GSTM1, UGT1A1, UGT2B38, MGST2, TYMP, CES2A,	11.86731079	3.70E-10
KEGG_PATHWAY	mmu00980:Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	12	6.74E-0	GSTM4, GSTM3, GSTM2, GSTA5, GSTM1, UGT1A1, GSTA3, UGT2B3 GSTM4, GSTM3, GSTM2, GSTA5, GSTM1, UGT1A1, GSTA3, UGT2B38, GSTA1, OVENAL UCTOPE MCCT2	11.21704718	5.26E-07
KEGG_PATHWAY	mmu05207:Chemical carcinogenesis - receptor activation	18	2.40E-0	BOTMAL OGT285, MIG312 BOSTM4, GSTM3, GSTM2, PAQR7, GSTM1, UGT1A1, PAQR5, UGT2838, ADCY4, BOVRAHL MOSTA COTAS COTAS COTAS CORDELLA MICE COTAL CONTACT AND A	5.458962963	3 1.41E-06
KEGG_PATHWAY	mmu00982:Drug metabolism - cytochrome P450	11	6.58E-0	8 GSTM4, GSTM3, GSTM2, GSTA5, GSTM1, UGT1A1, GSTA3, UGT2B38, GSTA1,	10.57193532	2 3.08E-06
KEGG_PATHWAY	mmu00140:Steroid hormone biosynthesis	12	9.03E-0	UG12B5, MGS12 8 CYP2C66, UG11A1, CYP2C55, CYP2C65, CYP2B10, UG72B38, CYP1A1,	8.804778973	3.47E-06
KEGG_PATHWAY	mmu01100:Metabolic pathways	50	0 1.04E-0	L YF3AH1, UG1285, HSU/1911, C YF2CJ9, C YF17A1 C YF3AH1, ARTBB, HYKK, MECON CYP2810, ENPP7, CAR4, GPX2, UG11A1, C YF4AH0, PLA264C, ACOT12, C TF92, PLA473, BAAT, PLCB4, ACOX2, TST, B SIOTR, ALDHAT1, UG1258, ACOT1, SAPA, LIPT2, ACOX4, MG32F, PLA265, TYMP, CYP17A1, C YP2C35, PCK1, HA02, GSTM4, GSTM3, CAR2, GSTM2, GSTM1, UG12838, MBOAT1, C YP2C29, GSTA5, WN1, C YP2C66, PSAT1, GSTA3, C YP2C66, GSTA1, C YP1A1, SARDH, ADA	2.107382243	3.47E-06
KEGG_PATHWAY	mmu00830:Retinol metabolism	12	1.40E-0	7 CYP2C66, UGT1A1, CYP2C55, CYP2C65, CYP2B10, CYP4A10, UGT2B38, ALDH1A1, CYP1A1, CYP3A11, UGT2B5, CYP2C29	8.441695304	4.10E-06
KEGG_PATHWAY	mmu00591:Linoleic acid metabolism	8	6.99E-0	6 CYP2C66, CYP2C55, CYP2C65, PLA2G4C, CYP3A11, PLAAT3, PLA2G5, CYP2C29	10.91792593	1.82E-04
KEGG_PATHWAY KEGG_PATHWAY	mmu00480:Glutathione metabolism mmu01524:Platinum drug resistance	g	8.90E-0	6 GSTM4, GSTM3, GPX2, GSTM2, GSTA5, GSTM1, GSTA3, GSTA1, MGST2 5 GSTM4, GSTM3, GSTM2, GSTA5, GSTM1, CDKN2A, GSTA3, GSTA1, MGST2	8.52962963	2.08E-04 4.16E-04
KEGG_PATHWAY	mmu00590:Arachidonic acid metabolism	g	3.05E-0	5 CYP2C66, CYP2C55, CYP2C65, CYP2B10, CYP4A10, PLA2G4C, PLAAT3, PLA2G5, CYP2C29	7.225098039	5.95E-04
KEGG_PATHWAY	mmu04750:Inflammatory mediator regulation of TRP channels	10	9.27E-0	5 HRH1, PRKCH, PLCB4, CYP2C66, CYP2C55, CYP2C65, CYP4A10, PLA2G4C, ADCY4, CYP2C29	5.372995042	0.00164431
KEGG_PATHWAY	mmu04976:Bile secretion	g	9.84E-0	5 SCARB1, CAR2, UGT1A1, AQP8, UGT2B38, UGT2B5, ADCY4, BAAT, AQP1	6.141333333	0.00164431
KEGG_PATHWAY	mmu05225:Hepatocellular carcinoma	11	2.16E-0	4 IGST 1049, GST 1M3, GST 1M2, FZU2, GST A5, GSTM1, CDKN2A, GSTA3, MYC, GSTA1, 4 MGST2	4.313835675	0.00337247
KEGG_PATHWAY KEGG_PATHWAY	mmu04964:Proximal tubule bicarbonate reclamation mmu04640:Hematopoietic cell lineage	5	2.55E-0 4.21E-0	4 (CAR2, SLG38A3, PCK1, AQP1, CAR4 4 CD8A, FLT3, H2-DMA, CD7, KIT, CD3G, H2-AA, H2-AB1	15.50841751 5.807407407	0.00373665
KEGG_PATHWAY	mmu04658:Th1 and Th2 cell differentiation mmu05340:Primary immunodeficiency	7	0.0017296	1 ZAP70, H2-DMA, CD3G, CD247, IL2RG, H2-AA, H2-AB1 1 ZAP70, CIITA, CD8A, IL2BG, ADA	5.427946128	0.02164754
KEGG_PATHWAY	mmu04913:Ovarian steroidogenesis	6	6 0.0021613	5 SCARB1, PLA2G4C, CYP1A1, ADCY4, ACOT1, CYP17A1	6.498765432	0.02451721

C) The 20 most significant GO terms upregulated in the duodenum of PD-fed mice Category Term

Count PValue

Genes Fold Enrichment FDR RIPCR1, NLRX1, SERPINE2, INSIG1, USP18, LTBP1, ARHGAP35, SLC6A3, RGS4, RGS5, LITRL1, GLA1, RNP213, TKFC, FGP3, PIP4K2B, CD64, WNT3, GBP3, DUSP3, HEG1, FST, APO42, WTP, DUSP3, MMP3, TB20, ENTREP1, SFP71, SLC6A9, ECC4, WNC9, SFV1, RGST8P, SAUDIS, FEP1, Hz-210, PPAP0

C) The 20 most significant GO terms upregulated in the duodenum of PD-fed mice								
Category	Term	Count	PValue	Genes	Fold Enrichment	FDR		
GOTERM_BP_FAT	GO:0048585-negative regulation of response to stimulus	38	4.02E-05	RIPOR1, NLRX1, SERPINE2, INSIG1, USP18, LTBP1, ARHGAP35, SLC8A3, RGS4, RGS5, ILTRL1, GJA1, RNF213, TKFC, FGF9, PIP4K2B, CD34, WNT3, GBP3, DUSP3, HEG1, FST, APO42, WTIF, DUSP8, MUMP, TSX2, ENTREP1, STRP1, SLC8A9, ERCC4, WNK2, SPRY1, RGS7BP, SH2D1B1, FBP1, H2-Q10, PPARD	2.02723845	0.16669511		
GOTERM_BP_FAT	GO:0051240-positive regulation of multicellular organismal process	41	9.45E-05	NLFRI, BEXI, SERPINEZ, CLECAN, AMIGOZ, NODI, HAPLAA, LTBPI, APHGAPS, SLGAA, BICRA, ROSA, LLTR, LGAI, CA, TKC, FORP, PERYZ, BHZPUZB, ENPPA, CD34, WNT3, PDGFRB, CADM1, TMFREF12A, TRPA1, GP18B, TMFSF15, HEG1, FST, APOA2, ACSL6, NPNT, MMP9, ZDHHC15, TBK2, ID2, SPRY1, TEK, H2- C10, TLR2	1.88066438	0.16761821		
GOTERM_BP_FAT	GO:0065009-regulation of molecular function	47	1.48E-04	RIPORT, PARMI, SERPINEZ, TRIMOC, RASL2-9, DCUNITOZ, NODI, NTS, SLC5A3, ARHGAPS, IFTZ, ROSA, DUBYEL, GLAI, LCITRN, IPHAKB, RAUGPST, TBC1DG, IPDEFB, ROHDML, DUBPD, TNFSF15, HEG1, APDAZ, TRAPPOS, NPMT, MMP9, RENBP, SLC8A3, SGSM1, SFRP1, FABP4, SLC6A9, ERCC4, WNIK2, IDZ, NOS1AP, ATT13A2, NAF1, SPRP1, ALDOB, TEK, DOPIA, PLCD1, PPARD, TLP2, HCN1	1.74156584	0.16761821		
GOTERM_BP_FAT	GO:0031349~positive regulation of defense response	16	1.62E-04	NLRX1, CADM1, CLEC4N, TRIM30C, TRIL, NOD1, IGHG2B, IL1RL1, GJA1, TKFC, FABP4, EPG5, SH2D1B1, H2-Q10, TLR2, GBP3	3.18273267	0.16761821		
GOTERM_BP_FAT	GO:0010038-response to metal ion	14	3.35E-04	CPNE8, DNMT3A, MT2, MMP9, SLC6A3, FABP4, AKR1C14, ID2, ATP13A2, ALDOB, SLC25A23, FBP1, PLCD1, HCN1	3.30910588	0.20059627		
GOTERM_BP_FAT	GO:0051050~positive regulation of transport	25	4.60E-04	RIPOR1, RASL2-9, SLC2A2, PTPN23, ERFE, GJA1, CLTRN, KIF3A, P2RY2, CD34, PDGFRB, TRPA1, ABCA8A, APOA2, ACSL6, IGHG2B, SLC6A9, WNK2, IAPP, ATP13A2, TEK, PLCD1, PPARD, TLR2, HCN1	2.18190704	0.20059627		
GOTERM_BP_FAT	GO-0048584-positive regulation of response to stimulus	46	4.64E-04	H2-T24, NLEX1, CLECAN, TRIMBOC, TRU, SLC2A2, NOD1, NTS, NDJ, EFFE, RSS4, LLTRI, LGAL, GC, RFC, FGPB 2FOS (LGC LENPPA WINTS, GBP3, EDARADD, PDGFRB, GLCY1A1, DLSP3, GADM1, TMFRSF12A, TRPA1, GP1BB, TMFSF15, DMNT3A, NPNT, MMP9, IGHG2B, SFRP1, FABP4, GFHR2, WMK2, AKR1C14, JAPP, SH2D1B1, TEK, H2-G10, PPA4D, TLR2, C1GC	1.66941113	0.20059627		
GOTERM_BP_FAT	GO:0003013~circulatory system process	16	4.88E-04	GUCY1A1, HEG1, SLC2A5, NTS, ARHGAP35, TBX2, RGS4, GJA1, TMEM65, P2RY2, ID2, NOS1AP, E2F4, CD34, PPARD, HCN1	2.86502674	0.20059627		
GOTERM_BP_FAT	GO:0015711-organic anion transport	15	5.42E-04	SLC10A2, ACSL6, APOA2, SLC2A2, PCTP, ERFE, SLC16A13, RGS4, GJA1, FABP4, SLC6A9, CLTRN, P2RY2, SLC25A23, PPARD	2.97791502	0.20059627		
GOTERM_BP_FAT	GO:0032101~regulation of response to external stimulus	22	6.65E-04	PDGFRB, NLRX1, DUSP3, SERPINE2, GP1BB, TRIM30C, NOD1, USP18, SLC6A3, IGH028, IL1RL1, GJA1, C6, TKFC, FABP4, CFHR2, ENPP4, CD34, WNT3, H2-Q10, PPARD, TLR2	2.27601442	0.20059627		
GOTERM_BP_FAT	GO:0006000~fructose metabolic process	4	7.00E-04	ALDOART1, TKFC, ALDOB, FBP1	22.3233333	0.20059627		
GOTERM_BP_FAT	GO-0023051-regulation of signaling	58	7.04E-04	RIPORT, SERPINE2, CLECHI, TRIMOC, SLC2A2, PTPN23, ERFE, ARHGAP35, RGSH, RGSS, GJAH, FGF9, PIP4/2B, PALGP51, PDGFRB, EDAFADD, GLC14, ALP DUBP3, THTRFST2A, HEG1, FST, DUBP3, NNTI, MANG, SHF91, ARATICA1, APP, RGS7BP, SH2D1B1, FEP1, TLR2, FPARD, NNTI, NLRX1, NNG1, NOD1, NID1, NTS, CPL22, USP1, LIBP1, RH2713, TKFC, TIMBAB, F2M2, WINZ, SPR11, TEC1D16, GBP3, TIRPA1, TNFSF15, WTIP, SLC3A3, ENTREP1, SLC6A9, WNK2, SPR11, TEC, NCM	1.51689404	0.20059627		
GOTERM_BP_FAT	GO:0006820~anion transport	17	7.09E-04	TRPA1, SLC10A2, ACSL6, ANO8, APOA2, SLC2A2, PCTP, ERFE, SLC16A13, RGS4, GJA1, FABP4, SLC6A9, CLTRN, P2RY2, SLC25A23, PPARD	2.65176242	0.20059627		
GOTERM_BP_FAT	GO:0045089~positive regulation of innate immune response	12	7.48E-04	NLRX1, TKFC, CADM1, CLEC4N, TRIM30C, TRIL, EPG5, NOD1, SH2D1B1, H2-Q10, TLR2, GBP3	3.45404012	0.20059627		
GOTERM_BP_FAT	GO:0001501-skeletal system development	16	8.38E-04	PDGFRB, FBXW4, RARG, CADM1, GP1BB, FST, INSIG1, HAPLN4, MMP9, GJA1, SFRP1, FGF9, BGLAP3, SH3PXD2B, POC1A, PLS3	2.71959391	0.20059627		
GOTERM_BP_FAT	GO:0044724~single-organism carbohydrate catabolic process	8	9.46E-04	MGAM, ALDOART1, G6PC, TKFC, ALDOB, SIS, FBP1, XYLB	5.15153846	0.2005962		
GOTERM_BP_FAT	GO:0031347~regulation of defense response	20	9.52E-04	NLRX1, CADM1, CLEC4N, TRIM30C, TRIL, NOD1, USP18, IGHG2B, IL1RL1, GJA1, C6, TKFC, FABP4, CFHR2, EPG5, SH2D1B1, H2-Q10, PPARD, TLR2, GBP3	2.33344948	0.20059627		
GOTERM_BP_FAT	GO:0009968~negative regulation of signal transduction	27	9.64E-04	RIPORT, NLERX1, SERPINE2, INSIG1, USP18, LTBP1, ARHGAP35, RGS4, RGS5, IRNF213, TKFC, FGF9, PIP4K2B, GBP3, DUSP3, HEG1, FST, WTIP, DUSP8, MMP9, ENTREP1, SFRP1, SLC6A9, WNK2, SPRY1, RGS7BP, FBP1	1.99432721	0.20059627		
GOTERM_BP_FAT	GO:0010648-negative regulation of cell communication	29	0.0010116	RIPORT, NLERX1, SERPINE2, INSIG1, USP18, LTBP1, ARHGAP36, RGS4, RGS5, GJA1, RNF213, TKFC, FGF9, PIP4K2B, GBP3, DUSP3, HEG1, FST, WTIP, DUSP8, MMP9, ENTREP1, SFRP1, SLC6A9, WNK2, SPRY1, RGS7BP, FBP1, HCN1	1.92417107	0.20059627		
GOTERM_BP_FAT	GO:0023057~negative regulation of signaling	29	0.0010528	RIPORI, NLEX1, SERPINE2, INSIG1, USP18, LTBP1, ARHGAP35, RGS4, RGS5, GJA1, RNF213, TKFC, FGF9, PIP4K2B, GBP3, DUSP3, HEG1, FST, WTIP, DUSP8, MMP9, ENTREP1, SFRP1, SLC6A9, WNK2, SPRY1, RGS7BP, FBP1, HCN1	1.91910079	0.2005962		
Category	Pathway	Count	PValue	Genes	Fold Enrichment	EDB		
KEGG_PATHWAY	mmu04973:Carbohydrate digestion and absorption	5	0.00182973	MGAM, G6PC, SLC2A2, SLC2A5, SIS	9.407679739	0.36594534		
KEGG_PATHWAY	mmu00051:Fructose and mannose metabolism	4	0.00702654	ALDOART1, TKFC, ALDOB, FBP1	10.03485839	0.70265411		
KEGG_PATHWAY	mmu00010:Glycolysis / Gluconeogenesis	4	0.03698516	ALDOART1, G6PC, ALDOB, FBP1	5.391864208	1		
KEGG_PATHWAY	mmu00052:Galactose metabolism	3	0.04770677	MGAM, G6PC, SIS	8.466911765	1		
KEGG_PATHWAY	mmu00030:Pentose phosphate pathway	3	0.05042991	ALDOART1, ALDOB, FBP1	8.210338681			
KEGG PATHWAY	mmu01100:Metabolic pathways	25	0.05320787	UPT1 ALDOART1 UAP1 NPL TKEC DSEL ENPP4 PIP4K2B XVLB MGAM GUCN	1 39459110			
KEGG_PATHWAY	mmu03320:PPAR signaling pathway	4	0.07398627	FABP4, ACSL6, APOA2, PPARD	4.059043842	1		
KEGG_PATHWAY	mmu04610:Complement and coagulation cascades	4	0.08404812	C6, SERPINE2, CFHR2, C1QC	3.843137255	1		
-								

表 3. Enriched gene clusters in the duodenum of PD-fed mice

7. 参考文献

- Suzuki, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 631–659 (2013).
- 2. Van Der Flier, L. G. & Clevers, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 241–260 (2009).
- Hefele, M. *et al.* Intestinal epithelial Caspase-8 signaling is essential to prevent necroptosis during Salmonella Typhimurium induced enteritis article. *Mucosal Immunol.* 11, 1191–1202 (2018).
- 4. Obata, Y. *et al.* Epithelial Cell-Intrinsic Notch Signaling Plays an Essential Role in the Maintenance of Gut Immune Homeostasis. *J. Immunol.* **188**, 2427–2436 (2012).
- 5. Paone, P. & Cani, P. D. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: The expected slimy partners? *Gut* **69**, 2232–2243 (2020).
- Gallo, R. L. & Hooper, L. V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 503–516 (2012).
- Lin, R., Zhou, L., Zhang, J. & Wang, B. Abnormal intestinal permeability and microbiota in patients with autoimmune hepatitis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 5153–5160 (2015).
- 8. Tajik, N. *et al.* Targeting zonulin and intestinal epithelial barrier function to prevent onset of arthritis. *Nat. Commun.* **11**, 1995 (2020).
- 9. Buscarinu, M. C. *et al.* Intestinal Permeability in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics* **15**, 68–74 (2018).
- Kinashi, Y. & Hase, K. Partners in Leaky Gut Syndrome: Intestinal Dysbiosis and Autoimmunity. *Front. Immunol.* 12, 673708 (2021).
- Goto, Y., Uematsu, S. & Kiyono, H. Epithelial glycosylation in gut homeostasis and inflammation. *Nat. Immunol.* 17, 1244–1251 (2016).
- Goto, Y. *et al.* Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science* 345, 1254009 (2014).
- Martel, J. *et al.* Gut barrier disruption and chronic disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 33, 247–265 (2022).
- 14. Gong, J. *et al.* Epithelial-specific blockade of MyD88-dependent pathway causes spontaneous small intestinal inflammation. *Clin. Immunol.* **136**, 245–256 (2010).
- 15. Johansson, M. E. V. *et al.* Normalization of host intestinal mucus layers requires longterm microbial colonization. *Cell Host Microbe* **18**, 582–592 (2015).
- Cash, H. L., Whitham, C. V, Behrendt, C. L. & Hooper, L. V. Symbiotic Bacteria Direct Expression of an Intestinal Bactericidal Lectin. *Science* 1126–1131 (2006).
- 17. Feng, Y. et al. Antibiotics induced intestinal tight junction barrier dysfunction is

associated with microbiota dysbiosis, activated NLRP3 inflammasome and autophagy. *PLoS One* **14**, e0218384 (2019).

- Cummings, J. H. Fermentation in the Human Large Intestine: Evidence and Implications for Health. *Lancet* 321, 1206–1209 (1983).
- 19. Okada, T. *et al.* Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat. Commun.* **4**, 1654 (2013).
- Burger-van Paassen, N. *et al.* The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: Implications for epithelial protection. *Biochem. J.* 420, 211–219 (2009).
- 21. Park, J. H. *et al.* Promotion of intestinal epithelial cell turnover by commensal bacteria: Role of short-chain fatty acids. *PLoS One* **11**, e0156334 (2016).
- Kelly, C. J. *et al.* Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell Host Microbe* 17, 662– 671 (2015).
- 23. Lee, Y. S. *et al.* Microbiota-Derived Lactate Accelerates Intestinal Stem-Cell-Mediated Epithelial Development. *Cell Host Microbe* **24**, 833-846.e6 (2018).
- Desai, M. S. *et al.* A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* 167, 1339-1353.e21 (2016).
- Rohr, M. W., Narasimhulu, C. A., Rudeski-Rohr, T. A. & Parthasarathy, S. Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Adv. Nutr.* 11, 77–91 (2020).
- Ling, X., Linglong, P., Weixia, D. & Hong, W. Protective effects of bifidobacterium on intestinal barrier function in LPS-induced enterocyte barrier injury of Caco-2 monolayers and in a rat NEC model. *PLoS One* 11, e0161635 (2016).
- Lam, Y. Y. *et al.* Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice. *PLoS One* 7, e34233 (2012).
- 28. Lam, Y. Y. *et al.* Effects of dietary fat profile on gut permeability and microbiota and their relationships with metabolic changes in mice. *Obesity* **23**, 1429–1439 (2015).
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Neyrinck, A. M. & Delzenne, N. M. Changes in gut microbiota control metabolic diet–induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470–81 (2008).
- 30. 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).
- 31. Pendyala, S., Walker, J. M. & Holt, P. R. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology* **142**, 1100-1101.e2 (2012).

- Pellizzon, M. Choice of laboratory animal diet influences intestinal health. *Lab Anim.* (NY). 45, 238–239 (2016).
- Schipke, J., Brandenberger, C., Vital, M. & Mühlfeld, C. Starch and Fiber Contents of Purified Control Diets Differentially Affect Hepatic Lipid Homeostasis and Gut Microbiota Composition. *Front. Nutr.* 9, 915082 (2022).
- 34. Hou, Y. *et al.* A diet-microbial metabolism feedforward loop modulates intestinal stem cell renewal in the stressed gut. *Nat. Commun.* **12**, 271 (2021).
- 35. Yakabe, K. *et al.* Dietary-protein sources modulate host susceptibility to Clostridioides difficile infection through the gut microbiota. *Cell Rep.* **40**, 111332 (2022).
- 36. Taylor, S. R. *et al.* Dietary fructose improves intestinal cell survival and nutrient absorption. *Nature* **597**, 263–267 (2021).
- 37. Kimura, S. *et al.* Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: Suppression of their maturation in cecal patches. *Mucosal Immunol.* **8**, 650–660 (2015).
- 38. Ishihara, N. *et al.* Spi-B alleviates food allergy by securing mucosal barrier and immune tolerance in the intestine. *Front. Allergy* **3**, 996657 (2022).
- Dobin, A. *et al.* STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21 (2013).
- 40. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
- 41. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2009).
- 42. Komiyama, S. *et al.* Profiling of tumour-associated microbiota in human hepatocellular carcinoma. *Sci. Rep.* **11**, 10589 (2021).
- 43. Glöckner, F. O. *et al.* 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *J. Biotechnol.* **261**, 169–176 (2017).
- 44. Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**, 590–596 (2013).
- 45. Yilmaz, P. *et al.* The SILVA and 'all-species Living Tree Project (LTP)' taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* **42**, 643–648 (2014).
- 46. Furusawa, Y. *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**, 446–50 (2013).
- 47. Isobe, J. *et al.* Commensal-bacteria-derived butyrate promotes the T-cell-independent IgA response in the colon. *Int. Immunol.* **32**, 243–258 (2020).
- 48. Shiratori, H. *et al.* Gut microbiota-derived lipid metabolites facilitate regulatory T cell differentiation. *Sci. Rep.* **13**, 1–12 (2023).
- 49. Talbot, J. et al. Feeding-dependent VIP neuron-ILC3 circuit regulates the intestinal

barrier. Nature 579, 575-580 (2020).

- Pawlak, M., Lefebvre, P. & Staels, B. Molecular mechanism of PPARα action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. J. Hepatol. 62, 720–733 (2015).
- Mihaylova, M. M. *et al.* Fasting Activates Fatty Acid Oxidation to Enhance Intestinal Stem Cell Function during Homeostasis and Aging. *Cell Stem Cell* 22, 769-778.e4 (2018).
- 52. Carroll, D. J. *et al.* Interleukin-22 regulates B3GNT7 expression to induce fucosylation of glycoproteins in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **298**, 101463 (2022).
- Terahara, K. *et al.* Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 822–828 (2011).
- 54. Kamioka, M. *et al.* Intestinal commensal microbiota and cytokines regulate Fut2+ Paneth cells for gut defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **119**, e2115230119 (2022).
- 55. Kaji, I. *et al.* Cell differentiation is disrupted by MYO5B loss through Wnt/Notch imbalance. *JCI Insight* **6**, e150416 (2021).
- 56. Sato, T. *et al.* Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **469**, 415–418 (2011).
- 57. Shi, Z. *et al.* Segmented Filamentous Bacteria Prevent and Cure Rotavirus Infection. *Cell* **179**, 644–658 (2019).
- 58. Brooks, J. F. *et al.* The microbiota coordinates diurnal rhythms in innate immunity with the circadian clock. *Cell* **184**, 4154–4167 (2021).
- Ivanov, I. I. *et al.* Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell* 139, 485–498 (2009).
- 60. Sommer, F. & Bäckhed, F. The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 227–238 (2013).
- Ayivi, R. D. *et al.* Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy* 1, 202–232 (2020).
- Ngo, V. L., Shi, Z., Jiang, B. & Gewirtz, A. T. Segmented filamentous bacteria impede rotavirus infection via retinoic acid receptor-mediated signaling. *Gut Microbes* 15, 2174407 (2023).
- 63. Woo, V. *et al.* Commensal segmented filamentous bacteria-derived retinoic acid primes host defense to intestinal infection. *Cell Host Microbe* **29**, 1744-1756.e5 (2021).
- 64. Weickert, M. O. & Pfeiffer, A. F. H. Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *J. Nutr.* **138**, 439–442 (2008).
- 65. Adam, C. L., Williams, P. A., Garden, K. E., Thomson, L. M. & Ross, A. W. Dose-

dependent effects of a soluble dietary fibre (pectin) on food intake, adiposity, gut hypertrophy and gut satiety hormone secretion in rats. *PLoS One* **10**, e0115438 (2015).

- Parnell, J. A. & Reimer, R. A. Prebiotic fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroidetes and Firmicutes in lean and obese JCR:LA-cp rats. *Br. J. Nutr.* 107, 601–613 (2012).
- Mukherjee, S. & Hooper, L. V. Antimicrobial Defense of the Intestine. *Immunity* 42, 28– 39 (2015).
- Comstock, L. E. & Kasper, D. L. Bacterial Glycans: Key Mediators of Diverse Host Immune Responses. *Cell* 126, 847–850 (2006).
- 69. Aparicio-Domingo, P. *et al.* Type 3 innate lymphoid cells maintain intestinal epithelial stem cells after tissue damage. *J. Exp. Med.* **212**, 1783–1791 (2015).
- 70. Lindemans, C. A. *et al.* Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature* **528**, 560–564 (2015).
- 71. Zha, J. M. *et al.* Interleukin 22 Expands Transit-Amplifying Cells While Depleting Lgr5
 + Stem Cells via Inhibition of Wnt and Notch Signaling. *Cmgh* 7, 255–274 (2019).
- Zwarycz, B. *et al.* IL22 Inhibits Epithelial Stem Cell Expansion in an Ileal Organoid Model. *Cmgh* 7, 1–17 (2019).
- Rodríguez, J. C., Gil-Gómez, G., Hegardt, F. G. & Haro, D. Peroxisome proliferatoractivated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J. Biol. Chem.* 269, 18767–18772 (1994).
- Sugden, M. C. & Holness, M. J. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am. J. Physiol. -Endocrinol. Metab.* 284, E855-62 (2003).
- Gajda, A. M. & Storch, J. Enterocyte fatty acid-binding proteins (FABPs): Different functions of liver and intestinal FABPs in the intestine. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 93, 9–16 (2015).
- Huang, X., Zhou, Y., Sun, Y. & Wang, Q. Intestinal fatty acid binding protein: A rising therapeutic target in lipid metabolism. *Prog. Lipid Res.* 87, 101178 (2022).
- 77. Wolfrum, C., Borrmann, C. M., Börchers, T. & Spener, F. Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors α- and γ-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: A signaling path to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2323–2328 (2001).

8. 謝辞

本博士論文研究において、ご指導ご鞭撻を賜りました慶應義塾大学薬学部生化学講座 の長谷耕二教授、木村俊介准教授、髙橋大輔専任講師、土肥多惠子客員教授、鈴木功一 郎特任助教、小口宙之特任助教に感謝いたします。また、実験のサポートしてくださっ た服部 (室井) きさらさん、大川拓眞君、込山星河君、木梨祐輔君、株本祐磨君、兼子 友里朱さん、藤村由美子様、中村篤央様、石原成美さん、杉山ひなたさんに感謝します。

本研究は、国立研究開発法人 国立国際医療研究センター研究所 臨床連携研究室との 共同研究により行いました。河村由紀室長、中田一彰博士に感謝します。

また、電子顕微鏡写真の撮影にご協力いただいた、慶應義塾大学医学部電子顕微鏡研 究室の信藤知子様、盛一伸子様に感謝いたします。

本研究の一部は、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム、および博士課程学生研究 支援プログラムによる助成を用いて行いました。ご支援いただきました、科学技術振興 機構 (JST) および慶應義塾大学に感謝いたします。

最後に、日常生活において多大なご支援をしてくださった、家族に心から感謝いたし ます。