

氏名・(本籍)	加藤 俊祐 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1047 号
学位授与の日付	令和 3 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Effects of GLP-1 receptor agonist on changes in the gut bacterium and the underlying mechanisms (GLP-1 受容体作動薬による腸内細菌の変化が及ぼす影響とそのメカニズムについて)

論文審査委員	(主査) 八月朔日 泰和 教授
	(副査) 中永 士師明 教授      高橋 勉 教授

## 学 位 論 文 内 容 要 旨

### 論 文 題 目

Effects of GLP-1 receptor agonist on changes in the gut bacterium and the underlying mechanisms (GLP-1 受容体作動薬による腸内細菌の変化が及ぼす影響とそのメカニズムについて)

申請者氏名 加藤 俊祐

### 研 究 目 的

腸内細菌と抗糖尿病薬の関連はいくつか報告されている。抗糖尿病薬の 1 つであるグルカゴン様ペプチド-1 受容体作動薬 (GLP-1RA) は、胃排泄遅延作用や嘔吐・下痢などの消化器作用を有するため、腸内細菌へ影響を与える可能性が高い。本研究は、GLP-1RA の 1 つであるリラグルチド (Lira) をマウスへ単回投与した際の、腸内細菌の変化とその影響、ならびにその機序について検討したものである。機序として交感神経系の関与を検討し、影響として宿主の食欲への影響と腸炎時の影響を検討した。

### 研 究 方 法

C57BL/6-マウスへ Lira を単回皮下投与し、16 時間欠食後に解剖し、盲腸内容物中の DNA を抽出した。qPCR を用いて腸内細菌の相対定量を行った。同様の条件で盲腸内容物中のノルエピネフリン (NE) 濃度を ELISA 法で測定した。また化学的交感神経遮断 (メデトミジン投与) または両側副腎摘除術後の条件下においても同様の検討を行った。Ussing chamber を用いて、腸管外への薬剤刺激により、腸管内腔側の NE 濃度が増加するかどうかを検討した。中枢神経系の関与を、最後野 (AP) ,孤束核 (NTS) ,脊髄中間外側核 (IML) における免疫染色 (c-fos) を用いて検討した。次に宿主の食欲に与える影響を、抗生物質投与実験と便移植実験を行い検討した。最後にデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 腸炎モデル (TLR4KO マウスを含む) において、腸炎時の宿主への影響を盲腸遺伝子発現、腸内細菌発現、脾臓への bacterial translocation (BT) (qPCR を用いて) の観点から検討した。

### 研 究 成 績

Lira 単回投与群は、対照群と比べ、盲腸内の大腸菌の構成成分である ClpB 発現が有意に高値であった。その際、盲腸内の NE 濃度も有意に高値となった。化学的交感神経遮断ではこれらの結果がキャンセルされたのに対し、副腎摘除では影響を受けなかった。よって、Lira による大腸菌増加の一因として、腸の交感神経終末からの NE 放出増加を考えた。Ussing chamber を用いた in vitro の実験で、腸管外側への薬剤刺激 (KCL、カプサイシン) によって、腸管内腔側において NE 濃度が有意に増加することを確認した。さらに同じ GLP-1RA であるエキセナチドを、腸管局所に投与しても腸管内腔側の NE 濃度が増加しなかったことより、GLP-1RA は局所ではなく、より中枢において作用する可能性が考えられた。Lira の単回投与で、AP、NTS、IML において c-fos 染色 (免疫染色) が増強された。よって、Lira は中枢神経系や IML の活性化を介して、腸への交感神経系を活性化する可能性が考えられた。次に大腸菌の増加が宿主に与える影響を検討した。ClpB 自体が宿主の食欲を抑制させるという既報があるため、抗生物質投与実験と、便移植実験を用いた実験を行ったが、食欲抑制効果は明らかでなかった。また下痢などの明らかな胃腸症状も認めなかった。よって、通常の条件下では 大腸菌の増加は、宿主に明らかな影響を与えていないと考えられた。続いて DSS 腸炎下の Lira 単回投与群において、大腸菌発現の有意な高値および、盲腸のタイトジャンクション (Tj) 遺伝子発現の有意な低値を確認した。Tj 遺伝子と大腸菌の発現量は、有意な負の相関関係にあった。また大腸菌の構成成分である LPS に反応しない TLR4KO マウスの DSS 腸炎条件では、Lira 単回投与群と対照群で Tj 遺伝子発現に差を認めなかった。よって野生型でみられた Lira 単回投与群の Tj 遺伝子発現低値は、大腸菌発現高値の結果である可能性が考えられた。最後に他臓器への BT を検討した。DSS 腸炎において Lira 単回投与群は脾臓への BT の頻度が有意に多かった。また、BT 陽性群は BT 陰性群に比べ、Tj 遺伝子発現が有意に低値であり、矛盾ない結果と考えられた。

### 結 論

Lira は中枢神経系の活性化を介して、腸管への交感神経系を活性化させ、腸管内腔への NE 放出の増加を介して、盲腸内の大腸菌を増加させる。通常条件下では、大腸菌の増加は宿主に大きな影響を与えないが、腸炎などのストレス状況では、大腸菌の増加が Tj 遺伝子発現を低下させることで、他臓器への BT を助長する可能性がある。

## 学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 八月朔日 泰和

申請者： 加藤 俊祐

論文題名：

Effects of GLP-1 receptor agonist on changes in the gut bacterium and the underlying mechanisms

(GLP-1 受容体作動薬による腸内細菌の変化が及ぼす影響とそのメカニズムについて)

要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、GLP-1 受容体作動薬の1つであるリラグルチドをマウスへ単回投与した際の、腸内細菌の変化とその影響、ならびにその機序について検討したものである。リラグルチドは中枢神経系の活性化、腸管への交感神経系の活性化、腸管内腔へのノルエピネフリン (NE) 放出の増加を介して、盲腸内の大腸菌を増加させた。通常条件下では、大腸菌の増加は宿主へ大きな影響を与えていないと考えられたが、DSS (デキストラン硫酸ナトリウム) 腸炎下では、大腸菌の増加がタイトジャンクション遺伝子発現を低下させることで、脾臓への Bacterial translocation を増加させることを明らかにした。本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さは以下の通りである。

### 1) 斬新さ

GLP-1 受容体作動薬の慢性投与による腸内細菌変化については既に報告されていたが、急性投与の影響および大腸菌の増加についての報告は存在しない。本研究は GLP-1 受容体作動薬の急性投与により大腸菌が増加することを初めて明らかにした点に斬新性がある。また機序の検討については、NE によって大腸菌が増加すること、GLP-1 受容体作動薬が交感神経活性化作用を有することについては既報があったものの、今回はその両者の関連を初めて証明した点に斬新性がある。大腸菌増加の短所にも注目し、腸炎モデルにおいて、タイトジャンクションの発現減弱とともに bacterial translocation 増加が起きることを証明した。GLP-1 受容体作動薬による腸内細菌変化と bacterial translocation 増加の

関連についての初の報告である。

### 2) 重要性

一般に GLP-1 受容体作動薬の効果の一部は、投与開始時に最も強くみられ、その後減弱していく現象が知られている。したがって、急性投与の影響を検討することは、GLP-1 受容体作動薬の本来の作用を反映する検討として重要であると言える。また、GLP-1 受容体作動薬の脾外作用については、宿主へ好影響を与えるという報告が多くみられるが、宿主への不利益をもたらすという報告は少ない。今回の研究では、GLP-1 受容体作動薬の急性投与による大腸菌の増加を明らかにし、かつ腸炎時には bacterial translocation の発生が増加する可能性があることを明らかにした。腸炎などのストレス状態においては、GLP-1 受容体作動薬は慎重投与を考慮すべき薬物であることを示唆する結果であり、本研究の臨床上の重要性を示すものと考えられる。

### 3) 実験方法の正確性

腸内細菌の qPCR を用いた評価、ELISA 法による NE 測定、盲腸遺伝子発現の RT-PCR を用いた評価は、確立された手法である。化学的交感神経遮断や副腎摘除マウス、DSS 腸炎モデルは既報に基づく手技や動物モデルである。本研究における解析は定量的に行われ、さらに統計学的検討も加えられており、客観的な評価法で正確性が高いと考えられる。

### 4) 表現の明瞭さ

既報や臨床上的事実から仮説を設定し、その立証のために妥当と考えられる実験を行い、GLP-1 受容体作動薬による腸内細菌の変化が及ぼす影響とそのメカニズムについて明らかにするための研究の目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考えられる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。