

腸内フローラ代謝産物による概日時計制御

田原 優

早稲田大学先進理工学部 助手
(現 早稲田大学高等研究所 助教)

緒言

概日時計とは、約24時間のリズム性をもった生理機構であり、睡眠・覚醒、ホルモン分泌、体温変動など、様々な機能を制御することで、恒常性維持に重要な役割を担っている。食・栄養は概日時計の時刻調節に重要であるが、その作用経路は未解明な部分が多い。近年、腸内細菌叢自体に日内変動が認められること^{1,2)}、また免疫系を介した腸内細菌による宿主の概日時計制御があることが報告され³⁾、腸内環境と宿主の相互作用に注目が集まりつつある。そこで本研究では、腸内細菌叢が代謝・産生する短鎖脂肪酸に着目し、食・栄養による概日時計制御の新たなメカニズム解明を目的とした。

結果

実験1 短鎖脂肪酸による概日時計同調

腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸である酢酸、酪酸、乳酸、プロピオン酸の混合溶液 (SCFA Mix) を、PER2::LUC knock-in マウスに経口投与し、肝臓・腎臓・顎下腺の概日時計変化をインビボ概日時計測定法により評価した⁴⁾。実際には、麻酔下のPER2::LUCマウス (時計遺伝子 *Per2* の下流にホタル *Luciferase* 遺伝子が挿入されたマウス) にルシフェリンを皮下投与し、インビボ・イメージング

装置にて臓器の発光を計測する作業を、4時間おきに24時間繰り返すことで、PER2の発光リズムを得た。SCFAの経口投与は、概日時計をイレギュラーな時刻に変化させやすい時刻、つまりマウスの非活動期である明期に行った。この時刻は、絶食-再給餌実験でも概日時計を動かしやすい時刻である。4日間、ZT5 (ZT0は明期開始時刻と定義) にSCFA Mix (各400 mM, 0.1 ml/10 g mouse, p.o.) を投与した結果、腎臓、肝臓の概日時計は有意にピーク時刻の前進を認めた (図1)。つまり概日時計の時刻が早まったことを示す。さらに、もとから産生されている短鎖脂肪酸の効果を排除するために、腸内細菌除去マウスを、抗生物質 Mix 水を1ヵ月自由飲水させることで作成し、同様の実験を行った。その結果、SCFA 投与により位相前進効果が見られ、その変化は通常飼育マウスよりも大きいことがわかった。

次に、それぞれの短鎖脂肪酸を別々に投与し、概日時計の変化を解析した。その結果、腎臓では酪酸・酢酸・乳酸・プロピオン酸が、肝臓では乳酸・酢酸、プロピオン酸が、また顎下腺では酢酸・酪酸・プロピオン酸が、SCFA Mix と同じく概日時計の位相前進を示した。

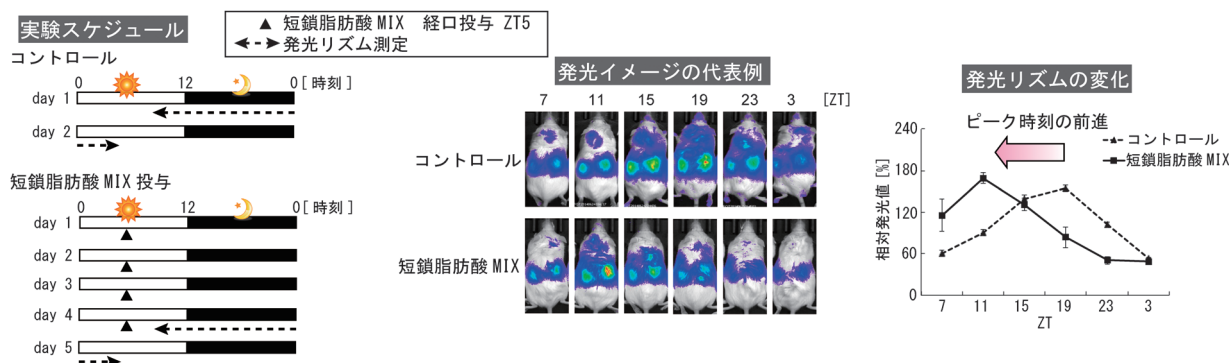


図1 短鎖脂肪酸の経口投与による腎臓の末梢時計変化

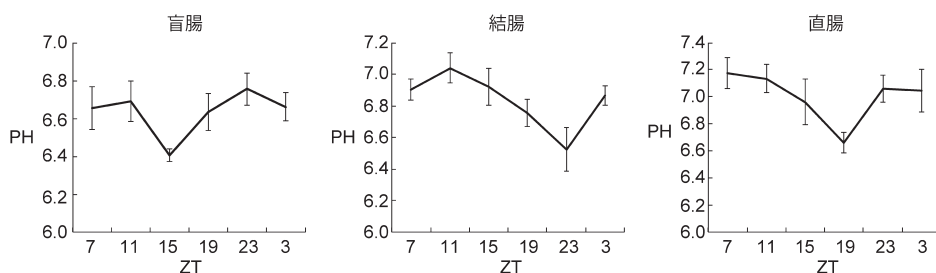


図2 盲腸・大腸におけるPHの日内変動

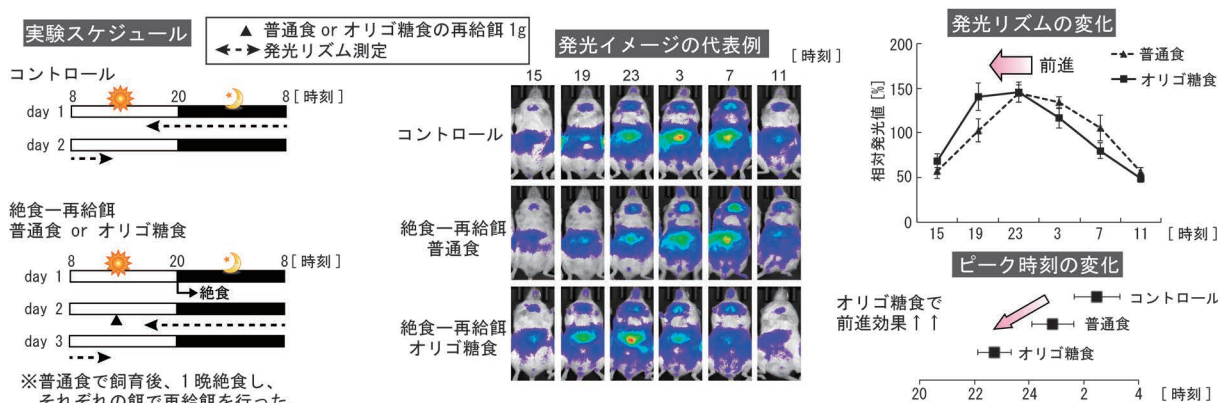


図3 オリゴ糖給餌による肝臓の末梢時計リセット効果

実験2 盲腸、大腸におけるPHの日内変動

夜行性のマウスの食餌パターンに相関して、腸内細菌による短鎖脂肪酸にも日内変動があるのかどうか、盲腸、大腸におけるPHを指標に解析した (PHが低いと短鎖脂肪酸濃度が高い)。その結果、図2に示すように盲腸ではZT15に、結腸ではZT23に、直腸ではZT19に、PHが一番低くなることがわかった。また、非活動期である明期では、どの臓器においてもPHは高い値を維持していることがわかった。

実験3 セロビオース食による概日時計同調効果

短鎖脂肪酸の産生増加を期待して、オリゴ糖食 (セロビオース食) を給餌した際の概日時計への影響を解析した。1晩絶食後、ZT5に標準食 (AIN-93M) またはセロビオース食 (AIN-93Mのセルロースを置換) を1g再給餌させて、その後すぐに末梢臓器の概日時計をインビボ概日時計測定法にて解析した。その結果、肝臓では、セロビオース食群が標準食群に比べ、概日時計の位相前進が大きかった (図3)。つまり、セロビオース食により、食餌による概日時計リセット効果が増強したことを示す。

考 察

実験1より、短鎖脂肪酸が宿主の概日時計の時刻調節作用を持つことが明らかとなった。今後は、投与タイミングや濃度依存性の検討、さらには他の短鎖脂肪酸 (コハク酸やギ酸など) の検討を行う必要があると考えている。一方で、それぞれの脂肪酸には特定の作用が報告されている。例えば酪酸によるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害効果などがある。そこでSCFAのどの酸が概日時計変化に重要なのか解析した。しかし結果は、どの酸でも同様の概日時計変動が見られたことから、特定の短鎖脂肪酸による作用ではないと考えた。現在考えている作用メカニズムとしては、短鎖脂肪酸の受容体であるGPR41、43を介した経路、または短鎖脂肪酸によるPH低下を介した経路等を検討している。実際に、GPR41、43のシグナル経路活性化は、インクレチンによるインスリンシグナルの増強を引き起こすことが知られている⁵⁾。またインスリンが概日時計の時刻調節作用を持つことは当研究室が報告している⁶⁾。また、培養細胞において、PHの変化が概日時計の時刻変化を及ぼすことも報告されている⁷⁾。よって今後はこれらの可能性を追求する。

盲腸、大腸内のPHに日内変動が見られたことから、今後はHPLCを用いた短鎖脂肪酸解析を行っていく。また、非活動期である明期はPHが常に高いことから、その時間帯はSCFA産生が少ないと考えられる。実験1では、まさにそのタイミングでSCFAを投与したので、いつもと違うタイミングでSCFA濃度が高まったために、概日時計の時刻変動が起きたと考えられた。

腸内環境の改善方法として、難消化性のフラクトオリゴ糖などによるプレバイオティクスが有効である。本研究でも、二糖類のオリゴ糖であるセロビオースの効果を検証した。その結果、標準食に比べ、セロビオース食にて概日時計の時刻応答が大きい結果を得ることができた。食による体内時計の健康維持として、時間栄養学が近年話題である⁸⁾。本実験結果は、朝食としてオリゴ糖食を食べることで、朝食による概日時計リセット効果を高められる可能性を示している。今後は、オリゴ糖食を長期間摂取し続けた場合の概日時計変化などを検討していく。

要 約

腸内細菌の代謝・産生する短鎖脂肪酸の経口投与は、概日時計の時刻調節に有効であることがわかった。短鎖脂肪酸の産生には日内変動が存在し、寝ている時刻ではその産生が少ない。プレバイオティクスにより、概日時計の時刻調節作用を強められることがわかった。以上の結果は、腸内細菌叢を介した宿主の概日時計調節機構の新しい経路解明に繋がると期待できる。

謝 辞

本研究は、公益財団法人三島海雲記念財団学術研究奨励金により支援を受け行われたものです。研究助成を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) C. A. Thaiss, et al.: *Cell*, **159**, 514–529, 2014.
- 2) A. Chaix, et al.: *Cell Metab.*, **20**, 991–1005, 2014.
- 3) L. Henao-Mejia, et al.: *Cell*, **153**, 741–743, 2013.
- 4) Y. Tahara, et al.: *Curr Biol.*, **22**, 1029–1034, 2012.
- 5) I. Kimura, et al.: *Nat. Commun.*, **4**, 1829, 2013.
- 6) Y. Tahara, et al.: *J. Biol. Rhythms*, **26**, 230–240, 2011.
- 7) N. Kon, et al.: *Nat. Cell Biol.*, **10**, 1463–1469, 2008.
- 8) Y. Tahara, S. Shibata: *Neuroscience* **253**, 78–88, 2013.