

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

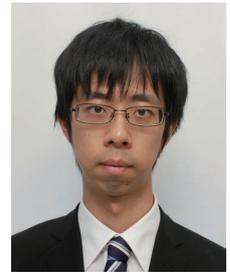
原田 一貴

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、動物個体の代謝や行動に影響を及ぼす情報伝達経路やその情報統合機構の解明を目的とした。これまでに、ある代謝物が消化管ホルモンの一種 GLP-1 の分泌を株細胞レベルおよびマウス個体レベルで促進することを見出した。また生体イメージングの結果から、GLP-1 が中枢神経系を制御する神経回路は大脳皮質を介さないことが示唆された。

Recent studies have implicated the gut microbiota is involved in various diseases including obesity, autism spectrum disorder, and dementia. However, the precise mechanisms underlying gut microbiota-induced effects on metabolism and behavior remain unclear. and We aimed to elucidate the signaling pathways and regulatory mechanisms of gut bacterial metabolite-induced effects on metabolism and behavior via secretion of enteroendocrine hormones. We found that one of the metabolites induced the secretion of GLP-1, one of the enteroendocrine hormones, from cell lines and mice. *In vivo* imaging suggested that GLP-1-induced appetite inhibition occurs without activation of the cerebral cortex, possibly via vagus nerves.

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。さらに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能力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が報告されている（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 GLP-1 分泌が変化し、糖代謝や摂食行動に影響を及ぼす可能性が考えられる。

そこで本研究では、これまで開発してきた細胞内シグナル分子や代謝関連分子の動態を可視化する蛍光タンパク質センサーを用い、生体イメージング技術と行動実験により腸内細菌代謝物とマウスの行動の関連性を分子・細胞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、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 の蛍光強度の変化率を算出した。

1.2.4. 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、ルールを変更したときの正解率の推移から認知的柔軟性を評価した。

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。なかでもある物質は、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。

1.3.2. 腸内細菌代謝物が脳表神経活動に与える影響

G7NG817 マウスの脳表を経頭蓋観察し、ある物質を投与した際の GCaMP7 の蛍光強度変化を解析したところ、ある物質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。このことから、ある物質によって分泌された GLP-1 は直接短期的には脳表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

ある物質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、ルール変更後の正解率が対照群と比べて有意に高い期間が見られた。このことから、ある物質によって GLP-1 が長期的に分泌され続けると、認知機能を司る脳領域に影響を与え、認知的柔軟性を向上させる可能性が示唆された。

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伝達経路の解明を目指した。今回見出したある物質は、小腸からの GLP-1 分泌を促進したが、短期的に脳表の神経活動には影響を与えなかった。一方オペラント視覚弁別課題では、ある物質を摂取させたマウスにおいて認知的柔軟性の向上が見られた。以上の結果から、ある物質によって分泌が誘発される GLP-1 は、認知機能をつかさどる脳領域に長期的に作用する可能性が示唆された。

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。

今後は、脳表よりも深い脳領域での神経活動を観察するため、ウイルスベクターによって Ca^{2+} センサーなどの蛍光タンパク質センサーを海馬や内側前頭前皮質で発現させ、脳深部観察用の屈折率分布型（GRIN）レンズを脳内に埋め込み、生体共焦点顕微鏡での生体イメージングを行う予定である。現在までに、ウイルスベクターのインジェク

ション手技、GRIN レンズの挿入手技を確立している。