

# 概日時計と腸内環境のホメオスタシス

村上 真理

カリフォルニア大学アーバイン校 博士研究員

## 緒言

食は健康を左右する重要な因子であり、糖尿病や高脂血症、高血圧などメタボリック症候群に代表される生活習慣病の多くは長年の食習慣によってもたらされると言っても過言ではない。したがって、特定の食習慣がいかに疾病発症に関与するかを明らかにすることは、生活習慣病の蔓延する現代社会における重要な課題である。

食事内容は腸内細菌叢の構築に寄与し<sup>1)</sup>、ある種の腸内細菌種は宿主のエネルギー代謝を調節することが知られている<sup>2)</sup>。すなわち食品は、栄養成分による直接的作用のみならず、腸内環境を介した間接的作用によっても代謝に影響を与える。

一方、エネルギー代謝機構は概日リズムによる制御を受けている。概日時計が様々な生体機能に日内リズムを生み出すことにより、個体は変動する外的環境へ効率的に適応することが可能となり、生体の恒常性が維持される。さらに、代謝と概日時計は互いに制御されており、高脂肪食の摂取は概日リズムの乱れを惹起することが報告されている<sup>3,4)</sup>。

以上の背景より我々は、腸内細菌叢が概日時計を介して宿主エネルギー代謝を調節しているのではないかと考えた。この仮説を検証するため、本研究では高脂肪食摂取マウスをモデルとし、腸内環境と宿主概日リズムおよび代謝調節の関係について検証を行った。

## 実験方法

コントロール食 (CC) あるいは高脂肪食 (HFD) を6週間以上摂取させたマウスをドナー、C57BL6 SPFマウス (雄12週齢) をレシピエントとし、胃管経路にてドナー由来腸内細菌叢の移植を行った。全期間を通じ、レシピエントマウスにはCCを摂取させた。移植終了2週間後、4時間ごとにレシピエントマウスより肝組織を採取し、CC摂取ドナー由来腸内細菌叢移植群 (CC-R)、HFD摂取ドナー由来腸内細菌叢移植群 (HF-R) について両群間の比較解析を行った。

## 結果

### 1. 腸内細菌移植によりドナー表現型が再現される

腸内細菌叢移植によりドナー表現型が再現されるかどうかを検証するため、肝および脂肪組織の解析を行った。HF-RではCC-Rに比較し、肝脂肪染色において脂肪滴の蓄積を認め、精巣上体脂肪量は有意に増加し、これらはHFD摂取ドナー表現型と一致するものであった。次に、16S rRNA Sequencing法を用いたレシピエントの腸内細菌叢組成の解析を行った。数種のspeciesにおいて両群間に差を認め、さらにPCoA解析ではCC-RとHF-Rでは異なるクラスタリングを認めた。以上の結果から、腸内細菌移植実験によって両群間に異なる腸内環境がもたらされ、ドナー表現型が一部再現されることが確認できた。

### 2. 腸内細菌叢移植により時計遺伝子の発現パターンが変化する

次に腸内細菌叢の違いにより、エネルギー代謝の中心的器官の一つである肝臓において時計遺伝子の発現がいかに影響を受けるかについて解析を行った。高脂肪食摂取により時計遺伝子の振幅の減衰と位相のずれが生じることが報告されている<sup>3,4)</sup>。興味深いことに、HF-RではCC-Rに比較し、時計遺伝子発現およびBMALリン酸化蛋白発現において、軽度の位相前方偏移が認められ、これは高脂肪食摂取時の時計遺伝子の発現パターンに極めて類似していた。一方、高脂肪食摂取時と同様、これらの時計遺伝子のリズム形成は保たれており、頑強性を示す結果であった。

そこで腸内細菌移植により、遺伝子発現に生じる変化をよりグローバルに検証するため、レシピエント肝を用い、ZT0 (明期開始時間, ZT; zeitgeber) とZT12 (暗期開始時間) におけるtranscriptome解析を行った。各時間帯において、それぞれCC-RとHF-R間で発現レベルに有意差がある遺伝子を抽出し、それぞれの遺伝子群についてKEGGパスウェイ解析を行った。ZT0では各

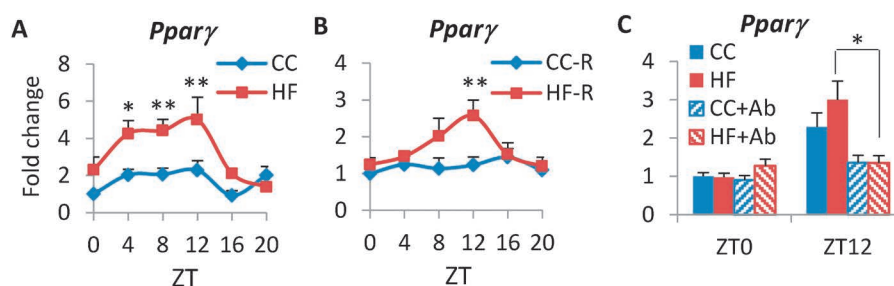


図1 食餌および腸内細菌叢が肝脂質代謝関連遺伝子に及ぼす影響

(A, B) qPCR法による (A) ドナー肝および (B) レシピエント肝の *Ppary* 発現を示す (donors:  $n=5$ , recipients:  $n=5-12$ ). (C) 抗生剤 (Ab) 投与6週間投与後の肝 *Ppary* 発現を示す ( $n=4-9$ ).

Mean  $\pm$  SEM, two-way ANOVA, post hoc Holm-Sidak comparisons \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

グループに特異的なカテゴリーを認めなかったのに対し、ZT12においてはHF-R上昇群、CC-R上昇群それぞれが特異的パスウェイによって占められていた。すなわち、ZT12においてHF-Rで有意に上昇する群は主に脂質代謝関連経路で占められ、これはこの群に特異的であった。このことから、腸内細菌叢移植が及ぼす宿主 transcriptome への影響は、ZT 依存的であることが示唆された。さらに、腸内細菌叢の宿主代謝への影響について検証するため、肝メタボローム解析を行ったところ、HF-R群で有意に上昇する代謝物の半数以上が長鎖脂肪酸であり、transcriptomeの結果と合致するものであった。以上のことから、脂質代謝系経路が高脂肪食摂取ドナーの腸内細菌叢によって影響を受ける主な生体プロセスであり、さらにこのプロセスが概日リズムに沿って誘導されることが示唆された。

### 3. 高脂肪食による腸内細菌叢の変化は肝PPAR $\gamma$ のリズム獲得に寄与する

我々は以前、高脂肪食摂取によってPPAR $\gamma$ のクロマチンへのリクルートメントに概日リズムが生じ、これにより周期性の肝リプログラミングが生じることを報告した<sup>4)</sup>。PPAR $\gamma$ の発現は通常、脂肪組織が主であるが、脂肪肝や肥満では肝臓でも誘導され、その病態に関与している。レシピエントマウス肝の網羅的解析の結果から、我々は高脂肪食による肝臓でのPPAR $\gamma$ 誘導性リプログラミングに腸内細菌叢が寄与するのではないかと考え、レシピエント肝における *Ppary* およびPPAR $\gamma$  標的遺伝子の発現を4時間ごとにqPCR法にて検証した。興味深いことに、ドナー肝同様、レシピエント肝においても、CC-R群では *Ppary* および標的遺伝子に明瞭な摂動を認めなかったが、HF-R摂取群ではZT12をピークとした

摂動が生じた (図1A, B)。次に核内PPAR $\gamma$ の発現をimmunoblot法にて確認したところ、HF-RでのZT12を頂値とした摂動を認め、遺伝子発現の結果と合致した。さらに、クロマチン免疫沈降法にてPPAR $\gamma$  標的遺伝子への結合を確認したところ、ZT12においてHF-RではCC-Rに比較しPPAR $\gamma$ の結合の有意な上昇を認めた。以上の結果から、高脂肪食摂取にて誘導されたPPAR $\gamma$ によるリプログラミングが腸内細菌移植によって再現されることが明らかになった。

次に、高脂肪食による‘nutritional effect’ と ‘microbial effect’ に共通するメカニズムを追究するため、既報の高脂肪食負荷マウスの transcriptome データと当研究のデータの比較解析を行った。すなわち、ZT0、ZT12にてHFドナーとCCドナー、HF-RとCC-Rの発現レベルをそれぞれ比較した。ZT12において、ドナー、レシピエントともにHFD群で有意に上昇する遺伝子群についてパスウェイ解析を行ったところ、脂質代謝関連経路に集約された。そこで、この遺伝子群を既報のPPAR $\gamma$ のChIP-Seqのデータと照合したところ、10%強の遺伝子がPPAR $\gamma$ の標的遺伝子であった。肝臓に誘導されたPPAR $\gamma$ は脂肪酸代謝経路を促進する一方、脂質合成系遺伝子の発現を誘導する。実際に、HF-Rでは核内SREBP1およびその下流遺伝子の発現が有意に上昇し、それらの酵素によって生成される種々の長鎖脂肪酸がメタボローム解析によって上昇しており、HF-Rの表現型を裏付ける結果であった。

最後に、PPAR $\gamma$ によるリプログラミングに腸内細菌叢の存在が寄与していることを確認するため、CCあるいはHFDを摂取させたマウスに広域スペクトラムを有する抗生剤を投与することにより、腸内細菌叢の除菌を行った。その結果、抗生剤投与群においてZT12におけ

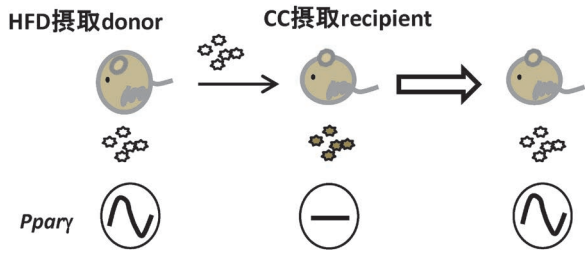


図2 腸内細菌叢は高脂肪食摂取によって誘導される肝Pparγのリズム獲得に寄与する

る高脂肪食誘導性のPPAR $\gamma$ および標的遺伝子群の発現上昇が抑えられた (図1C)。以上の結果から、高脂肪食摂取による概日リズムに沿ったPPAR $\gamma$ リプログラミングが腸内細菌叢を介して制御されることが確認できた。

## 考 察

近年、腸内細菌が宿主のエネルギー代謝を調節することが明らかになってきている。代謝と概日時計機構は相互制御の関係にあることから、腸内環境と宿主概日時計との関連性が広く注目を集め始めている。最近の報告では、腸内細菌叢の組成が日内変動すること<sup>5)</sup>や、腸内細菌叢由来の代謝物質が宿主概日時計の維持に関与する可能性<sup>6)</sup>が示唆されている。しかしながら、腸内細菌叢がどのように宿主transcriptomeの概日リズムに影響を与え、システム全体の代謝を制御するかということについては明らかではない。一方、核内レセプターは日内変動する代謝物質を感知することにより、概日リズムとエネルギー代謝を結ぶ重要な役割を果たしており、PPAR $\gamma$ はその中心的な役割を担っている<sup>7)</sup>。

当研究では高脂肪食による周期性PPAR $\gamma$ リプログラ

ミングが部分的に腸内細菌叢の変化を介して誘導されることを明らかにした (図2)。さらにこの効果は除菌により抑制されることから、腸内細菌叢が栄養負荷に対する細胞の可塑性に寄与することが示された。

## 要 約

肝臓の概日リズムが腸内細菌叢によって制御されるメカニズムを解明した。すなわち、高脂肪食摂取による腸内環境の変化は、肝臓におけるPPAR $\gamma$ およびその下流遺伝子の周期的な発現を広範に誘導し、宿主の肝脂質代謝を調節する。当研究で得られた新しい知見は、食習慣の改善に基づく疾病予防、および腸内環境の制御をターゲットとした技術開発の基盤となることが期待される。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に深謝申し上げます。なお、本研究内容は現在学術誌への投稿準備中であることを申し添えます。

## 文 献

- 1) L. A. David, et al.: *Nature*, **505**, 559–563, 2014.
- 2) E. Holmes, et al.: *Cell Metab.*, **16**, 559–564, 2012.
- 3) A. Kohsaka, et al.: *Cell Metab.*, **6**, 414–421, 2007.
- 4) K. L. Eckel-Mahan, et al.: *Cell*, **155**, 1464–1478, 2013.
- 5) C. A. Thaiss, et al.: *Cell*, **159**, 514–529, 2014.
- 6) V. Leone, et al.: *Cell Host Microbe*, **17**, 681–689, 2015.
- 7) M. Kawai, C. J. Rosen: *Nat. Rev. Endocrinol.*, **6**, 629–636, 2010.