

博 士 論 文 概 要

論 文 題 目

難消化性の食物成分の摂取タイミングが
マウス腸内細菌叢に及ぼす影響

The effects of feeding timing of indigestible
dietary components on mouse intestinal
microbiota.

申 請 者

佐々木	裕之
Hiroyuki	SASAKI

電気・情報生命専攻 薬理学研究

2020 年 5 月

本論文は、全4章構成となっている。1章では、腸内細菌の基礎について述べつつ、体内時計および時間栄養学との関わりについて記述する。時間栄養学の前例を踏まえ、エネルギー代謝に対する影響についての報告は挙げられるものの、腸内細菌に対する影響についての報告はほとんどされていないことを述べ、本論文の研究目的を示す。2章では、腸内細菌叢の構成に影響を与えることが知られている水溶性食物繊維の一種であるイヌリンについて、時間栄養学的観点からの検証を行う。さらに、3章では、2章で挙げた水溶性食物繊維を炭水化物として、それとは異なる栄養素、つまりタンパク質に着目した。同じく腸内細菌叢の構成に影響を与えることが報告されているレジスタントプロテインを約30%含んだ大豆タンパク質について、同様に時間栄養学的観点からの検証を行う。4章にて、2章と3章の総括として、本論文を締める。

第1章：序論

哺乳類の腸内には約40兆個の腸内細菌が生息しており、その集団は腸内細菌叢と呼ばれる。この腸内細菌叢は宿主の生理機能と深く関係していることが徐々にわかりはじめた。腸内細菌叢の構成が乱れた“Dysbiosis”と呼ばれた状態になると、肥満や大腸がんなどの身体的疾患のみならず精神疾患も含めた、様々な疾患が誘引されることが報告されている。

一方で、宿主の生理的機能は腸内細菌叢が産生した短鎖脂肪酸(Short-chain fatty acid: SCFA)によって制御されている。SCFAには酢酸・プロピオン酸・酪酸などが含まれているが、これらは難消化性の食品成分を腸内細菌が発酵・分解する際に生産され、腸管免疫や肝臓のエネルギー代謝等に利用される。また、SCFAはそれ自体が弱酸性であることから、腸管のpHを低下させ、有害な菌の増殖を抑える。

また、腸内細菌叢の構成は、食事や運動、喫煙、飲酒など様々な生活要因によって変化するが、この腸内細菌叢の構成は日内変動を示す。そしてその日内変動は主に摂食リズムによって制御されていることが報告されている。ここで、腸内細菌叢の構成に日内変動があることを踏まえると、腸内細菌叢に影響を与える食品成分の摂食タイミングによって、その影響も異なると考えられる。この“いつ”食べるかという「時間栄養学」に関する報告は、エネルギー代謝に対しては多く行われているものの、腸内細菌叢に与える影響に対してはほとんどなされていない。

以上より、本論文ではマウスを用いて、腸内細菌叢の構成に影響を与えることが知られている栄養成分を、“いつ”摂取すると、腸内細菌叢が“どのように”変化するのか、また、その影響度合いが異なるかどうかを検証した。本論文の2章では水溶性食物繊維の一種であるイヌリンを使用し、3章ではレジスタントプロテインを多く含む大豆タンパク質を使用して検証を行った。

第 2 章：イヌリンの摂取タイミングの違いがマウスの腸内細菌叢に及ぼす影響の検証

本実験では水溶性食物繊維のなかでも、私達日本人が日常的に食べるゴボウや菊芋などの野菜に多く含まれており、血糖値上昇抑制効果を持つことも知られているイヌリンを用いて検証を行った。ICR 雄マウス 9 週齢を用いた。マウスの活動期はじめに摂食させる餌を「朝食」、活動期終わりに摂食させる餌を「夕食」と定義し、この 1 日 2 食の制限給餌条件下で 14 日間飼育した。高脂肪食に水溶性食物繊維であるイヌリンを添加した餌（イヌリン餌）とその対照となる高脂肪食に不溶性食物繊維であるセルロースを添加した餌（セルロース餌）を用意する。マウスを以下の 3 群に分けて検証を行った。Cellulose 群：朝食と夕食ともにセルロース餌を摂食させる。Morning inulin 群：朝食にイヌリン餌・夕食にセルロース餌を摂食させる。Evening inulin 群：朝食にセルロース餌・夕食にイヌリン餌を摂食させる。14 日間各条件で飼育後、マウスを麻酔下で安楽死させ、開腹し、盲腸内 pH 測定および盲腸内容物と糞便の採取を行った。

盲腸内 pH を測定すると、Morning inulin 群で最も有意に低下しており、SCFA を測定すると Morning inulin 群で乳酸・酪酸の産生量が有意に増加していた。盲腸内 pH の低下および SCFA の産生量増加が確認されたことから、腸内細菌叢に影響している可能性が考えられた。そこで、次にマウスの糞便から 16S rDNA を抽出し、腸内細菌叢を測定した。腸内細菌の相対存在量を測定すると門レベルにおける有意な変化は見られなかったが、属レベルにおいて *Butyricimonas*, *Lactococcus*, *Oscillospira*, *Desulfovibrio*, *Staphylococcus* が Morning inulin 群で有意に変化し、*Odoribacter*, *Oscillospira* が Evening inulin 群で有意に変化した。さらに主座標分析を行い、腸内細菌叢の構成を測定すると、Cellulose 群と Morning inulin 群の間で有意な構成変化が確認されたが、Cellulose 群と Evening inulin 群の間では有意差は見られなかった。腸内細菌の相対存在量および構成比較の結果より、朝にイヌリンを摂食することは腸内細菌叢に大きく影響する可能性が考えられた。

次になぜ朝食のイヌリン摂食が腸内細菌叢に大きく影響したかを調べるために、絶食時間の長さに着目し、1 日 1 食の摂食スケジュールを用意した。以下の 4 群で検証を行った。Morning cellulose 群：朝食にセルロース餌を摂食させる。Morning inulin 群：朝食にイヌリン餌を摂食させる。Evening cellulose 群：夕食にセルロース餌を摂食させる。Evening inulin 群：夕食にイヌリン餌を摂食させる。14 日間各条件で飼育後、上記と同様の測定を行った。イヌリン摂食により盲腸内 pH の低下、SCFA 産生量の増加が確認されたが、朝夕差は見られなかった。さらに腸内細菌叢の構成を測定すると、Morning cellulose 群と Morning inulin 群の間、および Evening cellulose 群と Evening inulin 群の間に有意差は見られなか

った。これらの結果から、絶食時間を等しくすると朝夕差が見られなくなった。つまり、インスリン摂食による腸内細菌叢への影響は絶食時間の長さが関係していると考えられる。

第3章：大豆タンパク質の摂取タイミングの違いがマウスの腸内細菌叢に及ぼす影響の検証

本実験ではタンパク質の中でも、日本人にとって馴染み深い大豆に着目し、大豆に含まれている大豆タンパク質を用いて検証した。高脂肪食をベースにタンパク質源を全てカゼインタンパク質にしたカゼイン餌と大豆タンパク質にした大豆餌の2種を用意した。第2章と同様の摂食スケジュールで、以下の3群で検証を行った。Casein群：朝食と夕食ともにカゼイン餌を摂食させる。M-Soy群：朝食に大豆餌・夕食にカゼイン餌を摂食させる。E-Soy群：朝食にカゼイン餌・夕食に大豆餌を摂食させる。14日間各条件で飼育後、第2章と同様の測定を行った。

盲腸内 pH と SCFA を測定すると、特に乳酸と酪酸で M-Soy 群が有意に増加していた。さらに腸内細菌叢の構成は Casein 群と比較して M-Soy 群でのみ有意に変化していた。また、腸内細菌の相対存在量を測定すると、M-Soy 群で *Bacteroidetes* の有意な増加、*Lactococcus* の有意な減少が確認された。これらの盲腸内 pH、SCFA、腸内細菌叢の構成比較の結果から、大豆タンパク質においても朝食に摂食することが腸内細菌叢に大きく影響する可能性が示唆された。

第4章：総括

本研究では、2章と3章を通して、腸内細菌叢に影響を与え、腸内環境を改善することが報告されている、インスリンと大豆タンパク質の摂食タイミングに関する検証を行った。その結果どちらに食品成分においても夕食よりも朝食に摂食することで腸内細菌叢に強く影響する可能性が示唆された。そして、2章において、この朝夕差は絶食時間の長さが関係していることが示された。

先行研究より、長い絶食時間の後の食事により腸管の蠕動運動が促進されること、蠕動運動の促進により腸内環境が改善されることが知られている。つまり、長い絶食時間後の朝食摂食により蠕動運動が促進されたこと自体が腸内細菌叢に影響を与え、その時にインスリンや大豆タンパク質を摂食したことで、相加的に腸内細菌叢の構成に影響を与えた。そのため夕食よりも朝食の方が腸内細菌叢に大きな影響を与えたと考えられる。

実際の食生活を踏まえると、インスリンのみ・大豆タンパク質のみで食べることは少なく、食材として摂食することが多いだろう。つまり、人は様々な成分が複雑に混じった状態で摂食する。先行研究では、水溶性食物繊維だけでなく不溶性食物繊維も同時に摂食することで、各食物繊維を単独で摂食したときと全く異なる腸内細菌叢になることが報告されている。そのため、実際の食材を用いて検証を行うことで、より人の日常生活に近い結果が得られるだろう。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 佐々木 裕之 印

(2020 年 4 月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文 ○ (主業績)	Tamura K [#] , <u>Sasaki H[#]</u> , Shiga K, Miyakawa H, Shibata S. ([#] These authors contributed equally to this work). The timing effects of soy protein intake on mice gut microbiota. <i>Nutrients</i> . 12 (1), 2019, 87.
○	<u>Sasaki H[#]</u> , Miyakawa H [#] , Watanabe A, Nakayama Y, Lyu Y, Hama K, Shibata S. ([#] These authors contributed equally to this work). Mice microbiota composition changes by inulin feeding with a long fasting period under a two-meals-per-day schedule. <i>Nutrients</i> . 11(11), 2019, 2802.
論文 (副論文)	Motohashi H, Tahara Y, Daniel S. Whittaker, Huei-Bin Wang, Yamaji T, Wakui H, Haraguchi A, Yamazaki M, Miyakawa H, Hama K, <u>Sasaki H</u> , Sakai T, Hirooka R, Takahashi K, Takizawa M, Makino S, Aoyama S, Christopher S. Colwell, and Shibata S. Circadian clock disruption in mice with adenine-induced tubulointerstitial nephropathy. <i>Kidney International</i> . 97(4), 2020, 728-740.
	Yasuda S, Iwami S, Tamura K, Ikeda Y, Kamagata M, <u>Sasaki H</u> , Haraguchi A, Miyamatsu M, Hanashi S, Takato Y, Shibata S. Phase resetting of circadian peripheral clocks using human and rodent diets in mouse models of type 2 diabetes and chronic kidney disease. <i>Chronobiol Int</i> . 36(6), 2019, 851-869.
	Akter S, <u>Sasaki H</u> , Uddin KR, Ikeda Y, Miyakawa H, Shibata S. Anxiolytic effects of γ -oryzanol in chronically- stressed mice are related to monoamine levels in the brain. <i>Life Sci</i> . 216, 2019, 119-128.
	Takahashi M, Ozaki M, Kang MI, <u>Sasaki H</u> , Fukazawa M, Iwakami T, Lim PJ, Kim HK, Aoyama S, Shibata S. Effects of meal timing on postprandial glucose metabolism and blood metabolites in healthy adults. <i>Nutrients</i> . 10(11), 2018, 1763.
	Akter S, <u>Sasaki H</u> , Ikeda Y, Miyakawa H, Shibata S. γ -oryzanol ameliorates the acute stress induced by behavioral anxiety testing in mice. <i>J Pharmacol Sci</i> . 38(2), 2018, 155-159.
	Ikeda Y, Kamagata M, Hirao M, Yasuda S, Iwami S, <u>Sasaki H</u> , Tsubosaka M, Hattori Y, Todoh A, Tamura K, Shiga K, Ohtsu T, Shibata S. Glucagon and/or IGF-1 production regulates resetting of the liver circadian clock in response to a protein or amino acid-only diet. <i>EBioMedicine</i> . 28, 2018, 210-224.
	Tahara Y, Yamazaki M, Sukigara H, Motohashi H, <u>Sasaki H</u> , Miyakawa H, Haraguchi A, Ikeda Y, Fukuda S, Shibata S. Gut microbiota-derived short chain fatty acids induce circadian clock entrainment in mouse peripheral tissue. <i>Sci Rep</i> . 8(1), 2018, 1395.

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	<p>Wada M, Orihara K, Kamagata M, Hama K, <u>Sasaki H</u>, Haraguchi A, Miyakawa H, Nakao A, Shibata S. Circadian clock-dependent increase in salivary IgA secretion modulated by sympathetic receptor activation in mice. Sci Rep. 7(1), 2017, 8802.</p> <p>Kamagata M, Ikeda Y, <u>Sasaki H</u>, Hattori Y, Yasuda S, Iwami S, Tsubosaka M, Ishikawa R, Todoh A, Tamura K, Tahara Y, Shibata S. Potent synchronization of peripheral circadian clocks by glucocorticoid injections in PER2::LUC-Clock/Clock mice. Chronobiol Int. 34(8), 2017, 1067-1082.</p> <p>Tahara Y, Takatsu Y, Shiraishi T, Kikuchi Y, Yamazaki M, Motohashi H, Muto A, <u>Sasaki H</u>, Haraguchi A, Kuriki D, Nakamura TJ, Shibata S. Age-related circadian disorganization caused by sympathetic dysfunction in peripheral clock regulation. npj Aging and Mechanisms and Disease. 3, 2017, 16030.</p> <p><u>Sasaki H</u>, Hattori Y, Ikeda Y, Kamagata M, Iwami S, Yasuda S, Tahara Y, Shibata S. Forced rather than voluntary exercise entrains peripheral clocks via a corticosterone/noradrenaline increase in PER2::LUC mice. Sci Rep. 6, 2016, 27607.</p> <p><u>Sasaki H</u>, Hattori Y, Ikeda Y, Kamagata M, Iwami S, Yasuda S, Shibata S. Phase shifts in circadian peripheral clocks caused by exercise are dependent on the feeding schedule in PER2::LUC mice. Chronobiol Int. 33(7), 2016, 849-862.</p> <p>Moriya S, Tahara Y, <u>Sasaki H</u>, Ishigooka J, Shibata S. Phase-delay in the light-dark cycle impairs clock gene expression and levels of serotonin, norepinephrine, and their metabolites in the mouse hippocampus and amygdala. Sleep Med. 16(11), 2015, 1352-1359.</p> <p>Tahara Y, Shiraishi T, Kikuchi Y, Haraguchi A, Kuriki D, <u>Sasaki H</u>, Motohashi H, Sakai T, Shibata S. Entrainment of the mouse circadian clock by sub-acute physical and psychological stress. Sci Rep. 5, 2015, 11417.</p> <p><u>Sasaki H</u>, Hattori Y, Ikeda Y, Kamagata M, Shibata S. Eating meals before wheel-running exercise attenuate high fat diet-driven obesity in mice under two meals per day schedule. Chronobiol Int. 32(5), 2015, 677-685.</p> <p>Moriya S, Tahara Y, <u>Sasaki H</u>, Ishigooka J, Shibata S. Housing under abnormal light-dark cycles attenuates day/night expression rhythms of the clock genes Per1, Per2, and Bmal1 in the amygdala and hippocampus of mice. Neurosci Res. 99, 2015, 16-21.</p> <p>Ikeda Y, <u>Sasaki H</u>, Ohtsu T, Shiraishi T, Tahara Y, Shibata S. Feeding and adrenal entrainment stimuli are both necessary for normal circadian oscillation of peripheral clocks in mice housed under different photoperiods. Chronobiol Int. 32(2), 2015, 195-120.</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
総説	<p><u>Sasaki H</u>, Ohtsu T, Ikeda Y, Tsubosaka M, Shibata S. Combination of meal and exercise timing with a high-fat diet influences energy expenditure and obesity in mice. Chronobiol Int. 31(9), 2014, 959-975.</p> <p>Moriya S, Tahara Y, <u>Sasaki H</u>, Hamaguchi Y, Kuriki D, Ishikawa R, Ishigooka J, Shibata S. Effect of quetiapine on Per1, Per2, and Bmal1 clock gene expression in the mouse amygdala and hippocampus. J Pharmacol Sci. 125(3), 2014, 329-332.</p> <p><u>佐々木裕之</u>、「時間栄養学～新たな知見を読み解く～」腸内細菌の日内変動、食と医療 vol.12、2020 年、32-39</p> <p><u>佐々木裕之</u>、柴田重信、時間栄養学・時間運動学の視点を取り入れたヘルスフードの開発、食品と科学 10 月号、2017 年、51-56</p> <p>柴田重信、池田祐子、<u>佐々木裕之</u>、時間栄養学と時間運動学、日本臨床 71 巻、2013 年、2194-2199</p>
講演	<p><u>Hiroyuki Sasaki</u>, 他 5 名, The effect of combination with water-soluble and -insoluble dietary fiber on mice microbiota. ICoFF/ISNFF 2019, 神戸, 2019 年 12 月, Hitoshi Ashida.</p> <p><u>佐々木裕之</u>, 柴田重信, Regulation of physiological function and circadian clock by exercise timing ~chrono-exercise~, 第 26 回日本時間生物学会, 金沢, 2019 年 10 月, 三枝理博.</p> <p><u>Hiroyuki Sasaki</u>, Shigenobu Shibata, Chrono-exercise Effect on Cecal Microbiota in Mice. University of Waseda day at Bonn university, ドイツ, 2019 年 5 月, Waldemar Kolanus.</p> <p><u>Hiroyuki Sasaki</u>, Effect of exercise timing on mouse intestinal microbiota under inulin feeding. Biotechnology Towards Next Generation Single Cell Analysis, シンガポール, 2018 年 10 月, Haruko Takeyama.</p> <p><u>Hiroyuki Sasaki</u>, Relationship between food timing or exercise timing and microbiota. JSPS Core-to-Core Program "Food, exercise and technology for health promotion" symposium in Singapore. シンガポール, 2018 年 1 月, Takafumi Inoue.</p>
著書	<p>他 52 件</p> <p>青山晋也、<u>佐々木裕之</u>、「時間栄養学- 健康と長寿社会を支える時計遺伝子と栄養学(仮題)」データ解析手法とデータリテラシー（共著）、化学同人、2020 年発刊予定</p> <p><u>佐々木裕之</u>、「時間栄養学- 健康と長寿社会を支える時計遺伝子と栄養学(仮題)」腸内細菌と時間栄養（単著）、化学同人、2020 年発刊予定</p> <p>他 1 件</p>