

腸内細菌叢の変動に焦点を当てた高タンパク食摂取による健康増進効果と病態発症効果の違い

島根大学 生物資源科学部
清水 英寿

1. 研究の目的と背景

近年、我が国の食習慣は大きく変化してきており、動物性タンパク質の摂取源として、魚類から牛肉や豚肉等の赤肉や加工肉へと変化している。牛肉や豚肉由来の食肉の高摂取は、健康促進効果を有している事が知られており、貧血・肥満改善や健康寿命の延長に寄与するとされてきた。しかし一方で、我が国で発症数が増加している炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎・クローン病）や大腸ガンにも、赤肉や加工肉の消費増大が関与している。この様に、高食肉摂取には、「健康促進」と「病態発症」という功罪が知られているが、これら効果の違いに対するメカニズムの相違について、不明な点が非常に多い。当研究グループでは、高食肉摂取による「健康促進」と「病態発症」の分岐点として、腸内環境状態によって変動する「インドール酢酸/スカトール」の比率が関与していると仮説を立て研究を進めている。現在までに、スカトールが病態発症・進展への関与を示唆する結果を得ている事から、本研究では、腸管に対するインドール酢酸の作用効果と、腸内におけるインドール酢酸からスカトールへの変換に関わる因子を同定する事を目的とする。

2. 研究の方法

<細胞培養>

培養ヒト腸管細胞であるCaco-2細胞を用いた。解析には、 2×10^5 cells/dishで3.5 cm dishに播種し、細胞がdishに接着後、無血清培地を用いて24時間のスタベーションを行った。

<Real-time PCR>

スタベーション後、1000 μ Mのインドール酢酸添加培地を用いて2日おきに培地交換を行い、合計8日間、Caco-2細胞を培養した。細胞からセパゾール RNA I Super Gを用いてmRNAを抽出した後、PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) で逆転写反応を行った。その後、Cyp1A1, PPAR γ , Cdx2, SLC23A3, IL-6, TNF α の発現量を、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) を用いて定量 real-time PCR 法で測定した。内部標準として、36B4を用いた。Table 1に、各遺伝子のプライマー配列を示す。

Table 1. 各遺伝子のプライマー配列

Gene	Primer sequence
Cyp1A1	Fw: 5'-ACATGCTGACCCCTGGGAAAG-3' Rv: 5'-GGTGTGGAGCCAATTCGGAT-3'
PPARγ	Fw: 5'-ACCAAAGTGCAATCAAAGTGGGA-3' Rv: 5'-ATGAGGGAGTTGGAAGGCTCT-3'
Cdx2	Fw: 5'-TTCACACTACAGTCGCTACATCACC-3' Rv: 5'-TTGTTGATTTTCTCTCCTTTGC-3'
SLC26A3	Fw: 5'-CCGATTCTGAGTATGATGGTGG-3' Rv: 5'-AGTTGCATTGCGATCTGGGAC-3'
IL-6	Fw: 5'-CCTGAACCTTCCAAGATGGC-3' Rv: 5'-TTCACCAGGCAAGTCTCCTCA-3'
TNFα	Fw: 5'-GAGGCCAAGCCCTGGTATG-3' Rv: 5'-CGGGCCGATTGATCTCAGC-3'
36B4	Fw: 5'-CGACCTGGAAGTCCAACACTAC-3' Rv: 5'-ATCTGCTGCATCTGCTTG-3'

< Western blotting >

スタベーション後、各時間で1000 μ Mのインドール酢酸を細胞に処理した。細胞からタンパク質を抽出後、SDS-PAGEを行った。その後、ゲルからPVDFメンブレンへ分離したタンパク質を転写した後、phospho-ERK抗体、phospho-p38抗体、phospho-JNK抗体、phospho-Akt抗体、phospho-p65 NF- κ B抗体、phospho-AMPK抗体、phospho-PKA抗体を用いて抗体反応を行い、各種タンパク質のリン酸化（活性化）レベルを確認した。内部標準として、 α -tubulinを用いた。

<動物実験>

10～11週齢のWKAHラットを、精製食であるAIN93Gを用いて5日間予備飼育した後、コントロール群と0.05%コル酸添加食摂取群の2群に分け2週間飼育を行った。その後さらに、コントロール群、0.05%インドール酢酸添加食群、0.05%コル酸添加食群、0.05%インドール酢酸+0.05%コル酸添加食群の4群に分け、2週間の飼育を行った。飼育の際に使用した各飼料の組成を、Table 2に示す。解剖の際に採取した、肝臓、腎臓、副睾丸脂肪については、それぞれの組織重量を測定した。盲腸については採取後、その内容物のpHを調べた。

Table 2. 餌の組成

g / kg diet	Control	CA	IAA	CA+IAA
Cornstarch	397.5	397.5	397.5	397.5
Casein	200.0	200.0	200.0	200.0
Dextrin	132.0	132.0	132.0	132.0
Sucrose	100.0	99.75	99.75	99.5
Soybean oil	70.0	70.0	70.0	70.0
Mineral mixture	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamin mixture	10.0	10.0	10.0	10.0
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
L-Cystine	3.0	3.0	3.0	3.0
Cellulose	50.0	50.0	50.0	50.0
Cholic acid	0	0.5	0	0.5
Indole acetic acid	0	0	0.5	0.5

3. 研究内容

インドール酢酸処理によって、腸管細胞内で活性化に変動が観察される細胞内シグナル伝達分子、発現変動が導かれる遺伝子を明らかにする。さらに、腸内環境の悪化要因である消化管内での胆汁酸増加がインドール酢酸からスカトールへの代謝を促進するのか、実験動物を用いて検証を行う。

4. 研究の実施経過

4-1. 培養腸管細胞を用いた解析

インドール酢酸は AhR のリガンドと報告されている事から¹⁾、インドール酢酸が Caco-2 細胞に作用するのか、AhR の代表的な標的遺伝子である Cyp1A1 の mRNA 量を指標に確認を行った。その結果、インドール酢酸刺激により Cyp1A1 の mRNA は増加していた事から (Figure 1)、インドール酢酸は少なくとも AhR の活性化を介して、Caco-2 細胞に作用している事が示唆された。続いて、炎症性腸疾患や大腸ガンの発症・進展に対して抑制的に作用する PPAR γ と Cdx2 の mRNA 量について調べたところ、PPAR γ はインドール酢酸刺激によって僅かに発現量が低下したが、Cdx2 については有意に発現量が上昇していた (Figure 1)。さらに、Cdx2 の標的遺伝子の 1 つと報告されている SLC26A3 についても²⁾、有意にその発現量が増加していた。加えて Cdx2 は、NF- κ B の p65 サブユニットと結合する事で、NF- κ B の標的遺伝子の発現量を低下させる事が明らかとなっている³⁾。そこで、NF- κ B の代表的な標的遺伝子である IL-6 と TNF α の mRNA 量を調べたところ、両遺伝子の mRNA 量はインドール酢酸刺激によって有意に減少していた (Figure 1)。

次に、インドール酢酸刺激によってリン酸化 (活性化) レベルが変化する細胞内シグナル伝達分子について検証を行った。その結果、MAP キナーゼファミリーである ERK, p38, JNK のリン酸化レベルがインドール酢酸刺激によって時間依存的に減弱した。一方、代表的な生存シグナルである Akt については、そのリン酸化レベルの亢進が確認された (Figure 2A)。Figure 1 において、IL-6 と TNF α の発現低下がインドール酢酸処理によって認め

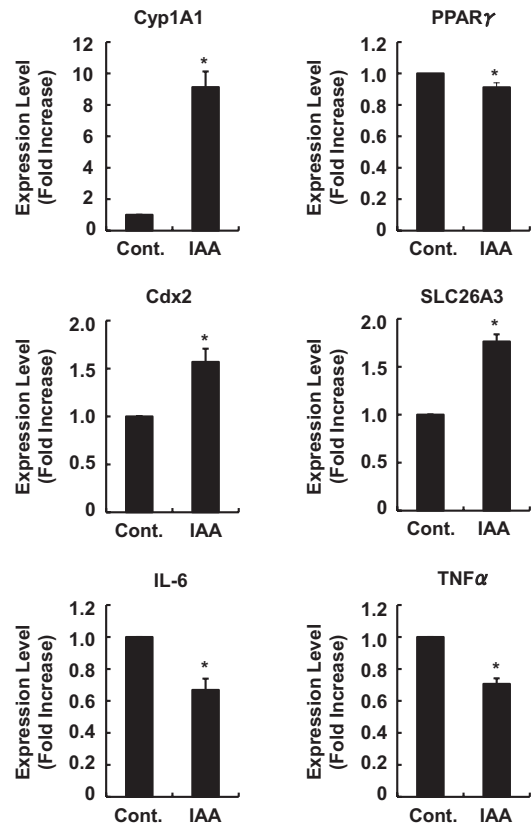


Figure 1. 各遺伝子の発現変動に対するインドール酢酸の影響。

各遺伝子の mRNA 量を 36B4 mRNA 量で補正し、DMSO 処理時の各遺伝子の発現量を 1 とし、 \pm 標準誤差で表した (n=5, p < 0.05 vs. Cont.). Cont.: Control, IAA: Indole acetic acid.

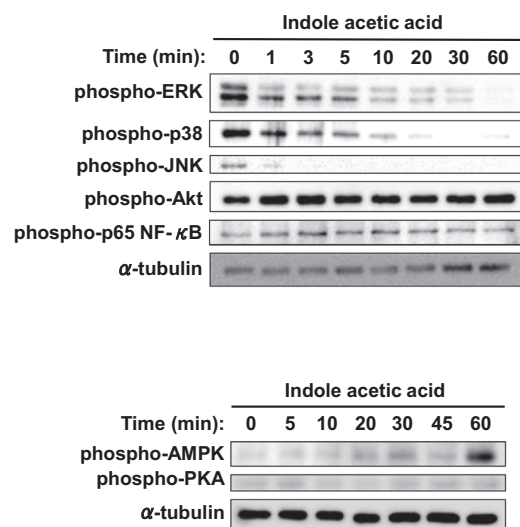


Figure 2. 細胞内シグナル伝達分子および転写因子のリン酸化レベルに対するインドール酢酸の影響。

られた事から, NF- κ B の p65 サブにユットのリン酸化レベルを確かめた. しかし, 特にリン酸化レベルに変化は観察されなかった. Cdx2 の発現上昇を導くと報告されている AMPK の活性化については⁴⁾, インドール酢酸刺激によってリン酸化レベルが上昇したが, AMPK の活性を制御する PKA に関しては, リン酸化レベルの変化は導かれなかった.

4-2. ラット個体を用いた解析

胆汁酸の一種であるコール酸をラットに微量摂取させる事で, 腸内環境を悪化させる事が可能である (未発表データ). そこで, 腸内環境を悪化させる事を目的に, まずはコントロール群とコール酸添加食群の2群で2週間の飼育を行った. Table 3 に示した様に, この2群間で, 体重および総摂食量に変化はなかった. 続いて, この2群から, コントロール群, インドール酢酸添加食群, コール酸添加食群, コール酸+インドール酢酸添加食群の4群に分け, さらに2週間の飼育を行った. これら4群の間で, 体重および総摂食量に違いはなかった. 解剖後, 肝臓, 腎臓, 副腎丸脂肪, それぞれの組織重量を測ったところ, 腎臓と副腎丸脂肪の重量に関しては群間で違いがなかったが, 肝臓重量に関してはコントロール群と比較してコール酸摂取群で有意に増加していた. コール酸の微量摂取は脂肪肝の発症に伴い肝臓重量が上昇する事は既に明らかにしているため, この結果は本実験系が動いている事を示していると考えている. 腸内環境の指標である盲腸内容物の pH について測定したところ, コール酸+インドール酢酸添加食群において有意に pH が上昇していた. よって, コール酸+インドール酢酸添加食群の腸内環境は他の群と比較して悪化している事が示唆された.

Table 3. 体重および摂食食量 (開始~2週目)

	Initial BW (g)	Final BW (g)	Total Food Intake (g)
Control	293.8±2.46	361.5±5.34	577.3±9.88
CA	293.6±2.51	368.4±5.47	565.2±6.50

Table 4. 体重および摂食食量 (2週目~4週目)

	Initial BW (g)	Final BW (g)	Total Food Intake (g)
Control	322.3±5.13	351.3±6.55	233.8±7.79
IAA	322.7±3.94	352.3±7.82	234.1±10.71
CA	320.8±4.19	352.3±5.45	235.4±7.77
CA+IAA	320.9±4.53	351.6±5.15	237.0±6.38

Table 5. 各種臓器重量および盲腸内 pH

	Liver weight (g / 100 g BW)	Kidney weight (g / 100 g BW)	Adipose weight (g / 100 g BW)	Cecum pH
Control	3.06±0.081	0.57±0.005	1.78±0.064	7.89±0.021
IAA	2.98±0.085	0.57±0.004	1.82±0.047	7.94±0.072
CA	3.37±0.084*	0.57±0.005	1.74±0.074	7.88±0.121
CA+IAA	3.24±0.075	0.56±0.005	1.73±0.052	8.06±0.005*

Values are expressed as means with SE, * $p < 0.05$ vs. Control.

5. 研究から得られた結論・考察

本研究での Caco-2 細胞を用いた結果より, インドール酢酸は AMPK の活性化を惹起する事で Cdx2 の発現上昇を導き, その結果として, SLC26A3 が発現増加すると予想される. SLC26A3 のプロモーター領域に存在する SNPs は, SLC26A3 の発現低下を導き, 炎症性腸疾患の発症に関与する事が報告されている⁵⁾. したがって, 高食肉摂取による腸内におけるインドール酢酸の産生増加は, 炎症性腸疾患の発症に対して予防効果を示す可能性がある.

Figure 2 の結果より, 僅かながらであるが細胞に対して無刺激な状態でも NF- κ B は活性化されていた. そのため, IL-6 や TNF α の mRNA 量の低下は, Cdx2 の発現増加が起因となって NF- κ B の p65 サブユニットをトラップする事が関係している可能性がある. 加えて, インドール酢酸は, 炎症の惹起に寄与するとされる ERK, p38, JNK の活性化を抑制した事から, IL-6 や TNF α の mRNA 量の低下は Cdx2 の発現増加だけでなく, 各種 MAP キナーゼの活性化が抑えられている事も要因として考えられる.

AMPK の活性化の制御に PKA が関係しているとされているが, インドール酢酸は PKA のリン酸化を導かなかった事から, インドール酢酸刺激依存的に活性化される AMPK については, PKA は関与していない事が明らかとなった.

高脂肪食, 肥満, 加齢, 飲酒が発端となって腸内で増加する胆汁酸が腸内細菌への選択圧となり, Firmicutes 門の比率が腸内で上昇する. そのため, 腸内での胆汁酸増加に伴いインドール酢酸からスカトールの生成が促進されると考えられる. 本研究において, コール酸+インドール酢酸をラットに摂取させる事で盲腸内での pH が上昇した事から腸内環境が悪化したと考えられるため, スカトール生成が促進されている可能性が高い.

以上の本研究結果より, 高食肉摂取によって腸内で産生されるインドール酢酸は, 消化管疾患の発症予防や病態改善に寄与すると期待できる. さらに, 高脂肪高タンパク質食摂取を想定したコール酸+インドール酢酸摂取群において盲腸内 pH が上昇した事から, 健康促進を導くと予想されるインドール酢酸は, 腸内の胆汁酸増加が起因となって逆に病態発症を導く要因になり得る事も示唆された.

6. 残された問題・課題

今回の解析で得られた結果から、高食肉摂取によって腸内で産生されるインドール酢酸が、消化管疾患の発症予防や病態改善に寄与する可能性が高い事を示す事ができたが、インドール酢酸の作用メカニズムに関しては、さらなる詳細な解析が必要である。今後は作用経路を同定するために、ノックダウン法や阻害剤などを用いて解析を進める必要がある。

高食肉摂取による病態発症や進行促進には、胆汁酸による菌叢の変動を介したインドール酢酸からスカトールへの変換促進が関係していると本研究では想定して解析を進めた。盲腸内 pH が変化した事から本研究での仮説通り、腸内環境の状態により、インドール酢酸とスカトールの比率が変化する可能性が高いが、盲腸内容物中からスカトールを精密に定量する実験系が確立できなかったため、直接的な証明は未だできてない。今後は盲腸内容物に含有されているスカトールを定量する実験系を確立する事で、本仮説を証明していきたいと考えている。

7. 謝辞

本研究課題を遂行するにあたり、多大なるご支援を賜りました東洋食品研究所に深く御礼申し上げます。

8. 参考文献

- 1) Heath-Pagliuso S, Rogers WJ, Tullis K, Seidel SD, Cenijn PH, Brouwer A, Denison MS. Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry*. 37: 11508-11515, 1998.
- 2) Chatterjee I, Kumar A, Castilla-Madrigal RM, Pellon-Cardenas O, Gill RK, Alrefai WA, Borthakur A, Verzi M, Dudeja PK. CDX2 upregulates SLC26A3 gene expression in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 313: G256-G264, 2017.
- 3) Kim SP, Park JW, Lee SH, Lim JH, Jang BC, Lee SH, Jang IH, Freund JN, Suh SI, Mun KC, Song DK, Ha EM, Lee WJ, Kwon TK. Homeodomain protein CDX2 regulates COX-2 expression in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 315: 93-99, 2004.
- 4) Sun X, Yang Q, Rogers CJ, Du M, Zhu MJ. AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression. *Cell Death Differ*. 24: 819-831, 2017.
- 5) Asano K, Matsushita T, Umeno J, Hosono N, Takahashi A, Kawaguchi T, Matsumoto T, Matsui T, Kakuta Y, Kinouchi Y, Shimosegawa T, Hosokawa M, Arimura Y, Shinomura Y, Kiyohara Y, Tsunoda T, Kamatani N, Iida M, Nakamura Y, Kubo M. A genome-wide association study identifies three new susceptibility

loci for ulcerative colitis in the Japanese population. *Nat Genet*. 41: 1325-1329, 2009.