

サルコペニア予防を目的とした牛乳とシンバイオティクスの創出
京都府立医科大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学
岡村 拓郎

要旨

サルコペニアと肥満が合併したサルコペニア肥満は、2型糖尿病の病的特徴である。牛乳がサルコペニア予防に有用であることは、いくつかのヒト試験で示されている。本研究は、*db/db* マウスにおけるサルコペニア性肥満の予防に対する牛乳の効果を明らかにすることを目的とした。雄の *db/db* マウスを用いて、無作為化・医師盲検化試験を行った。8週齢の *db/db* マウスを8週間飼育し、ゾンデを用いて牛乳(100 μ L/日)を与えた。糞便移植(FMT)群には、6週齢から2週間抗生物質を投与し、その後、16週齢まで週2回 FMT を行った。*db/db* マウスへの牛乳投与により、握力(牛乳-: 164.2 ± 4.7 g、牛乳+: 230.2 ± 56.0 g、 $p = 0.017$)、筋肉量(ヒラメ筋、牛乳-: 164.2 ± 4.7 mg、Milk+: 230.2 ± 56.0 mg、 $p < 0.001$; 足底筋、Milk-: 13.3 ± 1.2 mg, Milk+: 16.0 ± 1.7 mg, $p < 0.001$)、内臓脂肪量の減少(Milk-: 2.39 ± 0.08 g, Milk+: 1.98 ± 0.04 mg, $p < 0.001$)が見られ、身体活動量が大幅に増加しました(明期: $p = 0.013$, 暗期: $p = 0.034$)。牛乳を与えたマウスの FMT は、サルコペニア型肥満を改善するだけでなく、耐糖能異常も有意に改善した。小腸の遺伝子発現をマイクロアレイ解析したところ、牛乳を与えたマウスでは、アミノ酸吸収トランスポーター遺伝子である *Slc7a5* ($p = 0.010$), *Slc7a1* ($p = 0.015$), *Ppp1r15a* ($p = 0.041$), *Slc7a11* ($p = 0.029$) の発現が上昇した。腸内細菌叢の 16S rRNA シーケンスでは、牛乳を与えたマウスと FMT 群の両方で、牛乳を与えたマウスより *Akkermansia* 属が増加した。本研究の結果から、牛乳の摂取はアミノ酸などの栄養素の摂取量を増やす以外に、腸内環境も変化させ、牛乳によるサルコペニア肥満の改善メカニズムに寄与している可能性があることが示唆された。

緒言

超高齢社会において、サルコペニアの発症予防は最重要課題であり、申請者らはかねてからサルコペニアの病態解明について研究を続けてきた(Okamura T, et al. J Clin Biochem Nutr 2019. Bamba R, Okamura T, et al. J Cachexia Sarcopenia Muscle 2021)。さらに 2021 年度「牛乳製品健康科学」学術研究の中で、京都府立医科大学内分泌代謝内科外来通院中の 2 型糖尿病患者 110 名を対象とした観察研究において、簡易型自記式食事歴法質問票により評価した牛乳の摂取量が 135mL/day 以上の患者は 135mL/day 未満の患者と比較し、サルコペニアの有病率が低く、血清中のフェニルアラニンやメチオニン濃度が高値であるという結果を得た。その一方で先述の牛乳摂取の多い患者と少ない患者の間で 1 日タンパク質摂取量に有意な差を認めなかったことから、牛乳が何らかのメカニズムによって消化管からのアミノ酸吸収を変化させているのではないかと考えた。

そこで申請者らは先行研究を実施し、野生型マウスに通常食もしくは粉ミルク混餌食を与えたところ、通常食投与マウスと比較し、粉ミルク混餌食投与マウスの小腸粘膜ではアミノ酸輸送体である Pept1 の遺伝子発現が有意に上昇していることを明らかにしている。

上記の前年度のヒトを対象とした学術研究の結果と先行研究における動物実験の結果から、牛乳の摂取が腸内環境、主には腸内細菌叢を変えることで前述の遺伝子発現を変化させていると考えた。そこで本研究では粉ミルクを与えた実験動物の腸内細菌叢を解析することで、牛乳摂取により増加した腸内細菌を同定し、サルコペニア予防を目的とした牛乳と腸内細菌の併用法(シンバイオティクス)の開発を目指す。

方法

実験動物

すべての実験手順は、京都府立医科大学動物実験委員会（承認番号：M2022-84）により承認された。雄の *db/db* マウスを用い、無作為化・医師盲検化試験を実施した。

第 1 ステージ

7 週齢の *db/db* 雄性マウスを清水実験材料（日本、京都市）から購入し、病原体のない管理された環境で飼育した。個別ケージに収容されたマウスには、8 週齢から 8 週間、普通食（ND；345kcal/100g、脂肪 kcal 4.6%；CLEA, Tokyo, Japan）を与えた。サンプルサイズは、相対的握力を目安に EZR を用いて解析した。両群間の平均差は 1.02、平均標準偏差は 0.44、有意水準は 0.05、検出力は 80%で計算すると、必要なサンプルサイズは 6 であった。6 匹のマウスを、(1) 牛乳を与えないマウス、(2) 牛乳（明治特選北海道牛乳、株式会社明治、東京）を与えるマウスの 2 群に分けた。ヒト研究では牛乳を 150 mL/日以上飲む 2 型糖尿病高齢者において、サルコペニアの有病率が低かった。そこで、約 150mL/日（体重 60kg 相当）に対して、100 μ L/日（体重 40g 相当）の牛乳をゾンデでマウスに 8 週間投与した。その後、マウスを一晩絶食させ、16 週齢で麻酔（4.0 mg/kg midazolam、0.3 mg/kg

medetomidine、および 5.0 mg/kg butorphanol) に晒して安楽死させた (図 1A)。

第 2 ステージ

FMT は、腸内細菌叢に関連する疾患モデルにおいて、腸内細菌叢の因果関係を明らかにするアプローチとして広く認知されている。より良い生着率を得るために、抗生物質を用いてレシピエントの腸内細菌叢を枯渇させるため (アンピシリン、ネオマイシン、メトロニダゾール：各 1g/L、バンコマイシン：0.5g/L、200 μ L/日、経口胃内投与)、FMT 前の 6~8 週齢の 2 週間実施した。3 日間の回復後、FMT を週 2 回実施した。FMT 用の便は牛乳を与えずに飼育した 16 週齢の *db/db* マウスと牛乳を与えた *db/db* マウスから、200~300mg の新鮮な便を採取した。便を 5mL のリン酸緩衝生理食塩水でホモジナイズし、重力下で 2 分間沈降させた。こうして得られた上清の 200 μ L を各レシピエントマウスに投与し、腸の抽出に使用した。牛乳を与えずに飼育した 16 週齢の *db/db* マウス (FMT (db)) と牛乳を与えた *db/db* マウスの便を FMT した *db/db* マウス (FMT (M)) について体重変化、グルコース耐性、握力の評価を行った。その後、マウスを犠牲にし、ヒラメ筋および足底筋の筋肉量と精巢上体周囲脂肪量を測定した。

運動量の測定

マウスは、ランニングホイール (MK-713：室町機械) を設置したケージに個別に収容された。各ケージに設置した走行輪の回転数は、走行輪に接続したコンピュータ内のソフトウェア (CompACT AMS Ver.3：室町機械) を用いて、12 時間の夜間サイクルでそれぞれ記録した。

グルコースおよびインスリン負荷試験

15 週齢のマウスを、16 時間絶食後の腹腔内ブドウ糖負荷試験 (iPGTT) (2g/kg 体重) および 5 時間絶食後のインスリン負荷試験 (ITT) (0.5U/kg 体重) に供試した (S3)。血液サンプルは尾静脈から採取した。血糖値はグルコメーター (Gulitest mint II; 三和化学研究所、名古屋、日本) を用いて測定した。iPGTT および ITT は、異なるマウスで実施した。血糖値は注射後 0 分、15 分、30 分、60 分、120 分にモニターした。iPGTT と ITT の結果の曲線下面積 (AUC) を分析した。

握力測定

握力は、16 週齢のマウスに対しマウス用握力計 (モデル DS2-50N、株式会社イマダ、日本、豊橋市) を用いて測定した。毎日、1 分間隔で 6 回の連続測定を行った。研究者は、マウスのグループ分けについて盲検化されていた。握力は体重で正規化した。

血液生化学検査

血液サンプルは、心臓穿刺により採取し、14,000rpm で 10 分間、4°Cで遠心分離した後に血清サンプルを収集した。採取した血清は、分析のために協力会社に郵送されるまで-30°Cで保存した。アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 値、トリグリセリド (TG)、非エステル化脂肪酸 (NEFA) 値を測定した。

ヒラメ筋の組織学的解析

ヒラメ筋組織を採取し、10%ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋、筋肉は最大膨隆部で切断した。筋切片を作成し、ヘマトキシリン&エオジン (HE) で染色した。BZ-X710 蛍光顕微鏡 (キーエンス、大阪、日本) を用いて画像を取り込み、断面積と直径を測定した。

マウス筋肉における遺伝子発現解析

16 時間絶食させたマウスの足底筋を摘出し、直ちに液体窒素で凍結した。氷冷した QIAzol Lysis reagent (Qiagen, Venlo, The Netherlands) を用い、ボールミルで 4000rpm、2 分間ホモジナイズし、製造者の指示に従い total RNA を抽出した。High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて、製造者の指示に従って、全 RNA (0.5 μ g) を第一鎖の cDNA に逆転写させた。足底筋における *Foxo1*、*Mstn*、*Fbxo32*、および *Trim63* の mRNA 発現は、Real time(RT)-PCR を用いて定量した。PCR 条件は、50°Cで 2 分、95°Cで 20 秒の 1 サイクル、その後 95°Cで 1 秒、60°Cで 20 秒の 40 サイクルであった。各標的遺伝子の相対発現は、*Gapdh* の閾値サイクル (Ct) 値に対して正規化し、比較閾値サイクル 2- Δ Ct 法を用いて定量化した。牛乳を与えていないマウスのシグナルは相対値 1.0 を割り当てた。各群 6 匹のマウスの発現量を測定し、RT-PCR を各サンプルについて 3 連で実施した。

空腸と結腸の組織学的解析

マウスから摘出した空腸を直ちに 10%ホルムアルデヒドで結腸はカルノア液中で 22°C、24 時間固定し、パラフィンに包埋して 4 μ m 厚の切片にし、HE 染色と過ヨウ素酸シフ (PAS) 染色を行った。染色した切片の画像は、蛍光顕微鏡 (BZ-X710; キーエンス) を用いて撮影した。絨毛の高さ/幅および陰窩の深さは、6 匹の動物の各グループについて、スライドあたり 5 箇所 HE および PAS 染色切片を用いて、ImageJ ソフトウェア (Version 1.53 k, NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて計測した。ムチンおよび杯細胞 (PAS+) の数を計測し、ImageJ ソフトウェアを用いて 10 個の陰窩あたりの平均杯細胞 (PAS+) を算出した。

空腸の mRNA シークエンス

マウスの空腸を摘出し、直ちに液体窒素で凍結した。RNA 抽出方法は、"マウス筋肉における遺伝子発現解析" の項に記載したものと同様であった。TruSeq® Stranded mRNA kit (Qiagen, Carlsbad, CA, USA) を用いて、cDNA ライブラリーを構築した。ペアエンドシ

ーケンスは、Illumina NovaSeq6000 プラットフォームを使用して実施した (n = 3)。アミノ酸、脂肪酸、グルコーストランスポーターに関連する mRNA 発現は、ボルケーノプロットとヒートマップを用いて可視化した。

マウス小腸からの単核球の単離

小腸のサンプルは、実験に使用するまで、RPMI 中の冷たい 2%FBS 中で保存した。小腸の粘膜固有層 (LPL) の単核細胞は、Lamina Propria Dissociation Kit (130-097-410; Miltenyi Biotec, Germany)を用いて、分離した。細胞ペレットを 5 mL の 40% Percoll®に再懸濁し、細胞懸濁液を 5 mL の 80% Percoll®の底層を含む遠沈管の上部にゆっくりと添加した。密度勾配遠心分離 (420×g、20 分) を行い、中間層の単核球を 1mL ピペットで静かに抽出した。抽出した単核球を 2%FBS/PBS で 2 回洗浄した。

組織調製とフローサイトメトリー

前項と同様にして得られた細胞懸濁液を、マウス BD™ブロック精製抗マウス CD16/CD32 mAb (394656; clone: 2.4G2; 1/100; BD Biosciences, Piscataway, NJ, USA) と 22°Cで 10 分間プレインキュベートした。自然リンパ系細胞のゲートに使用した抗体は以下に記載する。細胞懸濁液を、Biotin-CD3e (100304; クローン: 145-2C11; 1/200; eBioscience, San Diego, CA, USA)、Biotin-CD45R/B220 (103204; クローン: RA3-6B2; 1/200; eBioscience), Biotin-Gr-1(108404; clone: RB6-8C5; 1/200; eBioscience)、Biotin-CD11c (117304; クローン: N418; 1/200; eBioscience)、Biotin-CD11b (101204; クローン: M1/70; 1/200; eBioscience)、Biotin-Ter119 (116204; クローン: TER-119; 1/200; eBioscience)、Biotin-FceRIa (134304; clone: MAR-1; 1/200; eBioscience)、Brilliant Violet 510™ -Streptavidin (405233; 1/500; eBioscience) , PE-Cy7-CD127 (135014; clone: A7R34; 1/100; eBioscience)、Pacific Blue-CD45 (103116; clone: 30-F11; 1/100; eBioscience)、および Fixable Viability Dye eFluor 780 (1/400; eBioscience) を 4°Cにて 20 分かけて処理した。細胞懸濁液を 2%FBS/PBS で 2 回洗浄し、固定用バッファー (420801; BioLegend, CA, USA) を用いて 30 分間固定した。2%FBS/PBS で洗浄後、細胞懸濁液を PE-GATA-3(clone TWAJ, 1/50; eBioscience)、APC-ROR γ (clone AFKJS-9, 1/50; eBioscience)、FITC-T-bet (clone 4B10, 1/50; BioLegend) の混合物でインキュベートした (補足図 1)。M1 および M2 マクロファージのゲートには、以下の抗体を使用した: FITC-CD206 (MA516870; クローン: MR5D3, 1/50; eBioscience)、PE-F4/80(12480182; クローン: BM8, 1/50; eBioscience)、APC-CD45. 2 (17045482; clone: 104, 1/50; eBioscience), PE-Cy7-CD11c (25011482; clone: N418, 1/50; eBioscience), and APC-Cy7-CD11b (47011282; clone: M1/70, 1/50; eBioscience) (補足図 2)。染色した細胞を Canto II フローサイトメーターで解析し、FlowJo ソフトウェア (バージョン 10; TreeStar, Ashland, OR, USA) を用いてデータを解析した (n = 6)。

血清および骨格筋サンプル中のアミノ酸および有機酸レベル、血清および糞便サンプル中の短鎖脂肪酸 (SCFAs) レベルの測定

マウス血清および腓腹筋中のアミノ酸および有機酸、ならびにマウス血清および糞便中の SCFA の組成は、Agilent 7890B/7000D システム (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で実施したガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) を用いて測定しました。20mg の腓腹筋と糞を 500 μ L のアセトニトリルと 500 μ L の蒸留水中で、ボールミル (4000rpm、2 分間) で粉碎してホモジナイズした。血清サンプルは、次のステップに進む前にボールミルで粉碎しなかった。次に、サンプルを 37°C で 30 分間 1000rpm で振とうし、室温で 3 分間 14000rpm 遠心分離した。上清 (500 μ L) を分離し、これに 500 μ L のアセトニトリルを加え、混合物を 37°C で 3 分間、1000rpm で振盪した。14,000rpm、3 分間、室温で遠心分離した後、0.1mol/L NaOH で pH を 8 に調整し、アミノ酸、有機酸および SCFA を抽出した。アミノ酸、有機酸、SCFA の濃度は、オンライン固相抽出法 (SPE 法) を採用した GC/MS で測定しました。SPE-GC システム SGI-M100 (AiSTI SCIENCE, Wakayama, Japan) は、試料をバイアルに入れ、オートサンプラートレイにセットすると、SPE と GC/MS システムへの注入が自動的に行われる。固相階層化には Flash-SPE ACXs (AiSTI SCIENCE 社製) を使用した。アミノ酸および有機酸のレベルを測定するために、前述の各サンプル抽出物の 50 μ L アリコート固相にロードし、アセトニトリルと水 (1:1) で洗浄した。その後、アセトニトリルで脱水し、0.5%メトキシアミン-ピリジン溶液 4 μ L を含浸させた。その後、N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドを固相に供給して誘導体化時にメトキシ化とトリメチルシリル化を行い、ヘキサンで溶出した。最終生成物を PTV インジェクター-LVI-S250 (AiSTI SCIENCE 社製) に注入し、温度を 220°C で 0.5 分間維持し、50°C/分で徐々に上昇させて 290°C にし、そこで 16 分間保持した。キャピラリーカラム Vf-5 ms (30 m \times 0.25 mm [内径] \times 0.25 μ m [膜厚]; Agilent Technologies) に試料をロードしました。カラム温度は 80°C で 3 分間保持した後、25°C/分で 190°C、3°C/分で 220°C、15°C/分で 310°C まで徐々に昇温し、4.6 分間保持した。サンプルはスプリットモードでスプリット比 50:1 で注入した。SCFA を測定するために、前述の各サンプル抽出物の 50 μ L アリコート固相にロードし、アセトニトリルおよび水 (1:1) で洗浄した。その後、アセトンで脱水し、N-tert-butyltrimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide-toluene 溶液 (1:3) 4 μ L を含浸し、固相上で誘導体化した後ヘキサンで溶出した。最終生成物を PTV インジェクター-LVI-S250 から注入し、温度を 150°C で 0.5 分間維持し、25°C/分で 290°C まで徐々に昇温し、そこで 16 分間保持した。キャピラリーカラム Vf-5 ms (30 m \times 0.25 mm [内径] \times 0.25 μ m [膜厚]; Agilent Technologies) に試料をロードしました。カラム温度は 60°C で 3 分間保持し、10°C/分で 100°C まで、20°C/分で 310°C まで徐々に昇温し、7 分間保持した。試料はスプリットモードでスプリット比 20:1 で注入した。アミノ酸、有機酸、SCFA はスキャンモードで検出した (m/z、70-470)。すべての結果は、アミノ酸、有機酸、SCFA について、

それぞれノルロイシン、アジピン酸、テトラデウテロ酢酸 (0.01 mM) のピーク高さに正規化した (n = 6)。

16S rRNA シーケンシング

QIAamp DNA Feces Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) を用いて、製造者の説明書に従って、凍結した盲腸糞便サンプルから微生物 DNA を抽出した。細菌ユニバーサルプライマーセット (341F および 806R) を用いて、DNA から 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を増幅させた。PCR は、EF-Taq (韓国、ソルジェント社) を用い、30 μ L の反応混合液に 20ng のゲノム DNA を鋳型として、以下のサーモサイクルのパラメータで実施した：95°C、2 分間で Taq ポリメラーゼを活性化し、95°C、55°C、72°C を各 1 分間で 35 サイクル行い、最後に 72°C で 10 分間のステップを行った。増幅産物は、マルチスクリーンフィルタープレート (Millipore Corp., Billerica, MA, USA) を用いて精製した。MiSeq シーケンサー (Illumina, CA, USA) を用いて、製造者の説明書に従って 16S rRNA のシーケンスを行った (Macrogen, Seoul, Korea)。配列の品質フィルタリングには、QIIME バージョン 1.9.1 (S12)。スコアが 75% 未満のバーコードまたはプライマーは、ファイルから除外した。運用分類単位 (OTU) の数は、類似度 97% で UCLUST アルゴリズムを用いて決定した (S13)。また、BLAST (UNITE, 2017) を用いて、Greengenes コアセットの UNITE 配列セットを UCLUST と ITS で整列した 16S rRNA の分類学的割り当てを行った。

KEGG オルソログ存在量予測は、Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt2) ソフトウェアを用いて得た (S14)。

グループ内のフィラの相対的な存在量は、Holm-Šidák 多重比較検定付き一元配置分散分析を用いて評価した。アルファ多様性 (個々のサンプル内の多様性と定義) は、Chao1 (S15)、Shannon (S16)、Gini-Simpson 指数 (S17) を用いて分析した。

グループ間の細菌属の相対的存在量は、効果量測定 (LEfSe) と組み合わせた線形判別分析 (LDA) (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/lefse/>、2022 年 5 月 15 日にアクセス) を使用して評価した (S18)。正規化された相対存在量行列を用いて、LEfSe は有意に存在量が異なる分類群を示し、LDA を用いてその特徴の効果量を推定した。本研究で取り上げたすべてのバイオマーカーについて、p 値閾値 0.05 (Wilcoxon rank-sum 検定)、効果量閾値 2 を使用しました。

さらに、FMT の有効性を判断するために主座標分析 (PCoA) を行い、Tinn-R Gui version 1.19.4.7, R version 1.36 (S19) を用いて、生成するクラスター数を 2 と事前指定した非階層 K 平均クラスター分析を実施した。

統計解析

データの解析には、JMP ver. 14.0 ソフトウェア (SAS, Cary, NC, USA) を使用した。2 つのグループの比較には、paired t-test を使用した。4 群の比較には、Holm-Šidák 多重比較検

定付き One-way ANOVA を用いた。統計的有意性は、 $p < 0.05$ とした。図は、GraphPad Prism ソフトウェア（バージョン 9.3.1; San Diego, CA, USA）を用いて作成した。

結果

マウスの体重、運動量、iPGTT および ITT、肝酵素、および脂質代謝

牛乳入り ND を与えたマウス（Milk+群）と牛乳なしの ND を与えたマウス（Milk-群）の体重に差は見られなかった（図 1B）。走行輪の回転数は、Milk+群で有意に増加した（Fig. 1C）。耐糖能は、iPGTT および ITT を用いて評価した。iPGTT で測定した血糖値には、両群間で有意な差は認められなかった（図 1D）。しかし、ITT の結果、Milk+群の方が血糖値が低いことが明らかになった（図 1D）。握力の絶対値および相対値は、Milk+群で Milk-群に比べ有意に増加した（図 1E）。AST、ALT、TG 値は両群間で有意な差は認められなかったが、NEFA 値は Milk+群で Milk-群に比べ有意に低下した（図 1F）。

マウスのヒラメ筋および足底筋の評価と筋萎縮遺伝子の発現量

HE 染色したヒラメ筋切片の代表画像を図 2A に示す。ヒラメ筋の断面積は、Milk+群の方が Milk-群よりも大きかった（図 2B）。ヒラメ筋および足底筋の絶対重量および相対重量は、Milk+群で有意に増加した（図 2C, D）。Milk+群の精巣上体脂肪の絶対重量および相対重量は、Milk-群のそれよりも低かった（図 2E）。ヒラメ筋の萎縮に関連する遺伝子の発現を測定した。Foxo1、Mstn、Fbxo32、Trim63 の発現は Milk+群で Milk-群に比べ有意に低かった（図 2F）。

マウスの空腸と大腸の組織学的分析、ILC1s、ILC3s、M1 マクロファージの比率、トランスポーターの発現の変化

空腸と結腸の切片を HE と PAS で染色した代表画像を図 3A に示す。Milk+群では、Milk-群に比べ、絨毛の重量と幅が有意に増加した（図 3B）。さらに、Milk+群では、クリプトの深さが有意に減少し、クリプトに対する杯細胞の割合が増加した（図 3C）。小腸における ILC1s および ILC3s と CD45+細胞の比率、M1 マクロファージと M2 マクロファージの比率を評価した。Milk+群では ILC1 が有意に減少し、ILC3 が増加した（図 3D）。また、M1/M2 比は牛乳+群の方が牛乳-群より低かった（図 3D）。骨格筋におけるいくつかのトランスポーターの発現の違いを、次世代シーケンズを用いて解析した。特に、*Slc7a5*、*Slc7a1*、*Ppp1r15a*、*Slc7a11* などのアミノ酸トランスポーター遺伝子は、Milk+群で Milk-群よりも発現量が高かった。脂肪酸トランスポーター遺伝子である *Tbc1d1*、*Ager1*、*Abca1* は Milk+群で発現量が多く、*Pparg*、*Myc* は発現量が少なかった。*Tbc1d1* や *G6pc* などのグルコーストランスポーター遺伝子は、Milk+群で高い発現量を示した（図 3E および F）。

マウスの血清および骨格筋サンプル中のアミノ酸および有機酸、血清および糞便サンプル

中の短鎖脂肪酸の分析

次に、血清および骨格筋中のアミノ酸および有機酸の濃度を GC/MS システムを用いて調査した。Milk+群の血清中のバリン、ロイシン、イソロイシン、グリシン、セリン、スレオニン、メチオニン、フェニルアラニン、クエン酸、リジンの濃度は Milk-群に比べ有意に高かった (表 1)。同様に、Milk+群の骨格筋中のバリン、ロイシン、イソロイシン、グリシン、セリン、アスパラギン酸、メチオニン、フェニルアラニン、クエン酸、リジンの濃度は、Milk-群のそれよりも有意に高かった。逆に、Milk+群の血清中のコハク酸の濃度は、Milk-群よりも高かったが、骨格筋では逆の結果が見られた。

血清および糞便中の SCFA の濃度を測定した。血清中の酢酸濃度は両群間で差がなかったが、牛乳+群のプロピオン酸および酪酸の濃度は牛乳-群に比べ有意に高かった (表 1)。また、Milk+群の骨格筋中の酢酸、プロピオン酸、酪酸の濃度は、Milk-群より高かった。

糞便移植マウスの体重、運動量、iPGTT および ITT、肝酵素、および脂質代謝

腸内細菌叢の役割と食事による牛乳補給の効果を明らかにするために、FMT を実施した (図 4A)。牛乳-群の FMT (FMT(db)群) と牛乳+群の FMT (FMT(M)群) の間で体重に差は見られなかった (図 4B)。また、走行車輪の回転数は、FMT(M)群が FMT(db)群に比べ有意に高かった (図 4C)。さらに、FMT(db)群の iPGTT と ITT の AUC は、FMT(M)群よりも低かった (図 4D)。握力の絶対値および相対値は、FMT(M)群が FMT(db)群よりも有意に高かった (図 4E)。AST、ALT、TG、NEFA の値は、両群間で差は認められなかった (図 4F)。

糞便移植マウスのヒラメ筋および足底筋の評価と筋萎縮遺伝子の発現量

HE 染色したヒラメ筋切片の代表画像を図 5A に示す。ヒラメ筋の断面積は、FMT(M)群の方が FMT(db)群より大きかった (図 5B)。また、ヒラメ筋と足底筋の絶対重量と相対重量は、FMT(M)群で有意に増加した (図 5C, D)。さらに、FMT(M)群の精巣上体周囲脂肪の絶対重量および相対重量は、FMT(db)群に比べ低くなっていた (図 5E)。また、ヒラメ筋における Foxo1、Mstn、Fbxo32、Trim63 などの筋萎縮関連遺伝子の発現は、FMT(M)群で減少していた (図 5F)。

糞便移植マウスの血清および骨格筋試料中のアミノ酸および有機酸、血清および糞便試料中の短鎖脂肪酸の解析

FMT(M)群のバリン、ロイシン、イソロイシン、グリシン、セリン、スレオニン、メチオニン、フェニルアラニン、リジンの血清濃度は FMT (db) 群に比べ有意に高かった (表 2)。同様に、FMT (M) 群の骨格筋におけるバリン、ロイシン、イソロイシン、グリシン、メチオニン、フェニルアラニン、クエン酸、リジンの濃度は、FMT (db) 群のそれよりも有意に高かった。この結果は、Milk-群および Milk+群で観察された結果と同様であった。一方、

前実験で血清および筋肉中のコハク酸濃度について観察された傾向は、FMT 群では観察されなかった。血清および糞便中の SCFA の濃度を測定した。酢酸、プロピオン酸、酪酸の濃度は、FMT (M) 群で FMT (db) 群に比べ有意に高かった (表 2)。

Milk-群、Milk+群、FMT (db) 群、FMT (M) 群の腸内細菌叢の構成について

4 つのグループにおける異なる門の相対的な存在比を調べた。Milk+と FMT(M)群では、Milk-と FMT(db)群よりも Bacteroidetes 門が多く、Firmicutes 門は少なかった (図 6A)。OTU 数は、Milk+群と FMT(M)群で増加した (図 6B)。多様性の指標である Chao1、Shannon index、Simpson index は、Milk+群と FMT(M)群で Milk-群と FMT(db)群より高かった (図 6B)。LEfSe アルゴリズムを用いて、Milk-群と Milk+群、FMT(db)群と FMT(M)群の間で変動的に分布する特定の分類群を特定した。Milk+群では、Milk-群に比べて 6 つの分類群 (Verrucomicrobia 門、Akkermansia 属など) が多く、5 つの分類群 (Deltaproteobacteria 綱、Bdellovibrionaceae 科など) が少なかった (図 6C)。また、FMT(M)群では FMT(db)群に比べて 7 つの分類群 (Verrucomicrobia 門、Akkermansia 属など) が多く、5 つの分類群 (Lactobacillaceae 科、Bacteroides 門など) が少なかった (図 6C)。

次に、PICRUSt を用いて、Milk-群と Milk+群、および FMT (db) 群と FMT (M) 群の間の腸内細菌叢の KEGG パスウェイの差異を解析した。KEGG パスウェイクラス I のうち、Milk+群では Milk-群に比べ、細胞プロセスや環境情報処理のパスウェイが上昇し、代謝や生体システムのパスウェイは低下していた。一方、FMT(M)群では、FMT(db)群に比べ、環境情報処理のパスウェイがアップレギュレートされ、ヒト疾患、代謝、生体系のパスウェイがダウンレギュレートされた (補足表 2、図 6D)。KEGG パスウェイクラス II のうち、細胞運動、遺伝情報処理、膜輸送、シグナル伝達、転写のパスウェイは、Milk+群に比べアップレギュレートされ、アミノ酸代謝、他の二次代謝物の生合成、糖質代謝、細胞プロセスとシグナル伝達、酵素ファミリー、糖鎖生合成と代謝、他のアミノ酸の代謝、ヌクレオチド代謝、複製と修復、輸送と異化は、ダウンレギュレートされた。FMT(M)群では FMT(db)群に比べ、膜輸送と転写の経路が上昇し、その他の二次代謝物の生合成、内分泌系、エネルギー代謝、選別、分解、糖鎖生合成と代謝の経路がダウンレギュレートされた (補足表 3、図 6E)。FMT の有効性は PCoA を用いて判定した。重み付けなし、重み付けありのクラスタリングの結果、Milk+群と FMT(db)群、Milk+群と FMT(M)群は同じクラスタに属することがわかった (図 6 F)。

考察

今回、サルコペニア肥満モデルマウスに牛乳を投与したところ、筋力と筋肉量が増加し、内臓脂肪量が減少したため、身体活動量が有意に増加した。さらに、牛乳+群の糞便を移植すると、サルコペニア肥満が改善されるだけでなく、耐糖能異常も有意に改善された。このことから、栄養補給だけでなく、牛乳の投与による腸内細菌叢の改変がサルコペニア肥満の改

善に関与している可能性が示唆された。

骨格筋のアミノ酸濃度および有機酸濃度は、Milk+群で増加した。牛乳には、必須アミノ酸を含む多くのアミノ酸が含まれている。血清と骨格筋の両サンプル中のこれらのアミノ酸の濃度は、Milk+群で Milk-群よりも高かった。栄養摂取量の増加に加え、小腸からのアミノ酸吸収量が増加したことも、Milk+群の骨格筋におけるアミノ酸濃度が高くなった理由である。アミノ酸吸収トランスポーター遺伝子である *Slc7a1*、*Slc7a5*、*Slc7a11* の発現は、Milk+群で有意に上昇した。これらの結果から、牛乳が腸の炎症を改善することが示唆された。フローサイトメトリーの結果、ミルク+群では小腸の粘膜固有層で、腸管で IL-22 を分泌し杯細胞からのムチン分泌を促進する ILC3 数が増加した¹。組織学的解析では、牛乳投与により絨毛の萎縮が改善され、ムチン層が厚くなっていることが確認された。牛乳+群では、小腸前膜の ILC1 や M1 マクロファージなどの炎症細胞が減少していた²。Milk+群の糞便中では、酪酸を含む SCFA の産生が増加した。SCFA は ILC3 からの IL22 の分泌を促進することが報告されていることから³、牛乳投与による腸内の SCFA の増加は、牛乳が誘導する抗炎症メカニズムの 1 つであると考えられる。腸の炎症は、筋肉の生合成を促すのに重要なアミノ酸などの栄養素の吸収不良を引き起こすことが、これまでのいくつかの報告で指摘されている⁴。興味深いことに、KEGG パスウェイの結果、アミノ酸代謝に関与する細菌叢が Milk+群および FMT(M)群で減少していることが判明した。このことから、牛乳摂取によるアミノ酸吸収量の増加は、腸内細菌叢の変化よりも、抗炎症作用を介したアミノ酸吸収トランスポーターの発現量の増加との関連性が高い可能性が示唆されました。以上のことから、牛乳投与に伴う腸内 SCFA 濃度の上昇による抗炎症細胞数の増加、および炎症細胞数の減少により小腸からのアミノ酸吸収が増加し、血中および骨格筋のアミノ酸濃度が上昇し、サルコペニアが改善された可能性が考えられる。

牛乳を投与した際の腸内細菌叢の変化と、牛乳+群の FMT を検討した。腸内細菌叢は、栄養吸収、代謝の恒常性、感染防御、全身および粘膜免疫の発達に重要な役割を担っている⁵。腸内細菌叢の異常は、肥満やメタボリックシンドロームと密接な病理学的・生理学的相互作用がある⁶。したがって、食事に関連する代謝の変化を評価するために腸内細菌叢を調べることは適切である。本研究では、牛乳+群および FMT (M) 群の糞便において、牛乳群および FMT (db) 群と比較して、*Akkermansia* 属の存在量が有意に増加していることが確認された。*A. muciniphila* は、上皮の粘液層で粘液溶解酵素を生産し、ムチンを窒素や炭素源として利用でき、これらの物質を酢酸やプロピオン酸に分解する⁷。本研究で観察された酢酸、プロパン酸、ブタン酸などの SCFA の増加は、*A. muciniphila* の増加にも一因があると考えられる。また、*A. muciniphila* の濃縮は、ヒトの耐糖能、血清脂質、脂肪細胞の分布など、身体の代謝状態を評価する指標として用いることができる⁸。*A. muciniphila* の濃縮度は、2 型糖尿病患者の腸内では低いことが報告されている⁹。*A. muciniphila* の濃縮度はメタボリックシンドロームの指標となるだけでなく、動物実験では *A. muciniphila* の経口投与により高脂肪食による肥満が解消されることが報告されている¹⁰。牛乳投与後の腸内細菌

叢における *Akkermansia* 属の増加も報告されている¹¹。本研究では、牛乳+群における内臓脂肪量の減少が FMT(M)群でも認められたことから、腸内細菌叢の改変と *A. muciniphila* の増加が内臓脂肪量の減少に関与している可能性が考えられる。

筋肉量の減少と *A. muciniphila* の関連性については、ほとんど報告がない。ヒトを対象とした観察研究では、肝硬変のサルコペニア患者の腸内細菌叢において *Akkermansia* 属の減少が報告されており¹²、慢性腎臓病のサルコペニア患者の腸内細菌叢において *Akkermansia* 属が増加した¹³。マウスモデルでは、中強度の運動が、*Akkermansia* 属などの腸内細菌叢の組成に有意かつ再現性のある変化を示している¹⁴。本研究では、牛乳を与えたマウスと牛乳を与えたマウスから FMT を行ったマウスにおいて、運動量の増加が観察された。これは主に筋肉量と筋力の増加によるものと予想され、運動量の増加が腸内細菌叢の改変に寄与している可能性がある。この点については、さらなる研究が必要である。

最後に、牛乳摂取と耐糖能異常の改善との関連について説明する。いくつかのメタアナリシスで、牛乳の摂取が耐糖能と関連することが報告されています。また、21 カ国の 147,812 人を対象とした最近の研究では、全脂乳製品の摂取量が多いほど、糖尿病の発症率が低いことが示されています¹⁵。一方、デンマークの 97,811 人を対象とした観察研究では、牛乳の摂取は 2 型糖尿病や肥満のリスク低下と関連しないことも報告されています¹⁶。また、1,904,220 人を対象とした UK バイオバンク研究では、牛乳の摂取と 2 型糖尿病の発症との間に有意な相関は認められなかった¹⁷。本試験では、ベアフィーディングにより両群に同量の餌を与えたが、牛乳を与えたマウスは餌に加えて牛乳を摂取したため、牛乳を与えなかったマウスと比較して総摂取カロリーがわずかに増加した。このことが影響したのか、ミルク+群の iPGTT の AUC はミルク-群のそれよりも低い傾向にあったが、その差は統計的に有意ではなかった。一方、FMT(M)群では FMT(db)群に比べて明らかに耐糖能が改善したことから、牛乳による耐糖能改善のメカニズムには腸内細菌叢の改変が関与していると考えられる。*A. muciniphila* と 2 型糖尿病との関連性については、いくつかの報告がある。動物実験では、低温殺菌した *A. muciniphila* またはその外膜タンパク質 Amuc_1100* を投与すると、Toll 様受容体 2 が活性化され、tight junction protein の発現が増加し、高脂肪食による肥満が回復し、インスリン抵抗性も低下することが報告されている¹⁸。また、ヒトの研究では、2 型糖尿病や糖尿病予備軍と診断された患者において *A. muciniphila* の存在量の減少が観察されており⁹、*A. muciniphila* の相対比率はヘモグロビン A1c 値と有意な負の相関があることが報告されている¹⁹。牛乳による耐糖能の改善には、*Akkermansia* 種を含む腸内細菌叢の改変が大きく寄与している可能性が示唆される。

以上のことから、牛乳で ND を摂取したマウスから FMT を行ったマウスにおいて、サルコペニア型肥満と血糖値の改善が見られたことから、牛乳摂取に伴うアミノ酸などの栄養素の摂取量の増加だけでなく、小腸の炎症の改善を介した小腸上皮のアミノ酸トランスポーター関連遺伝子の改変によるアミノ酸の吸収量の増加が、牛乳によるサルコペニア型肥満の改善に寄与する可能性があると考えられる。

引用文献

1. Victor AR, Nalin AP, Dong W, McClory S, Wei M, Mao C *et al.* IL-18 Drives ILC3 Proliferation and Promotes IL-22 Production via NF- κ B. *The Journal of Immunology* 2017;**199**:2333–2342.
2. Bernink JH, Peters CP, Munneke M, Te Velde AA, Meijer SL, Weijer K *et al.* Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol* 2013;**14**:221–229.
3. Yang W, Yu T, Huang X, Bilotta AJ, Xu L, Lu Y *et al.* Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity. *Nat Commun* 2020;**11**.
4. de Sire A, de Sire R, Petito V, Masi L, Cisari C, Gasbarrini A *et al.* Gut-Joint Axis: The Role of Physical Exercise on Gut Microbiota Modulation in Older People with Osteoarthritis. *Nutrients* 2020;**12**.
5. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res* 2020;**30**:492–506.
6. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis* 2015;**26**.
7. Huang K, Wang MM, Kulinich A, Yao HL, Ma HY, Martínez JER *et al.* Biochemical characterisation of the neuraminidase pool of the human gut symbiont *Akkermansia muciniphila*. *Carbohydr Res* 2015;**415**:60–65.
8. Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO *et al.* *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* 2016;**65**:426–436.
9. Pascale A, Marchesi N, Govoni S, Coppola A, Gazzaruso C. The role of gut microbiota in obesity, diabetes mellitus, and effect of metformin: new insights into old diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2019;**49**:1–5.
10. Cani PD, de Vos WM. Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of *Akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol* 2017;**8**.
11. Wang Z, Jiang S, Ma C, Huo D, Peng Q, Shao Y *et al.* Evaluation of the nutrition and function of cow and goat milk based on intestinal microbiota by metagenomic analysis. *Food Funct* 2018;**9**:2320–2327.
12. Ponziani FR, Picca A, Marzetti E, Calvani R, Conta G, Del Chierico F *et al.* Characterization of the gut-liver-muscle axis in cirrhotic patients with sarcopenia. *Liver Int* 2021;**41**:1320–1334.

13. Margiotta E, Caldiroli L, Callegari ML, Miragoli F, Zanoni F, Armelloni S *et al.* Association of Sarcopenia and Gut Microbiota Composition in Older Patients with Advanced Chronic Kidney Disease, Investigation of the Interactions with Uremic Toxins, Inflammation and Oxidative Stress. *Toxins (Basel)* 2021;**13**.
14. Liu Z, Liu HY, Zhou H, Zhan Q, Lai W, Zeng Q *et al.* Moderate-Intensity Exercise Affects Gut Microbiome Composition and Influences Cardiac Function in Myocardial Infarction Mice. *Front Microbiol* 2017;**8**.
15. Bhavadharini B, Dehghan M, Mente A, Rangarajan S, Sheridan P, Mohan V *et al.* Association of dairy consumption with metabolic syndrome, hypertension and diabetes in 147 812 individuals from 21 countries. *BMJ Open Diabetes Res Care* 2020;**8**.
16. Bergholdt HKM, Nordestgaard BG, Ellervik C. Milk intake is not associated with low risk of diabetes or overweight-obesity: a Mendelian randomization study in 97,811 Danish individuals. *Am J Clin Nutr* 2015;**102**:487–496.
17. Vimalaswaran KS, Zhou A, Cavadino A, Hyppönen E. Evidence for a causal association between milk intake and cardiometabolic disease outcomes using a two-sample Mendelian Randomization analysis in up to 1,904,220 individuals. *Int J Obes (Lond)* 2021;**45**:1751–1762.
18. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L *et al.* A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* 2017;**23**:107–113.
19. Shih CT, Yeh YT, Lin CC, Yang LY, Chiang CP. *Akkermansia muciniphila* is Negatively Correlated with Hemoglobin A1c in Refractory Diabetes. *Microorganisms* 2020;**8**:1–13.

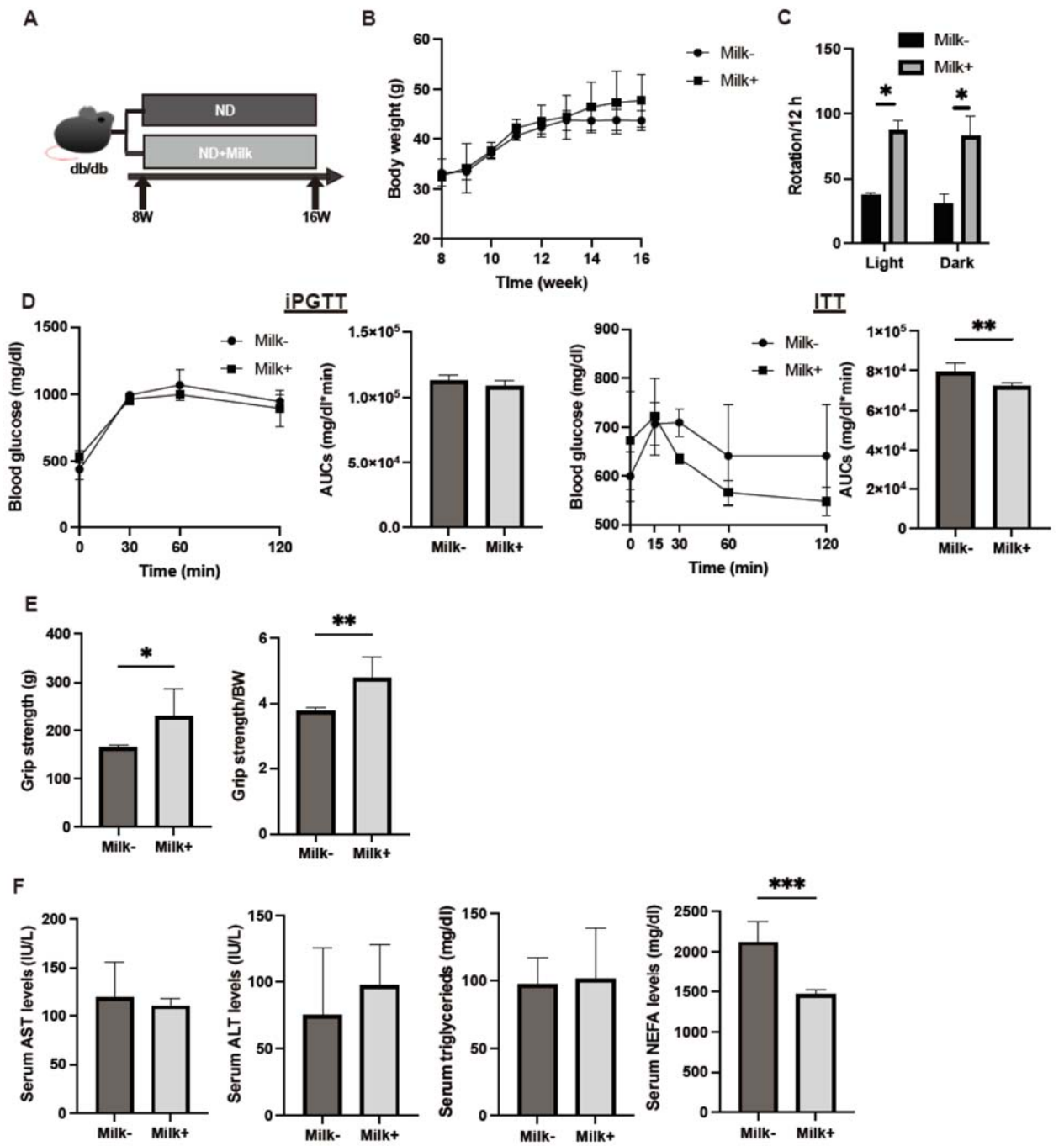


Figure 1

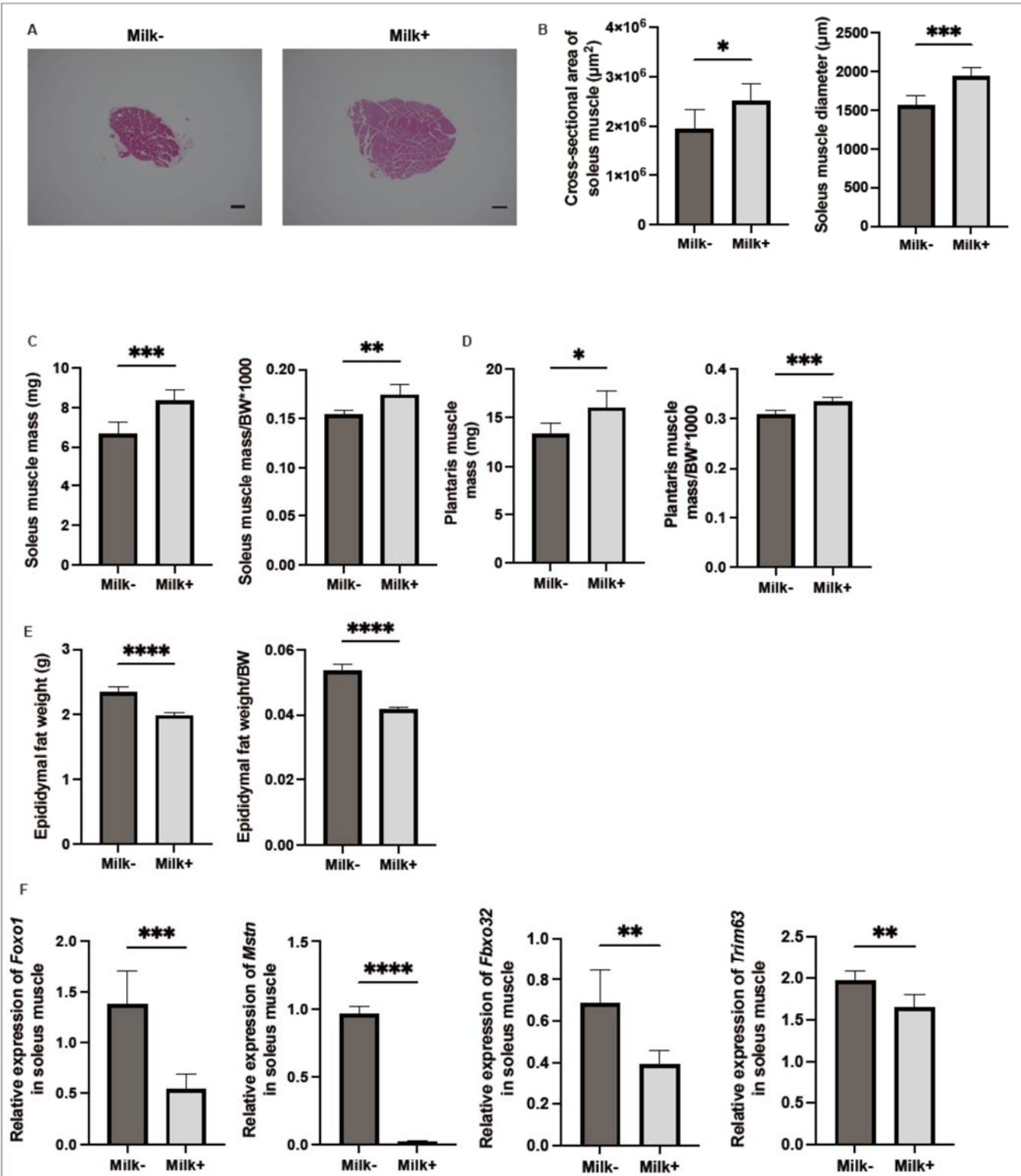
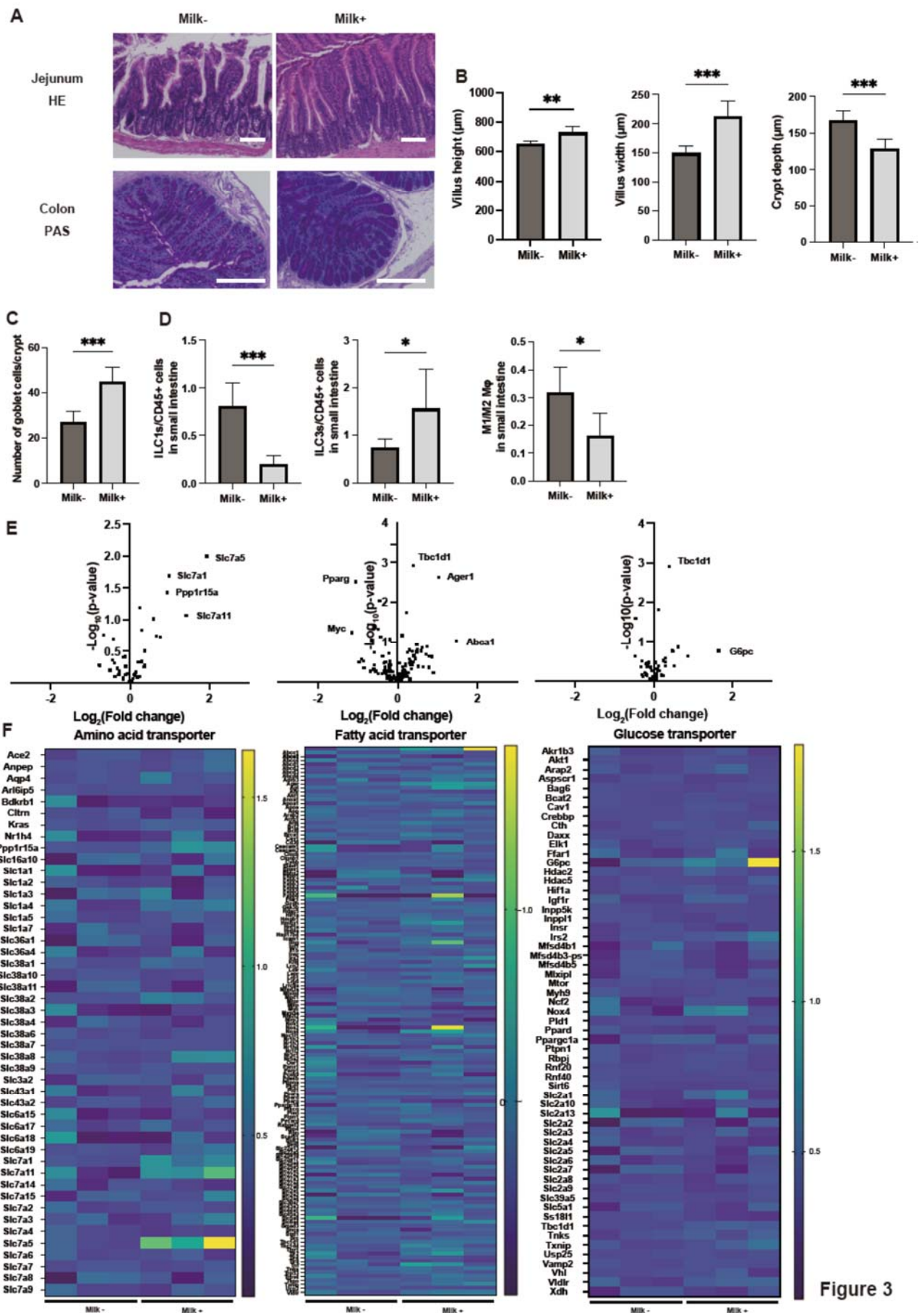


Figure 2



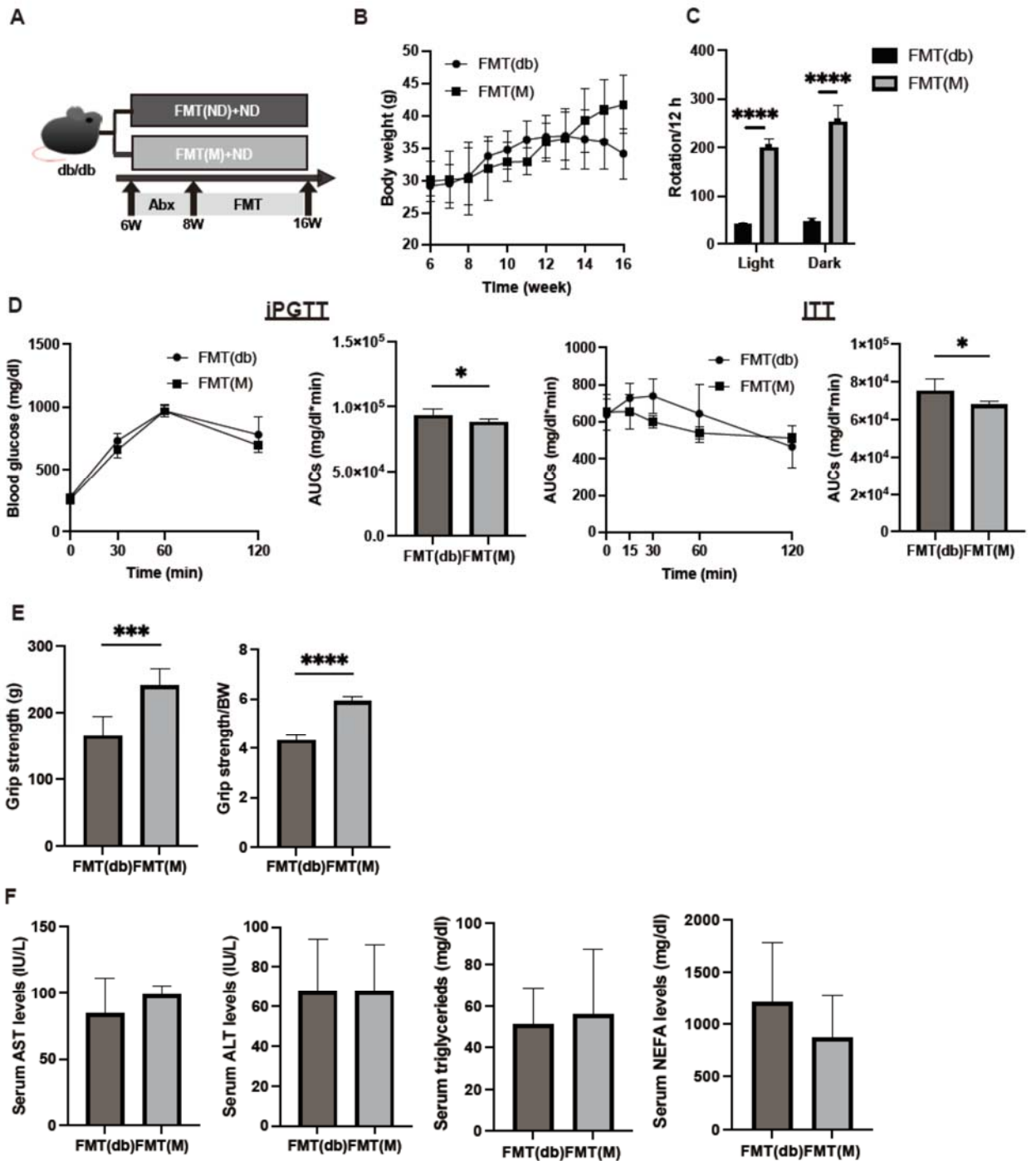


Figure 4

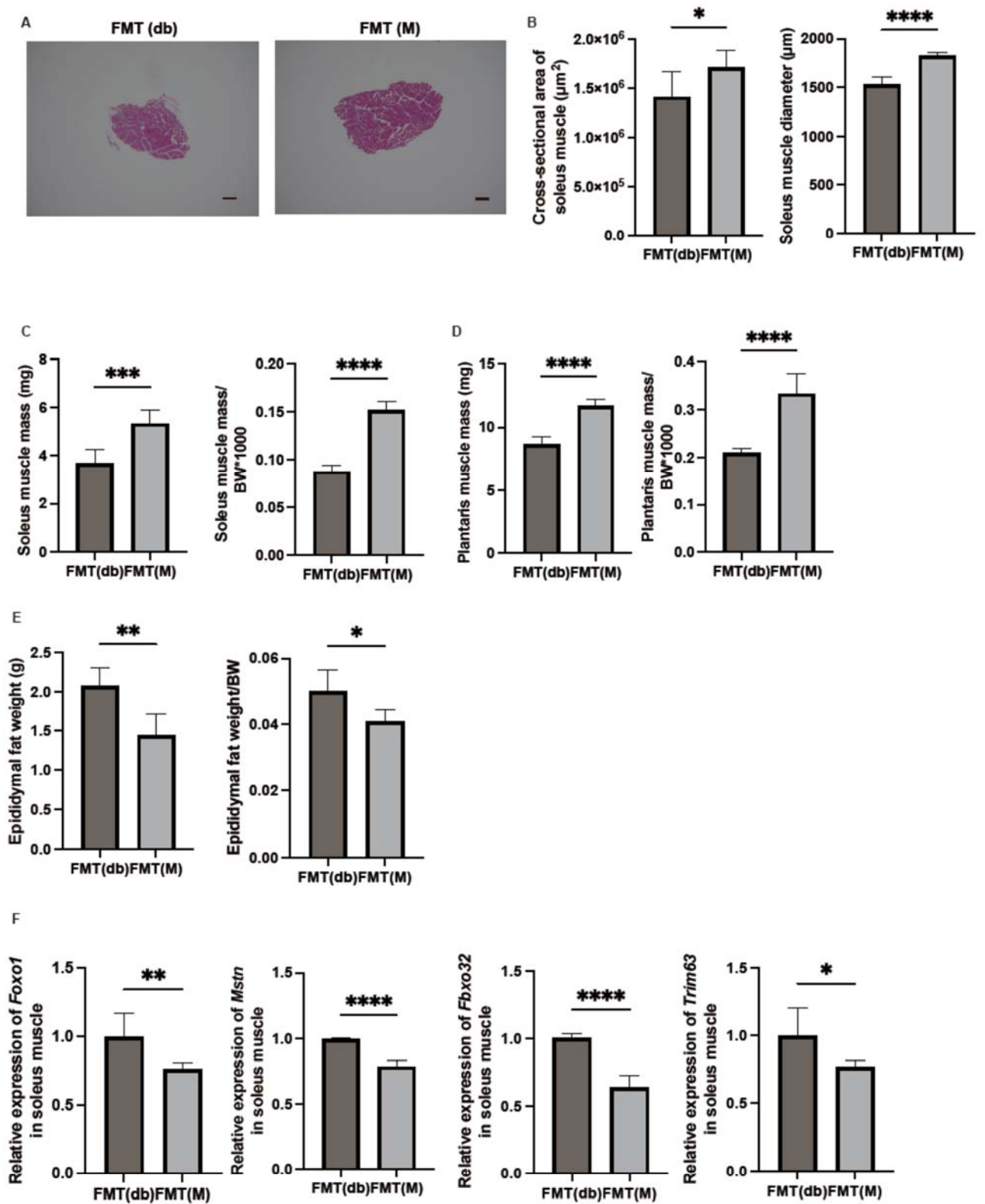


Figure 5

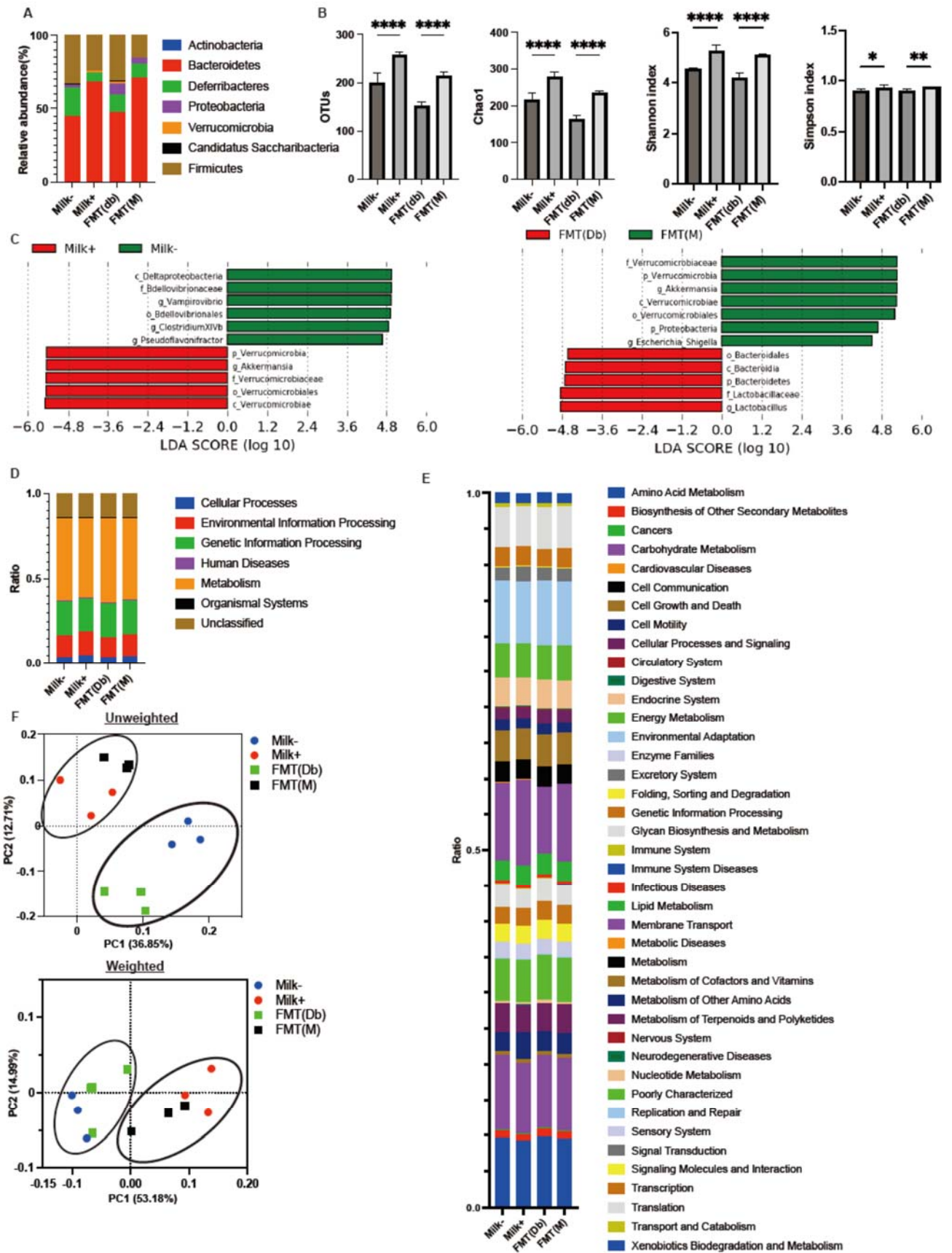


Figure 6

Table 1. Amino acids and organic acids in sera and skeletal muscle, and short-chain fatty acids in sera and feces

Amino acids	Sera ($\mu\text{mol/L}$)			Skeletal muscle ($\mu\text{mol/mg}$)		
	Milk -	Milk +	<i>p</i> -value	Milk -	Milk +	<i>p</i> -value
Alanine	176.8 (58.9)	110.5 (50.5)	0.139	3.2 (1.0)	2.2 (0.4)	0.057
Valine	114.4 (92.2)	1003.7 (434.2)	0.002	0.0 (0.0)	0.9 (0.7)	0.038
Leucine	168.5 (25.5)	594.6 (162.4)	0.001	0.2 (0.0)	0.5 (0.1)	0.001
Isoleucine	333.8 (13.1)	363.2 (22.2)	0.046	2.3 (0.2)	2.8 (0.2)	0.027
Glycine	67.6 (7.8)	83.4 (9.6)	0.027	0.5 (0.1)	1.5 (0.4)	0.003
Serine	30.5 (20.3)	64.7 (10.9)	0.008	0.2 (0.1)	0.5 (0.1)	0.026
Threonine	55.6 (17.2)	116.1 (15.1)	0.012	0.3 (0.0)	0.4 (0.1)	0.111
Aspartic acid	31.4 (5.9)	31.0 (7.5)	0.933	0.5 (0.0)	0.6 (0.1)	0.010
Methionine	363.3 (12.5)	424.8 (11.0)	0.011	3.3 (0.1)	4.7 (0.6)	0.045
Phenylalanine	6.5 (15.1)	53.0 (12.9)	0.001	2.1 (0.6)	3.6 (1.0)	0.025
Lysine	48.2 (22.5)	96.6 (16.5)	0.017	0.3 (0.0)	0.4 (0.0)	0.015
Organic acids	Sera ($\mu\text{mol/L}$)			Skeletal muscle ($\mu\text{mol/mg}$)		
	Milk -	Milk +	<i>p</i> -value	Milk -	Milk +	<i>p</i> -value
Oxalic acid	391.3 (44.5)	454.9 (65.6)	0.092	2.6 (0.2)	2.7 (0.3)	0.503
Malonic acid	23.7 (19.7)	21.2 (8.3)	0.749	0.2 (0.2)	0.2 (0.2)	0.956
Succinic acid	57.2 (7.4)	46.7 (8.2)	0.013	0.2 (0.0)	0.3 (0.1)	0.010
Citric acid	93.5 (4.3)	103.1 (6.2)	0.034	0.1 (0.0)	0.3 (0.1)	0.004

Short-chain fatty acids	Sera ($\mu\text{mol/L}$)			Feces ($\mu\text{mol/mg}$)		
	Milk -	Milk +	<i>p</i> -value	Milk -	Milk +	<i>p</i> -value
Acetic acid	279.0 (42.8)	307.2 (59.8)	0.369	5.6 (1.2)	8.2 (2.2)	0.029
Propanoic acid	4.8 (0.5)	213.6 (25.7)	< 0.001	14.2 (1.4)	18.9 (3.2)	0.009
Butanoic acid	65.4 (5.0)	109.6 (19.0)	0.037	14.6 (0.3)	41.2 (9.9)	< 0.001

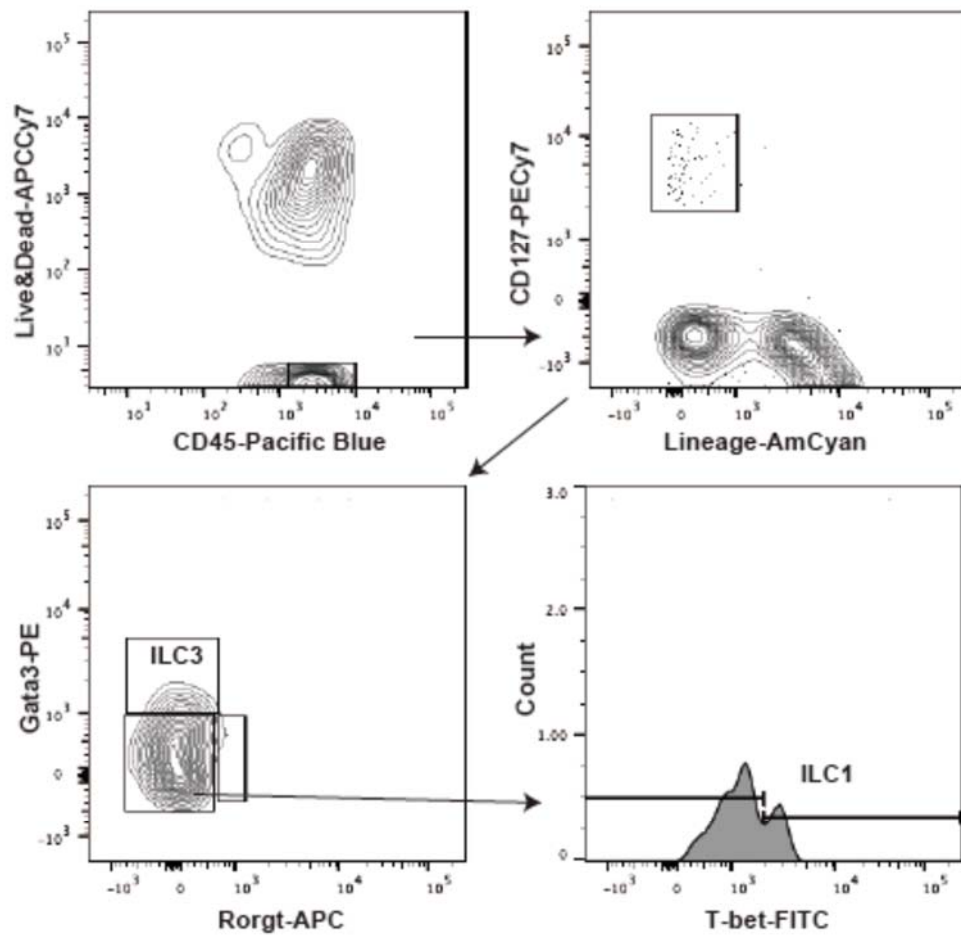
Data are expressed as mean (SD). Student's paired t-test were conducted between two groups.

Table 2. Amino acids and organic acids in sera and skeletal muscle, and short-chain fatty acids in sera and feces

Amino acids	Sera ($\mu\text{mol/L}$)			Skeletal muscle ($\mu\text{mol/mg}$)		
	FMT (Db)	FMT (M)	<i>p</i> -value	FMT (Db)	FMT (M)	<i>p</i> -value
Alanine	507.2 (412.2)	683.5 (594.9)	0.576	3.7 (0.8)	4.3 (0.3)	0.146
Valine	479.0 (20.0)	691.2 (143.5)	0.006	0.5 (0.0)	0.7 (0.2)	0.018
Leucine	336.9 (5.8)	482.3 (131.)	0.023	0.3 (0.0)	0.4 (0.1)	0.003
Isoleucine	210.4 (15.7)	301.7 (88.7)	0.034	0.2 (0.0)	0.3 (0.0)	<0.001
Glycine	89.9 (3.5)	170.1 (4.8)	< 0.001	1.9 (0.1)	2.3 (0.2)	0.001
Serine	51.7 (1.9)	91.8 (6.6)	< 0.001	0.3 (0.0)	0.4 (0.0)	0.138
Threonine	64.6 (7.7)	166.1 (0.6)	< 0.001	0.3 (0.0)	0.2 (0.0)	0.586
Aspartic acid	26.7 (8.2)	30.4 (13.2)	0.585	0.1 (0.0)	0.1 (0.0)	0.197
Methionine	237.1 (36.8)	480. (2.8)	0.001	7.2 (0.4)	8.5 (0.6)	0.008
Phenylalanine	81.3 (2.9)	146.4 (5.5)	< 0.001	1.7 (0.0)	2.0 (0.1)	< 0.001

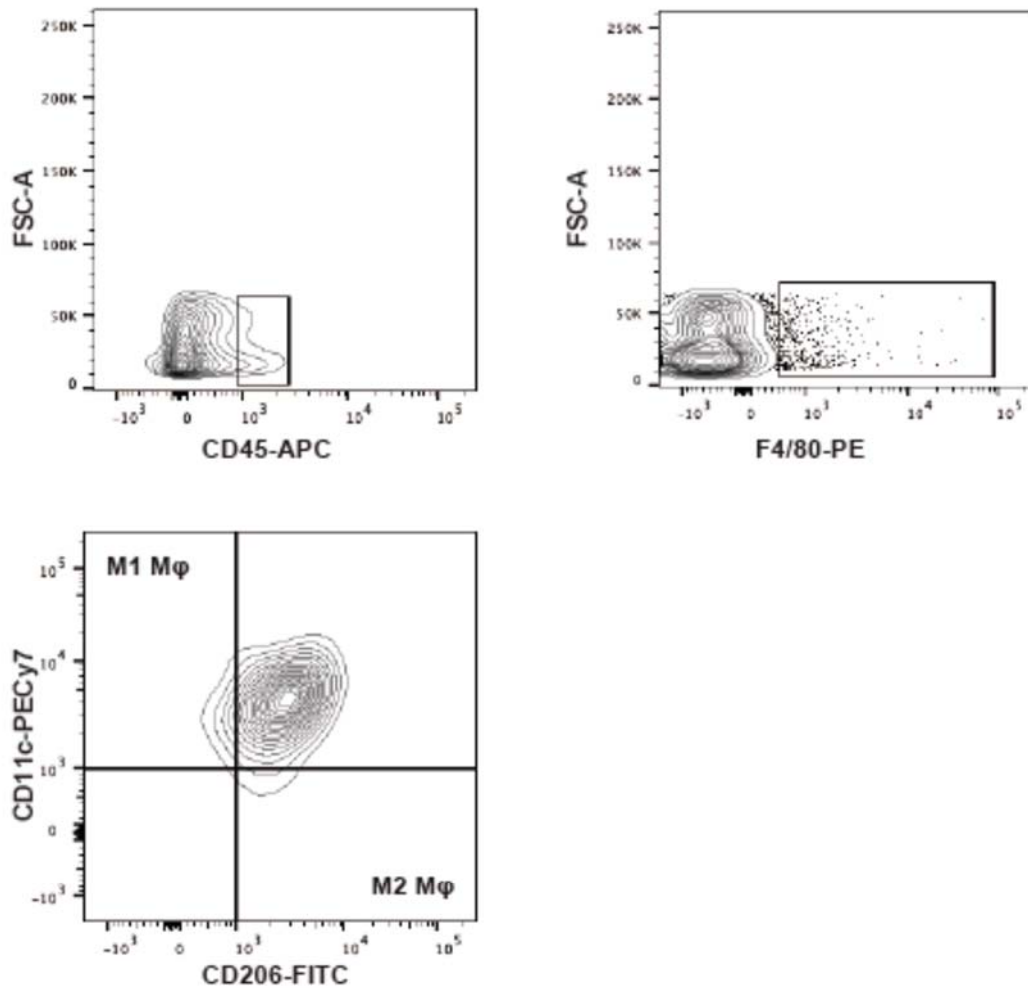
Lysine	53.3 (2.3)	237.8 (14.9)	< 0.001	1.9 (0.1)	3.3 (0.5)	0.001
Organic acids	Sera (µmol/L)			Skeletal muscle (µmol/mg)		
	Milk -	Milk +	<i>p</i>-value	Milk -	Milk +	<i>p</i>-value
Oxalic acid	11.2 (1.0)	12. (2.1)	0.423	0.1 (0.0)	0.1 (0.0)	0.410
Malonic acid	8.2 (1.1)	7.8 (1.1)	0.590	0.1 (0.0)	0.0 (0.0)	0.534
Succinic acid	8.6 (3.2)	10.1 (6.4)	0.622	0.2 (0.0)	0.3 (0.1)	0.042
Citric acid	148.9 (21.5)	164.4 (39.1)	0.426	0.1 (0.0)	0.2 (0.1)	0.005
Short-chain fatty acids	Sera (µmol/L)			Feces (µmol/mg)		
	FMT(Db)	FMT(M)	<i>p</i>-value	FMT(Db)	FMT(M)	<i>p</i>-value
Acetic acid	242.4 (26.7)	343.8 (43.9)	< 0.001	4.2 (1.5)	7.3 (0.9)	0.002
Propanoic acid	4.5 (0.2)	64.9 (3.2)	< 0.001	9.5 (1.7)	16.0 (6.2)	0.033
Butanoic acid	20.9 (1.0)	31.3 (1.6)	0.037	6.3 (1.0)	42.1 (22.4)	0.003

Data are expressed as mean (SD). Student's paired t-test were conducted between two groups.



Supplementary Figure 1. Strategy for innate lymphoid cells (ILCs)

Representative flow cytometry plots of liver CD45⁺ Live & Dead- Lin⁻ CD127⁺ RORg⁻ GATA-3⁻ T-bet⁺ ILC1s, CD45⁺ Live & Dead- Lin⁻ CD127⁺ RORg⁻ GATA-3⁺ ILC2s and CD45⁺ Live & Dead- Lin⁻ CD127⁺ RORg⁺ GATA-3⁻ ILC3s in each group at 16-weeks of age.



Supplementary Figure 2. Strategy for macrophages

Representative flow cytometry plots of liver CD45+ F4/80+ CD206- CD11c+ M1 macrophages and CD45+ F4/80+ CD206+ CD11c- M2 macrophages in each group at 16 weeks of age.