

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	長澤 祐季
論文審査担当者	主査 鈴木 敏彦 副査 樺沢 勇司、細道 純
論文題目	Xanthan gum-based fluid thickener decreases postprandial blood glucose associated with increase of <i>Glp1</i> and <i>Glp1r</i> expression in ileum and alteration of gut microbiome
(論文内容の要旨) 〈諸言〉 高齢者や嚥下障害患者は、誤嚥を防ぐため、日常的にキサンタンガム系とろみ調整食品を使用している。成分として含まれているキサンタンガムは、粘性のある水溶性食物繊維であり、細菌による発酵を受けて短鎖脂肪酸が生成される。また、複数の先行研究より、キサンタンガムの摂取は、糖代謝の改善と高脂血症の抑制に関連する可能性が示唆されている。しかしながらキサンタンガム系とろみ調整食品の長期摂取が、食後血糖値、消化管における遺伝子発現、腸内細菌叢に及ぼす生物学的影響については十分に明らかにされていない。本研究は、誤嚥予防のために嚥下障害患者に日常的に使用されているとろみ調整食品の長期的な摂取が、食後血糖値、消化管の遺伝子発現、腸内細菌叢に対しどのように影響するのか、動物モデルを用いて明らかにすることを目的とした。 〈方法〉 6 週齢雄性 Sprague-Dawley ラットを、キサンタンガム系とろみ調整食品の投与群 (Thickener-added ; Th 群) と対照群 (Control ; Co 群) に分け、5 週間飼育した (n = 7)。Th 群には生理食塩水で調整した 8%とろみ水 4 mL を、Co 群には生理食塩水 4 mL を毎日経口投与し、4 週目に経口糖負荷試験を実施した(n = 7)。安楽殺したラットから消化管組織 (胃・十二指腸・空腸・回腸) を採取し、qPCR 法を用いて <i>Pyy</i> (peptide YY)、<i>Bdnf</i> (brain-derived neurotrophic factor)、<i>Cck</i> (cholecystokinin)、<i>Glp1</i> (Glucagon-like peptide-1)、<i>Ghrl</i> (ghrelin) および 18S ribosomal RNA (Housekeeping gene) の発現量を評価した (n = 4)。その後、次世代シーケンサーを用いて回腸の遺伝子発現と腸内細菌叢の網羅的な解析を行った (n = 4)。回腸における発現変動遺伝子 (DEGs) は、q 値が<0.1、fold change が≥1.5 と定義した。採取した糞便から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子に基づいた腸内細菌叢解析を行った。 〈結果〉 経口糖負荷試験時、Th 群の血糖値は、グルコース投与後 60 分および 90 分において、Co 群と比較して有意に低下した (それぞれ p = 0.03, 0.04)。Th 群では胃および回腸で <i>Cck</i> の発現が有意	

に低下し（それぞれ $p = 0.01, 0.03$ ）、*Glp1* の発現は回腸でのみ有意に上昇した（ $p = 0.006$ ）。

RNA-seq では、合計で 25 個の発現変動遺伝子が同定され、そのうち 9 個の遺伝子が発現上昇し、また 16 個の遺伝子が発現低下していた。Co 群では全く発現が認められなかった *Glp1r* の発現上昇が Th 群で確認された。また、発現が低下した遺伝子には、*Gpr17* が含まれていた。さらに、Hallmark 遺伝子群を用いた Gene set enrichment analysis (GSEA) では、コレステロール恒常性 ($NES = 1.78, q = 0.001$)、脂肪酸代謝 ($NES = 1.44, q = 0.029$)、解糖 ($NES = 1.29, q = 0.091$) に関する遺伝群の発現が Th 群の回腸で亢進していた。

腸内細菌叢はとろみ調整食品の摂取により変化した。*Christensenellales* 目（存在比率; Co 0.050, Th 0.356: 7.0 倍）、*Erysipelotrichales* 目（存在比率; Co 0.232, Th 0.713: 3.1 倍）、(*Eubacterium*) *coprostanoligenes group* 科（存在比率; Co 2.9, Th 8.8: 3.1 倍）、*Erysipelotrichaceae* 科（存在比率; Co 0.142, Th 0.623: 4.4 倍）、*Christensenellaceae* 科（存在比率; Co 0.050, Th 0.356: 7.0 倍）、UBA1819 属（存在比率; Co 0.029, Th 0.063: 2.2 倍）、(*Eubacterium*) *coprostanoligenes group* 属（存在比率; Co 2.878, Th 8.811: 3.1 倍）、および *Christensenellaceae R-7 group* 属（存在比率; Co 0.048, Th 0.353: 7.3 倍）は、Th 群で存在比率が増加する傾向があった。種レベルでは、Th 群の *Alistipes indistinctus* の存在比率が有意に少なかった ($> W_{0.7}$)。

属レベルの共起係数を算出しネットワークを可視化すると、Th 群では *Muribaculaceae* が唯一の interacting core genus であることが明らかになった。

Christensenellales ($p = 0.02, r = 0.80$)、UBA1819 属 ($p < 0.001, r = 0.98$)、*Christensenellaceae R-7 group* ($p = 0.02, r = 0.79$) および *Bacterium YE57* 種 ($p = 0.02, r = 0.79$) の存在比率は、回腸の *Glp1* 発現と正の相関が認められた。UBA1819 属 ($p < 0.001, r = 0.98$) および (*Eubacterium*) *coprostanoligenes group* 属 ($p = 0.04, r = 0.73$) の存在比率は、回腸 *Glp1r* 発現と正の相関を示した。*Erysipelotrichales* 目（それぞれ $p = 0.049, r = 0.71$; $p < 0.001, r = 0.94$ ）と *Christensenellaceae* 属（それぞれ $p = 0.004, r = 0.87$; $p = 0.03, r = 0.75$ ）の存在比率は、回腸の *Glp1* および *Glp1r* の遺伝子発現と正の相関を示した。*Alistipes indistinctus* の存在比率でのみ、*Glp1* および *Glp1r* 遺伝子発現との負の相関が認められた（それぞれ $p = 0.004, r = -0.88$; $p = 0.03, r = -0.76$ ）。

〈考察〉

GLP1 は腸内分泌 L 細胞から分泌される消化管ホルモンであり、食後の分泌により膵臓のインスリン分泌を促進するインクレチン効果を有することから、糖尿病の治療薬として用いられている。腸内分泌 L 細胞に存在する GPR17 は、GLP1 の分泌を抑制することが明らかになっている。本研究で明らかになった Th 群の回腸における *Gpr17* 発現低下は、回腸での GLP1 分泌を促進させた可能性がある。

Glp1 の発現を制御する要因の 1 つが、細菌の代謝産物である短鎖脂肪酸である。成人において短鎖脂肪酸は GLP1 分泌を増加させ、耐糖能異常を改善する。インクレチン効果により膵臓 β 細胞における GLP1 受容体の発現量は増加する。膵臓以外の臓器でも GLP1 を介した血糖値抑制メカニズムの存在はすでに報告されているが、その詳細は明らかでない。本研究より、回腸 *Glp1r* の発現が回腸 *Glp1* の発現増加に伴って上昇することが明らかになり、食後血糖値の調節における回腸の重要性が示唆された。

GSEA の結果、コレステロール恒常性・脂肪酸代謝・解糖に関する遺伝子群の発現が Th 群の回腸で亢進していることが明らかになった。過去の報告では、水溶性食物繊維である β グルカンが複数の解糖系遺伝子発現量を増加させた。同様に水溶性食物繊維であるキサンタンガムも糖代謝に影響を与える可能性がある。

Th 群で存在比率の増加傾向が見られた *Erysipelotrichales* 目、*Christensenellaceae* 科、(*Eubacterium*) *coprostanoligenes group* 属および、Th 群で唯一の interacting core genus である *Muribaculaceae* 属は、短鎖脂肪酸産生菌であることが知られており、このうち *Erysipelotrichales* 目と *Christensenellaceae* 科の存在比率は、回腸における *Glp1* および *Glp1r* の発現と正の相関を示した。これらの相関は、とろみ調整食品による食後血糖抑制に関連している可能性がある。

水溶性食物繊維の粘性は血糖コントロールに有益な影響を及ぼし、腸管における糖の吸収を遅延させる。先行研究では、高コレステロール血症患者の腸内細菌叢が、 β グルカン摂取後に変化し、BMI、ウエスト周囲径、およびトリグリセリド値の低下と強く関連していた。水溶性食物繊維の摂取は、腸管での糖の吸収や腸内細菌叢と関連し、糖や脂質代謝を改善する。キサンタンガム系とろみ調整食品の摂取も同様の影響を与えることが推測される。

以上より、とろみ調整食品の摂取が、糖・脂質代謝の改善に寄与する要因の 1 つである可能性が示唆された。

〈結論〉

キサンタンガム系とろみ調整食品の長期投与は、回腸における *Glp1* および *Glp1r* の発現上昇と腸内細菌叢の変化により、食後血糖値を低下させる可能性がある。

本研究より、キサンタンガム系とろみ調整食品の摂取が糖・脂質代謝を改善する可能性が示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第 6733 号	長澤 祐季
論文審査担当者	主査 鈴木 敏彦 副査 樺沢 勇司、細道 純	
論 文 題 目	Xanthan gum-based fluid thickener decreases postprandial blood glucose associated with increase of <i>Glp1</i> and <i>Glp1r</i> expression in ileum and alteration of gut microbiome	
(論文審査の要旨) 高齢者や嚥下障害患者は誤嚥防止にとろみ調整食品を用いるが、その摂取が身体に与える影響については不明な点が多い。6 週齢雄性 Sprague-Dawley ラットに対し、5 週間にわたりキサンタンガム系とろみ調整食品 (Th 群)もしくは生理食塩水 (Co 群)を経口投与した。実験開始から 4 週後に行なった経口糖負荷試験では、グルコース投与後 60 分および 90 分における血糖値が Th 群で有意に低下した。投与開始より 5 週後に消化管を採取したところ、回腸でのみ <i>Glp1</i> 発現が Th 群で有意に増加していた。次に、次世代シークエンサーを用いて <i>Glp1</i> 発現の増加がみられた回腸の遺伝子発現と腸内細菌叢を網羅的に解析した。Th 群で <i>Glp1r</i> の発現の上昇や解糖系・コレステロール恒常性・脂肪酸代謝に関連する遺伝子群の発現が亢進することが示され、さらに、腸内細菌叢は変化していた。<i>Erysipelotrichales</i> 目と <i>Christensenellaceae</i> 科の存在比率は、回腸の <i>Glp1</i> および <i>Glp1r</i> の発現と強い正の相関が認められた。キサンタンガム系とろみ調整食品の摂取が糖・脂質代謝を改善する可能性が示唆された。 本研究において、申請者はキサンタンガム系とろみ調整食品と回腸遺伝子発現および腸内細菌叢について十分に理解した上で、本食品が食後血糖、腸管遺伝子および腸内細菌叢へ及ぼす影響を解析するために、各種の高度な分析方法について事前に十分な検討を重ねており、適切な研究計画の下で用意周到に本実験を遂行し多角的に解析したことは高く評価できる。なお、本研究は本学動物実験委員会の承認を得て行われた（承認番号：A2021-199C2）。 本研究の主たる結果は以下の通りである。 1. 経口糖負荷試験時、Th 群の血糖値は、グルコース投与後 60 分および 90 分において、Co 群と比較して有意に低下した。 2. Th 群では回腸でのみ糖尿病治療薬の標的になっている <i>Glp1</i> の発現が有意に上昇した。 3. RNA-seq では、回腸において合計で 25 個の発現変動遺伝子が同定された。このうち 9 個の遺伝子が発現上昇、16 個の遺伝子が発現低下し、Co 群では全く発現が認められなかった <i>Glp1r</i> の発現上昇が Th 群で確認された。 4. Gene set enrichment analysis では、コレステロール恒常性、脂肪酸代謝、解糖に関する遺伝群が Th 群の回腸で発現亢進されていた。		

5. *Christensenellales* 目、*Erysipelotrichales* 目、(*Eubacterium*) *coprostanoligenes* group 科、*Erysipelotrichaceae* 科、*Christensenellaceae* 科、UBA1819 属、(*Eubacterium*) *coprostanoligenes* group 属、および *Christensenellaceae* R-7 group 属は、Th 群で存在比率が増加する傾向があった。種レベルでは、Th 群の *Alistipes indistinctus* の存在比率が有意に少なかった。
6. *Erysipelotrichales* 目と *Christensenellaceae* 科の存在比率は、回腸における *Glp1* や *Glp1r* の遺伝子発現と正の相関を示した。

以上の結果より、キサンタンガム系とろみ調整食品の長期投与は、回腸の糖・脂質代謝関連遺伝子と腸内細菌叢の変化を伴って食後血糖を抑制することを世界で初めて示した。

キサンタンガム系とろみ調整食品の摂取が身体に与える分子機構についてはこれまで十分な報告が見られなかった。本研究ではその長期的な摂取と糖・脂質代謝との関係性に注目した点に新規性があり評価できる。さらに、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を行い、糖・脂質代謝への影響と腸内細菌叢の変化を考察し、キサンタンガム系とろみ調整食品が腸管の発現変動遺伝子と腸内細菌叢に与える影響について総合的な解析を行った点も評価できる。

本研究は、キサンタンガム系とろみ調整食品の長期的な摂取が回腸における *Glp1* および *Glp1r* の発現の増加と腸内細菌叢の変化に関連して食後血糖を抑制させる可能性を初めて報告した論文であり、今後臨床応用を進める上で重要な内容を含んでいる。

本研究の結果から、キサンタンガム系とろみ調整食品が誤嚥防止のみならず、糖・脂質代謝に影響し糖尿病治療において補助的な役割を担う可能性が示唆され、得られた基礎的データはヒトを対象とした研究に繋がり、臨床への応用に大きく寄与すると考えられる。

よって本論文は博士（歯学）の学位申請を行うにあたり、十分価値あるものと認められた。