

奨励金No.1513

腸内細菌代謝物が消化管ホルモンと迷走神経を介して行動を制御するシグナル伝達経路の解析

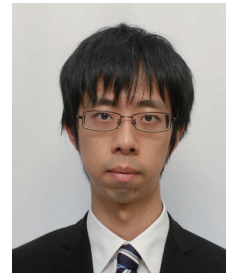
原田 一貴

東京大学 大学院総合文化研究科 助教

Analysis on the signaling pathway of behavior regulation by bacterial metabolites via gut hormones and vagus nerves

Kazuki Harada,

Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, Assistant professor



本研究では、腸内細菌によって産生される代謝物が消化管ホルモン分泌能へ影響を与え、動物個体の行動に影響を及ぼす情報伝達経路の解明を目的とした。代謝物の 1 つである物質 X が消化管ホルモンの一種グルカゴン様ペプチド-1 の分泌を促進することを細胞レベルで見出したが、X を長期投与したマウスの大脳皮質や海馬の神経活動、認知機能には何ら影響を与えなかった。今後は、認知機能が低下し始める壮年期のマウスを用いて同様の解析を行う。

We aimed to elucidate the signaling pathways through which gut microbiota metabolites affect the secretion of gastrointestinal hormones and the behavior of individual animals. We have found that a certain metabolite (called X) promotes the secretion of glucagon like peptide-1. However, we found little effect on cortical or hippocampal neural activity or cognitive functions, in mice chronically treated with X. In the future, we will perform similar analyses using mice in their mature age, when cognitive functions begins to decline.

1. 研究内容

1.1. はじめに

腸内細菌は、食餌由来の物質を分解し、短鎖脂肪酸などの代謝物を産生する。近年、肥満や認知症、自閉スペクトラム症といった疾患の発症に腸内細菌叢の構成の変化が関与することが報告されている。例えば、肥満マウスでは特定の腸内細菌と代謝物が増加している（Cryan et al., *Nat Prev Neurosci*, 2012）。また、ポリアミン産生腸内細菌の有無によって、マウスの加齢に伴う記憶低下の度合いに差が生じる（Kibe et al., *Sci Rep*, 2014）。しかし、腸内細菌代謝物が個体レベルの疾患発症や行動の変化をもたらす詳細な分子機構は未解明

である。

腸内の栄養素や腸内細菌代謝物に応答する重要なメディエーターとして消化管ホルモンがあげられる。消化管ホルモンには、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）やグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド（GIP）などがあり、インスリン分泌の促進や食欲の抑制に関与する。GLP-1 受容体作動薬にアルツハイマー型認知症モデルマウスの認知機能改善効果が認められるなど、消化管ホルモンと高次精神活動との関連性も報告されている（Zheng et al., *Mol Metab*, 2021）。近年、これら消化管ホルモンの分泌が腸内細菌代謝物によって制御されていることが明らかとなっている。

つまり、腸内細菌代謝物の組成の変化により消化管ホルモン分泌が変化し、摂食行動や認知機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。

そこで本研究では、生体イメージングと行動実験により、腸内細菌代謝物とマウスの行動、中でも認知機能との関連性を分子・細胞・個体レベルで解明することを目指すこととした。

1.2. 方法

1.2.1. 実験動物

6～7 週齢の C57BL/6J 雄マウスを用いて、光照射時間（8-20 時）が管理された部屋で一週間以上飼育した。動物実験は、「動物の保護及び管理に関する法律」、「東京大学動物実験実施規則」、「東京大学動物実験実施マニュアル」の定める規定を順守し、東京大学大学院総合文化研究科の動物実験委員会の承認のもと（承認番号 2020-4）、飼養および保管条件を厳守、苦痛の軽減、動物数と動物へのストレスを最小限にすること、安楽死の方法に十二分に配慮して実施した。

1.2.2. マウス血中 GLP-1 分泌量測定

マウスをイソフルラン麻酔下で入眠させたのち、開腹して盲腸付近を露出させた。盲腸から 2 cm 程度上流の小腸管腔内に腸内細菌代謝物溶液を注入し、外側尾静脈から投与直前と投与後 15 分、30 分にヘマトクリットチューブを用いて採血した。得られた血漿中の Active GLP-1 濃度を GLP-1, Active form (High sensitivity) Assay Kit で測定した。

1.2.3. 経頭蓋生体 Ca^{2+} イメージング

脳全域の神経およびアストロサイトで Ca^{2+} センサー GCaMP7 を発現するトランスジェニックマウス（G7NG817 マウス、Monai et al., *Sci Rep*, 2021）の頭皮を除去し、頭蓋骨に歯科用セメントを塗布したのち、生体イメージング用金属プレートを接着した。2 週間後、マウスを麻酔して金属プレートを固定装置に装着し、正立蛍光顕微鏡で撮影し

た。撮影開始から 5 分後に腸内細菌代謝物溶液を経口投与し、GCaMP7 の蛍光強度を測定した。

1.2.4. 脳深部イメージング

アストロサイトでグルコースセンサー Red Glifon 3000 を発現するアデノ随伴ウイルスベクター AAV9-mGFP (ABC1D)-Red Glifon 3000 をマウスの海馬にマイクロインジェクションした。約 10 日後に頭皮を除去し、頭蓋骨に歯科用セメントを塗布したのち、生体イメージング用金属プレートを接着した。さらに頭蓋骨のブレグマ縫合から尾側に 2 mm、左側に 2 mm の場所に、動物手術用マイクロドリルで直径 1 mm ほどの穴をあけ、直径 0.5 mm の屈折率分布型（GRIN）レンズを 1.3 mm の深さまで挿入した。レンズ挿入から 2～4 週間後、マウスを麻酔して金属プレートを固定装置に装着し、正立共焦点レーザー顕微鏡で撮影した。撮影開始から 2 分後に腸内細菌代謝物溶液を経口投与し、Red Glifon 3000 の蛍光強度を測定した。

1.2.5. オペラント視覚弁別課題

飲水中に腸内細菌代謝物を溶解してマウスを自由飲水条件で飼育した。その後、認知機能の指標の一つである認知的柔軟性を評価するため、タッチパネル型オペラント装置を用いた視覚弁別課題を行った。特定のルールに従ってタッチパネル上のスポットに触れると報酬餌を得られる課題を一定期間行った後、ルールを変更することを繰り返し、正解率および不正解率の推移から認知機能を評価した。

1.3. 結果

1.3.1. 腸内細菌代謝物がマウス血中 GLP-1 分泌に与える影響

マウス小腸内に腸内細菌代謝物溶液を投与したところ、いくつかの代謝物で血中 GLP-1 濃度が増加した。なかでも物質 X は、GLP-1 分泌を促進することが知られているグルコースと混合投与する

ことで、グルコース単体投与時よりも有意に高いGLP-1分泌を引き起こした（図1）。

1.3.2. 腸内細菌代謝物が脳活動に与える影響

G7NG817マウスの脳表を経頭蓋観察し（図2）、物質Xを投与した際のGCaMP7の蛍光強度変化を解析したところ、物質Xの投与により最大蛍光強度や曲線下面積値に変化は見られなかった。また、マウス海馬アストロサイトに赤色グルコースセンサーRed Glifon 3000を発現させて生体共焦点顕微鏡で観察（図3）し、同様に物質Xを投与した際の蛍光強度変化を解析したが、変化は見られなかった。以上から、物質Xによって分泌されたGLP-1は直接短期的には脳表および脳深部の神経活動に影響を与えない可能性が示唆された。

1.3.3. 腸内細菌代謝物が認知的柔軟性に与える影響

物質Xを自由飲水で摂取させたマウスにおいてオペラント視覚弁別課題を行ったところ、通常の水を摂取させたマウスと比較して不正解率に有意差は見られなかった（図4）。このことから、物質Xは若齢のマウスにおいては認知機能に影響を与えないと考えられた。

1.4. 考察

本研究では、腸内細菌代謝物が消化管ホルモンの分泌を介してマウスの行動を制御するシグナル

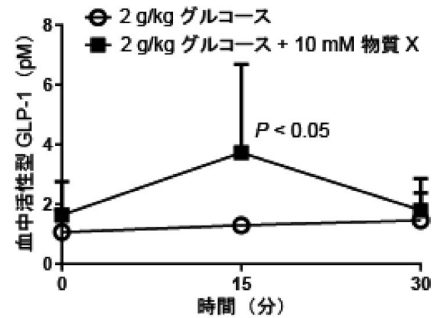


図1 マウス小腸内に物質Xを投与した際の血中GLP-1濃度変化

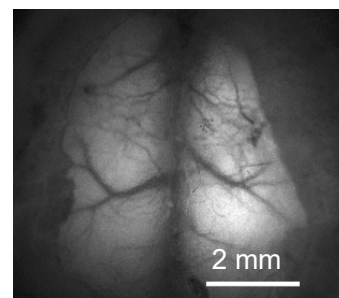


図2 G7NG817マウス脳表のGCaMP7の蛍光画像

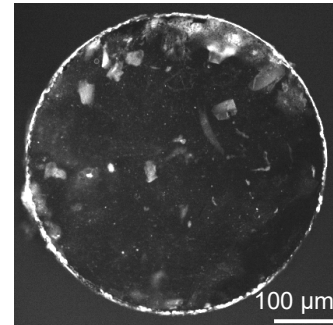


図3 GRINレンズ下の海馬Red Glifon 3000の蛍光画像

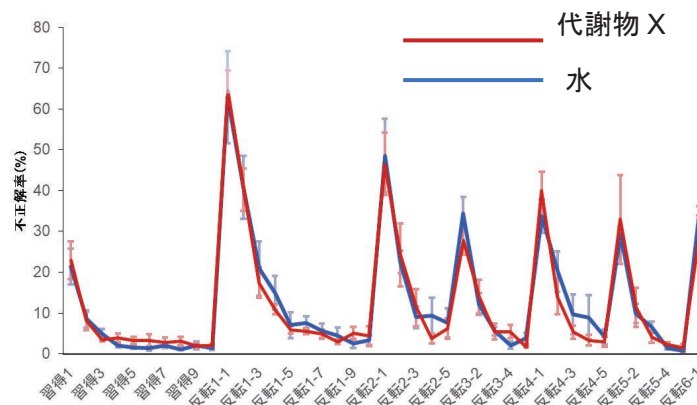


図4 オペラント視覚弁別課題時の不正解率（下）の推移

伝達経路の解明を目指した。今回見出した物質 X は、小腸からの GLP-1 分泌を促進したが、短期的に脳の神経活動には影響を与えなかった。またオペラント視覚弁別課題では、物質 X を摂取させたマウスにおいて認知機能の変化は見られなかった。

本研究では、6～7 週齢の若齢マウスを用いて実験を行ったが、若齢マウスでは通常の飼育環境でも認知機能が高いため、物質 X を摂取させたことによる影響が生じたとしても小さく、水投与群との差が見られなかった可能性がある。そのため、現在は認知機能が低下し始める壮年期のマウスを用いて同様の実験を行っている。

GLP-1 が中枢神経系に作用する経路として、血液脳関門を通過してニューロンに直接作用する経路と、消化管上皮細胞の近傍にある求心性迷走神経の GLP-1 受容体を介してニューロンに情報が間接的に伝達される経路が想定される。GLP-1 受容体作動薬は、血液脳関門を透過してニューロンのアポトーシスや酸化ストレスの抑制、さらには炎症反応の抑制などの作用を持つとされているが、GLP-1 は血中での半減期が短いため、受容体作動薬と同様に作用している可能性は低い。そのため、求心性迷走神経から脳表以外の領域を介して、海馬や内側前頭前皮質などに作用する神経回路が考えられる。

2. 発表（研究成果の発表）

該当なし、今後発表予定