

GLP-1 受容体作動薬による腸内細菌の変化と そのメカニズムについて

加藤 俊祐, 脇 裕典

秋田大学医学系研究科 代謝・内分泌内科学講座

(accepted 28 April 2022)

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

Shunsuke Kato and Hironori Waki

Department of Metabolism and Endocrinology, Akita University Graduate School of Medicine

Key words : GLP-1, Norepinephrine, Microbiota

はじめに

代謝・内分泌内科学講座では、「インクレチンの腸外作用」についての研究成果を継続して発表してきた¹⁻⁶⁾。近年、腸内細菌叢の重要性が認識される中、私達は「インクレチンの腸外作用」として、「インクレチンの腸内細菌叢への作用」の検討をするに至った。インクレチンとは上部小腸の K 細胞から分泌される gastric inhibitory polypeptide (GIP) と下部小腸の L 細胞から分泌される glucagon-like peptide-1 (以下 GLP-1) の 2 つが本体である⁷⁾。GLP-1 受容体作動薬は GLP-1 の作用を高めることができる薬剤である。GLP-1 受容体は膵 β 細胞に存在しており、血糖依存性にインスリン分泌を促進することができる。これを膵作用と呼び、GLP-1 の基本的な作用である。GLP-1 受容体作動薬はヒト GLP-1 由来またはエキセンディン-4 由来の 2 つ

に分かれ、さらに作用時間や分子量などの違いによって細かく分類される⁸⁾。本研究ではヒト GLP-1 由来で 1 日 1 回注射が必要なりラグルチドを用いた。GLP-1 受容体は膵以外にも存在し作用するが、これを腸外作用と呼ぶ。胃への胃排泄遅延作用、中枢への食欲抑制作用が代表的な例である⁹⁾。その反面、嘔吐、便秘、下痢などの胃腸障害が副作用として見られる^{10,11)}。この事実に基づき、GLP-1 受容体作動薬が腸内細菌叢に影響を与える可能性を考えた。次に腸内細菌叢について、ヒトは約 1,000 種類の腸内細菌と共存していることが知られている。また腸内細菌は、宿主の健康、疾病、精神に影響を及ぼすことが、様々な研究結果より明らかにされている^{12,13)}。2016 年に、大腸菌の構成成分である Caseinolytic protease B (以下 ClpB) というタンパク質が宿主の食欲を抑制するという興味深い結果が報告された¹⁴⁾。そこで、私達は GLP-1 受容体作動薬の食欲抑制作用の 1 つの機序として、腸内細菌叢が関与する可能性を考えた。以上より、今回の実験目的は、GLP-1 受容体作動薬による腸内細菌の変化を調べることで、および変化するのであれば、その「機序」と「影響」について調べることにした。

Corresponding Author : Shunsuke Kato
Department of Metabolism and Endocrinology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
TEL : +81-18-884-6768
FAX : +81-18-884-6449
E-mail : katoshun@gipc.akita-u.ac.jp
令和 4 年 2 月 14 日 秋田医学会学術奨励賞受賞記念講演

GLP-1 受容体作動薬の急性投与は 大腸菌 ClpB を増加させる

GLP-1 受容体作動薬の急性投与による腸内細菌の変化を検討した。C57BL/6J マウス (8-16 週齢: 雄) を用い、GLP-1 受容体作動薬のリラグルチドを単回皮下注射 (0.2 mg/kg) して、16 時間欠食後に解剖した。結果、リラグルチド群で有意に盲腸内容物中 ClpB が高値であることが分かった (図 1A)。ClpB は大腸菌以外の細菌にも存在するため、その他のプライマーを用いて確認したが、同様の結果であった (図 1B)。さらに、この 2 つが有意な正の相関関係を持つことより、大腸菌由来の ClpB が増加したと考えられた (図 1C)。

GLP-1 受容体作動薬は、副腎では無く、 交感神経終末を由来として、 腸管内ノルエピネフリンを増加させる

大腸菌が増加する機序として、交感神経系の関与を発想した。その理由は、ノルエピネフリン (NE) が *in vitro* で大腸菌を増殖させるという既報があったからであり¹⁵⁾、また GLP-1 受容体作動薬は臨床的に、交感神経系を活性化させて脈拍を増加させることが知られていたから^{16,17)} である。腸管内のノルエピネフリン濃度は ELISA 法で測定した。ノルエピネフリンの発生源は交感神経終末と副腎の 2 か所であるが、これらの寄与を検討するため、化学的交感神経系遮断実験 ($\alpha 2$ 受容体作動薬であるメドトミジンを用いる) と、副腎摘除マウスを用いた実験を行った。結果、盲腸内 ClpB が高値となる時、盲腸内ノルエピネフリン濃度

もリラグルチド群で有意に高値となることが分かった (図 2A)。この時、化学的交感神経遮断を行うと、この現象はキャンセルされたが、副腎摘除マウスの実験では影響を受けなかった (図 2A, B)。したがって今回増加した腸管内ノルエピネフリンは、副腎由来では無く、交感神経終末由来であることが示唆された。

腸管内のノルエピネフリン増加は、 腸管局所への GLP-1 受容体刺激作用ではない

交感神経系活性化の機序を明らかにするため、まず腸管局所への直接作用を検討した。Ussing chamber という実験器具は本来生体上皮膜における電解質輸送を電気生理学的に測定するためのものである。今回この Ussing chamber を腸へ応用した。マウスの盲腸組織を切り開き、2 つの chamber の間に挟むと漿膜側と内腔側に隔てることできる。両側の chamber をクレープスリンゲル液で満たし、かつ酸素化をすることで、生きた状態で、盲腸組織からのノルエピネフリン放出を検討した。結果、盲腸漿膜側への KCL 投与において、内腔側のノルエピネフリン濃度が有意に増加することが分かった (図 3A)。しかしながら GLP-1 受容体作動薬であるエキセンディン-4 を投与した際には、内腔側ノルエピネフリン濃度は変化しないことが分かった (図 3B)。すなわち GLP-1 受容体作動薬の腸管局所への直接作用は否定的であると考えられた。

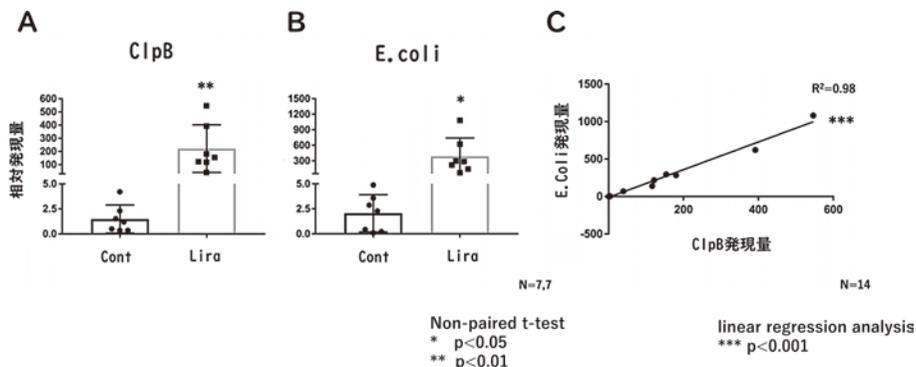


図 1: GLP-1 受容体作動薬の急性投与は大腸菌 ClpB を増加させる A: 盲腸内 ClpB 発現, B: 盲腸内 E. coli 発現, C: A と B の相関関係 (文献 19 より引用, 一部改変)

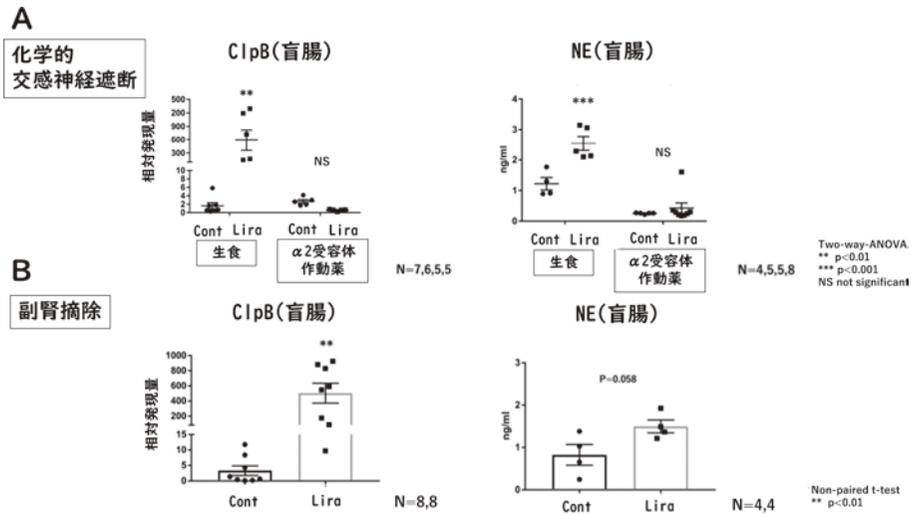


図2: GLP-1 受容体作動薬は、副腎では無く、交感神経終末を由来として、腸管内ノルエピネフリン (NE) を増加させる。A: 化学的交感神経遮断下における盲腸内 ClpB 発現と NE 濃度, B: 副腎摘除下における盲腸内 ClpB 発現と NE 濃度 (文献 19 より引用, 一部改変)

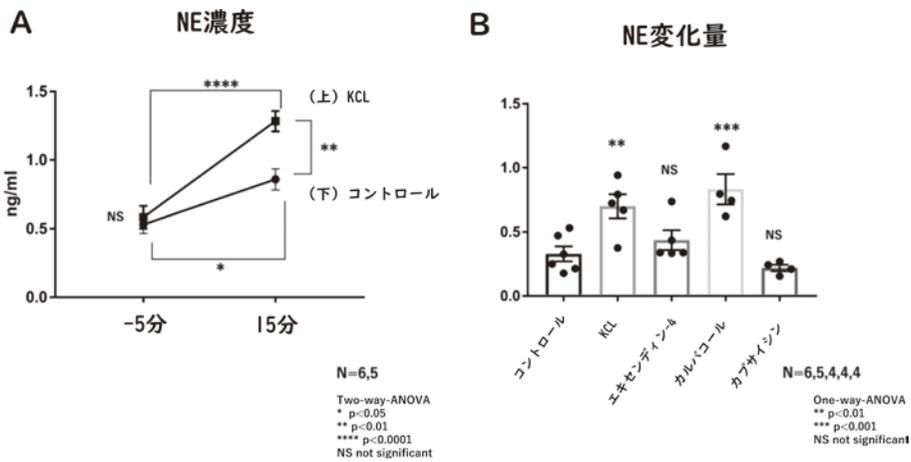


図3: 腸管内のノルエピネフリン (NE) 増加は、腸管局所への GLP-1 受容体刺激作用ではない。A: KCL 投与前後の腸管内腔側 NE 濃度, B: 薬剤による腸管内腔側 NE 濃度変化の違い (文献 19 より引用, 一部改変)

GLP-1 受容体作動薬は、最後野、孤束核、 脊髄中間外側核を活性化させる

次に中枢の関与を免疫化学染色で検討した。リラグルチド投与後2時間欠食下で解剖した。結果、リラグルチド群で、最後野、孤束核の両者において、c-Fos 発現の増加を認めた (図 4A)。また交感神経系遠心路

の中継点である脊髄中間外側核においても同様に、リラグルチド群で c-Fos 発現の増加を認めた (図 4B)。したがって、中枢神経系の活性化が、今回の現象に関与していることが示唆された。

(40)

GLP-1RAによる腸内細菌の変化と機序

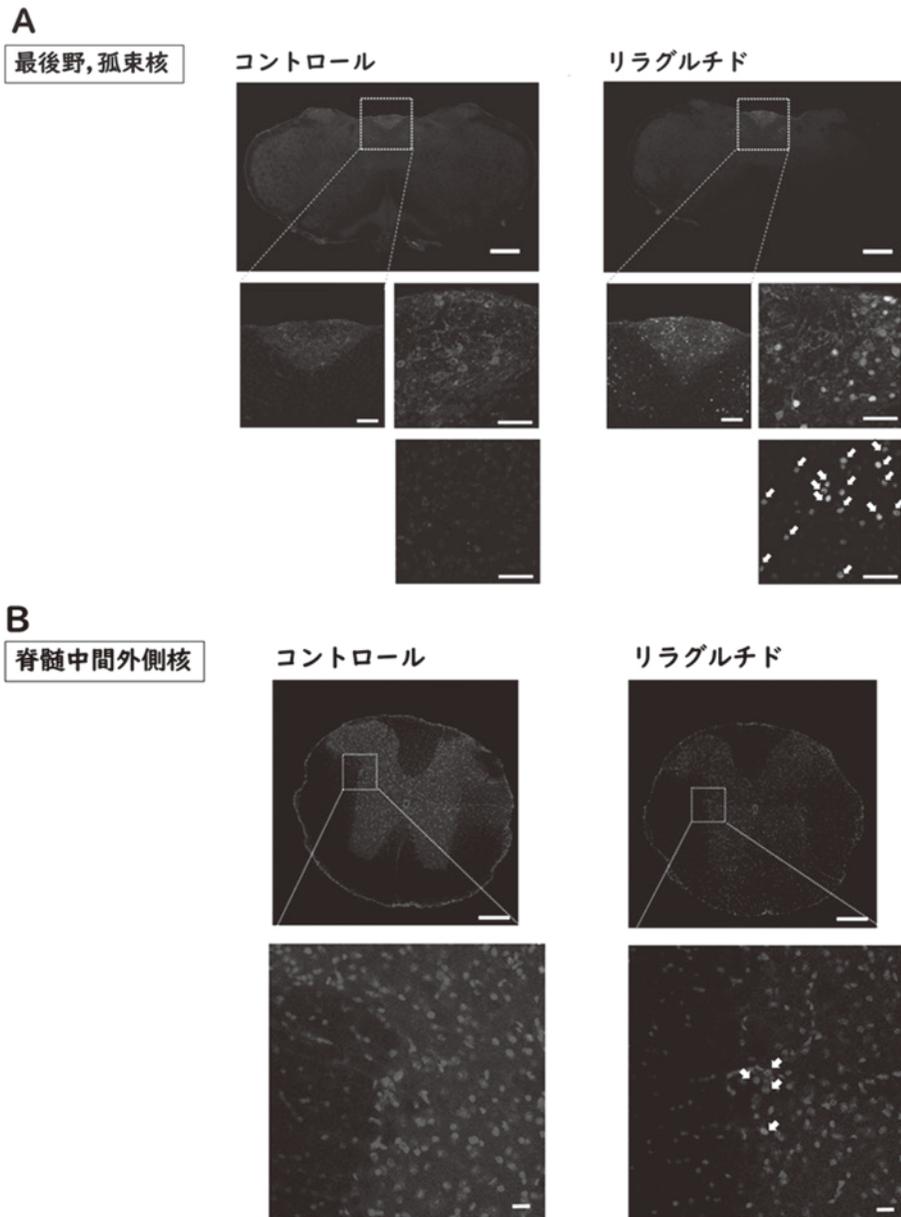


図4: GLP-1 受容体作動薬は, 最後野, 孤束核, 脊髄中間外側核を活性化させる A: 最後野, 孤束核における c-Fos 発現, B: 脊髄中間外側核における c-Fos 発現 (文献 19 より引用, 一部改変)

通常条件下で, 大腸菌の急増は
食欲に影響しない

続いて大腸菌増加の「影響」について検討した。まず食欲抑制効果を検討するため, 2つの実験を行った。

抗生剤投与実験は, 事前に抗生剤を飲水させて, 腸内細菌を抑制しておき, その状態でもリラグルチドが食欲を抑制させるかどうかを調べる実験である。便秘植実験は, リラグルチドを投与して大腸菌が増加した便そのものを, 他のマウスに経口投与し, 食欲が抑制さ

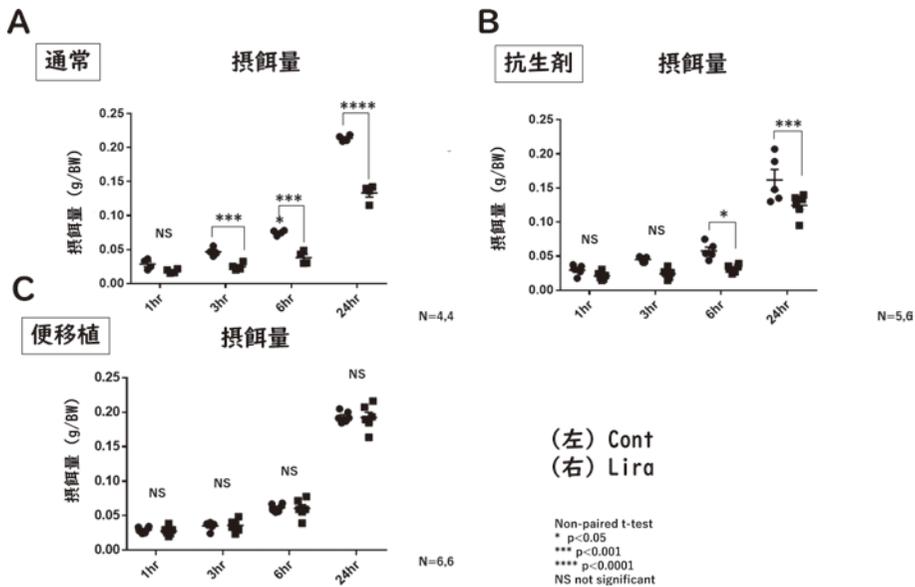


図5：通常条件下で、大腸菌の急増は食欲に影響しない 再摂食時の摂餌量の違い A：通常時，B：抗生剤投与時，C：便移植実験時（文献19より引用，一部改変）

れるかどうかを調べる実験である。結果、通常の状態では、予想どおり、リラグルチドによる食欲抑制効果がみられた（図5A）。しかし抗生剤投与マウスにおいても、リラグルチドの食欲抑制効果はほぼ同様に見られた（図5B）。さらに便移植実験では、リラグルチド投与群の便移植でも食欲抑制効果に差はなかった（図5C）。以上より、今回の実験系では大腸菌増加と食欲抑制の関与は否定的であった。

腸炎時、GLP-1 受容体作動薬で、野生型マウスの盲腸タイトジャンクション遺伝子発現が減弱するが、Toll-like receptor 4 欠損マウスでは減弱しない

次に大腸菌の持つ Lipopolysaccharide（以下 LPS）に注目した。既報で、LPSが腸管のタイトジャンクション遺伝子発現を減弱させることが報告されていた¹⁸⁾。したがって、大腸菌のその他の臓器への進展（Bacterial translocation）が起きる可能性を考えた。今回、ストレス状況での変化を検討すべく腸炎のモデルマウスを作成した（デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）投与により作成）。また今回は LPS の受容体である Toll-like receptor 4 が全身で欠損しているマウス（TLR4KO）

を含めて検討した。盲腸組織のタイトジャンクション遺伝子として Occludin（以下オクルジン）発現を調べ、Bacterial translocation の有無を、脾臓での ClpB 発現によって判定した。結果、腸炎時のみ、リラグルチド群で盲腸オクルジン発現が有意に低いことが分かった（図6A, B）。TLR4KOでは、この差が消失しており、オクルジンの変化は LPS に由来する可能性が考えられた（図6C）。

大腸菌発現と盲腸タイトジャンクション遺伝子発現は負に相関し、Bacterial translocation 発生は、GLP-1 受容体作動薬投与群において多い

野生型マウスにおいて、腸炎時の盲腸オクルジン発現量と盲腸内容物中の大腸菌 ClpB 量をプロットしたところ、有意な負の相関関係が認められた（図7A）。したがって、大腸菌の増加により、盲腸オクルジン発現が減弱する可能性が示唆された。この時リラグルチド群で、Bacterial translocation の発生がコントロール群と比べて有意に多くなった（図7B）。

(42)

GLP-1RAによる腸内細菌の変化と機序

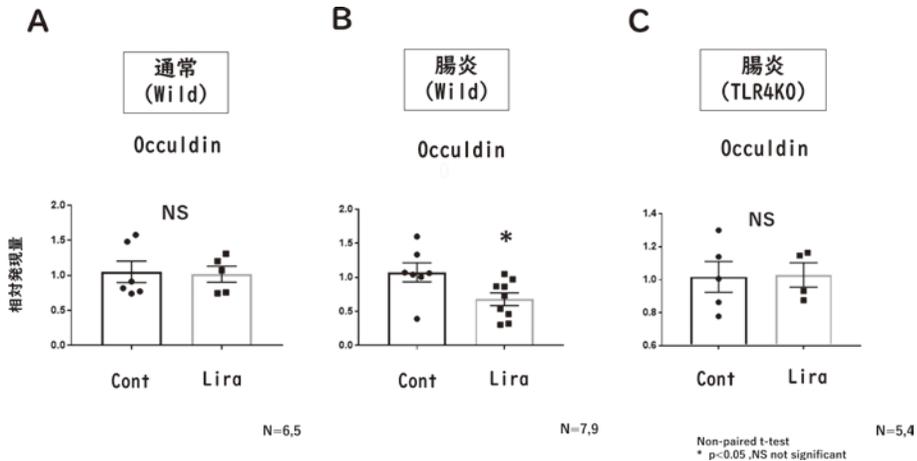


図6: 腸炎時, GLP-1 受容体作動薬で, 野生型マウスの盲腸タイトジャンクション遺伝子発現が減弱するが, Toll-like receptor 4 欠損マウスでは減弱しない。盲腸オクルジン遺伝子発現 A: 野生型マウス, B: 腸炎かつ野生型マウス, C: 腸炎かつ TLR4KO マウス (文献 19 より引用, 一部改変)

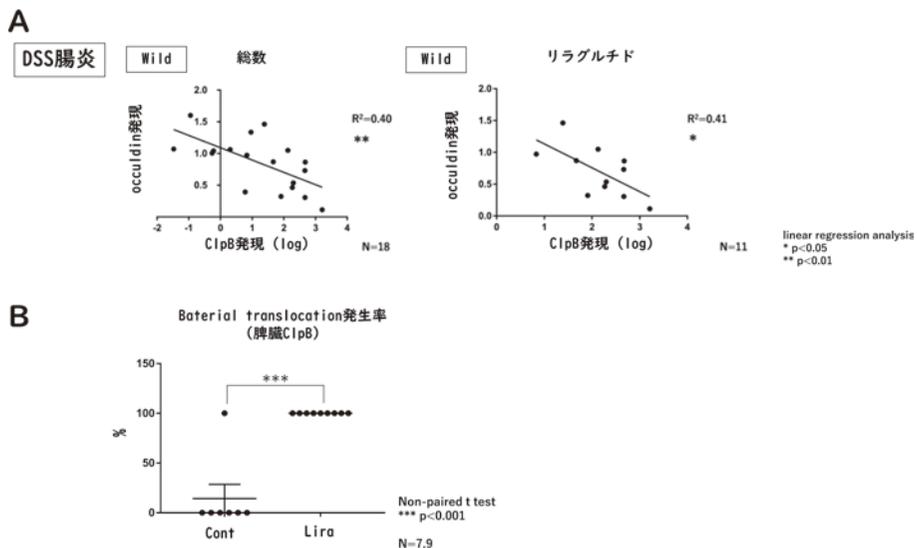


図7: 大腸菌発現と盲腸タイトジャンクション遺伝子発現は負に相関し, Bacterial translocation 発生は, GLP-1 受容体作動薬投与群において多い。A: 腸炎かつ野生型マウスにおける盲腸オクルジン遺伝子発現と盲腸内 ClpB 発現の相関, B: A における Bacterial translocation 発生率 (文献 19 より引用, 一部改変)

さいごに

GLP-1 受容体作動薬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放出の増加を介して, 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, 大腸菌の増加がタイトジャンクション遺伝子発現を低下させ, 他臓器への Bacterial translocation を助長する可能性があると考えられた¹⁹⁾ (図 8)。本研究は, GLP-1 の新たな副作用として, 腸内細菌叢への関与を明らかにした。今後は, ヒトにおける検証を行い, 大腸菌変化と

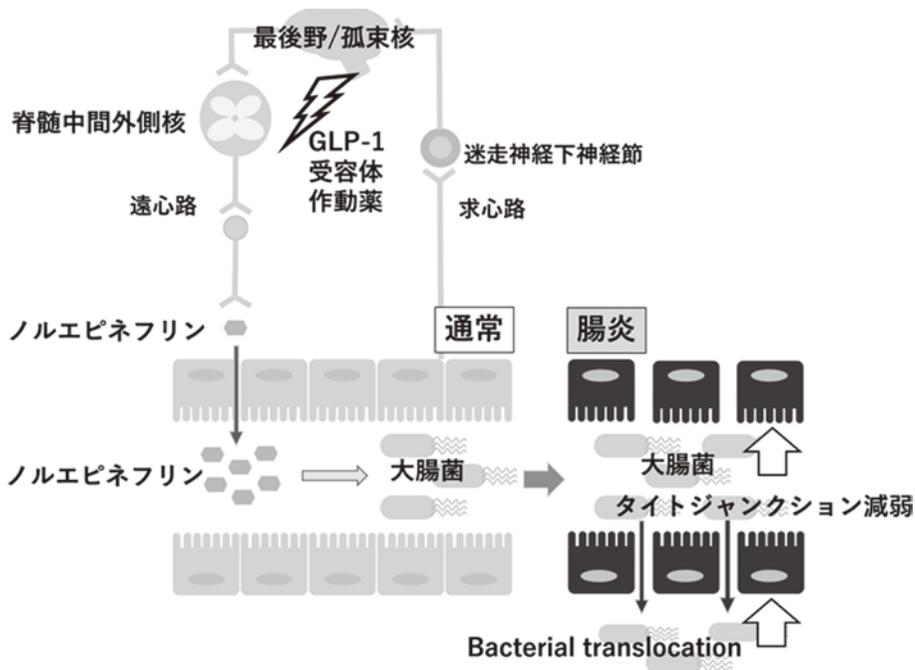


図8: GLP-1 受容体作動薬による腸内細菌の変化とそのメカニズム (文献19より引用, 一部改変)

GLP-1 受容体作動薬の作用・副作用の関連を調べたい。将来的に GLP-1 受容体作動薬の効果を事前に予測可能になること、副作用の胃腸障害を予防可能になることを期待する。また、基礎研究の継続として、その他の腸内細菌変化の検討および疾患モデルマウスでの検討を引き続き行う予定である。

謝 辞

本研究にあたり、関西電力病院 副院長 山田祐一郎先生、本学器官・統合生理学講座 河谷正仁前教授、名古屋大学環境医学研究所 神経系分野 II 河谷昌泰先生、本学代謝・内分泌内科学講座 脇裕典教授をはじめ多くの先生方にご指導いただきました。心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Fujita, H., Morii, T., Yamada, Y., *et al.* (2014) The protective roles of GLP-1R signaling in diabetic nephropathy: possible mechanism and therapeutic potential. *Kidney Int.*, **85**, 579-589.
- 2) Takashima, S., Fujita, H., Yamada, Y., *et al.* (2016) Stromal cell-derived factor-1 is upregulated by dipeptidyl peptidase-4 inhibition and has protective roles in progressive diabetic nephropathy. *Kidney Int.*, **90**, 783-796.
- 3) Shimizu, T., Sato, T., Yamada, Y., *et al.* (2017) Food Intake Affects Sperm-Egg Fusion Through the GIP/PSG17 Axis in Mice. *Endocrinology*, **158**, 2134-2144.
- 4) Fukuoka, Y., Narita, T., Yamada, Y., *et al.* (2019) Importance of physical evaluation using skeletal muscle mass index and body fat percentage to prevent sarcopenia in elderly Japanese diabetes patients. *J. Diabetes Investig.*, **10**, 322-330.
- 5) Suganuma, Y., Shimizu, T., Yamada, Y., *et al.* (2020) Magnitude of slowing gastric emptying by glucagon-like peptide-1 receptor agonists determines the amelioration of postprandial glucose excursion in Japanese patients with type 2 diabetes. *J. Diabetes Investig.*, **11**, 389-399.
- 6) Sato, T., Shimizu, T., Yamada, Y., *et al.* (2020) GLP-1 Receptor Signaling Differentially Modifies the Outcomes of Sterile vs Viral Pulmonary Inflammation in

- Male Mice. *Endocrinology*, **161**, bqaa201.
- 7) Seino, Y. and Yabe, D. (2013) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1: Incretin actions beyond the pancreas. *J. Diabetes Investig.*, **4**, 108-130.
 - 8) Kang, Y.M. and Jung, C.H. (2016) Cardiovascular Effects of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists. *Endocrinol. Metab. (Seoul)*, **31**, 258-274.
 - 9) Boer, G.A. and Holst, J.J. (2020) Incretin Hormones and Type 2 Diabetes-Mechanistic Insights and Therapeutic Approaches. *Biology (Basel)*, **9**, E473.
 - 10) Horowitz, M., Aroda, V.R., Rayner, C.K., *et al.* (2017) Upper and/or lower gastrointestinal adverse events with glucagon-like peptide-1 receptor agonists: Incidence and consequences. *Diabetes Obes. Metab.*, **19**, 672-681.
 - 11) Bettge, K., Kahle, M., Nauck, M.A., *et al.* (2017) Occurrence of nausea, vomiting and diarrhoea reported as adverse events in clinical trials studying glucagon-like peptide-1 receptor agonists: A systematic analysis of published clinical trials. *Diabetes Obes. Metab.*, **19**, 336-347.
 - 12) Sharon, G., Garg, N., Mazmanian, S.K., *et al.* (2014) Specialized metabolites from the microbiome in health and disease. *Cell Metab.*, **20**, 719-730.
 - 13) Zhang, X., Shen, D., Ji, L., *et al.* (2013) Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One.*, **8**, e71108.
 - 14) Breton, J., Tennoune, N., Fetissov, S.O., *et al.* (2016) Gut Commensal E.coli Proteins Activate Host Satiety Pathways following Nutrient-Induced Bacterial Growth. *Cell Metab.*, **23**, 324-334.
 - 15) Burton, C.L., Chhabra, S.R., Williams, P., *et al.* (2002) The growth response of Escherichia coli to neurotransmitters and related catecholamine drugs requires a functional enterobactin biosynthesis and uptake system. *Infect Immun.*, **70**, 5913-5923.
 - 16) Baggio, L.L., Ussher, J.R., Drucker, D.J., *et al.* (2017) The autonomic nervous system and cardiac GLP-1 receptors control heart rate in mice. *Mol. Metab.*, **6**, 1339-1349.
 - 17) Baggio, L.L., Yusta, B., Drucker, D.J., *et al.* (2018) GLP-1 Receptor Expression Within the Human Heart. *Endocrinology*, **159**, 1570-1584.
 - 18) Qin, L., Huang, W., Wu, X., *et al.* (2015) LPS Induces Occludin Dysregulation in Cerebral Microvascular Endothelial Cells via MAPK Signaling and Augmenting MMP-2 Levels. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 120641.
 - 19) Kato, S., Sato, T., Yamada, Y., *et al.* (2021) Effects of GLP-1 receptor agonist on changes in the gut bacterium and the underlying mechanisms. *Sci. Rep.*, **11**, 9167.