

論文の内容の要旨

論文題目： **Untargeted metabolomics analysis of lipid metabolic system in gut flora**
(腸内環境における脂質代謝系の包括的メタボローム解析)

氏 名： 安田 柊

【序】

腸内細菌は小腸や大腸など消化器官の内部に共生する細菌である。ヒトの体内には 1000 種類・100 兆個を超える腸内細菌が生息していると言われ、これらは食物の消化吸収を補うのみならず、病原体に対する感染防御や腸管免疫の形成など宿主の恒常性維持において重要な役割を担っている。一方、抗生物質の投与や食事の変化等により生じる腸内細菌叢の乱れは、腸疾患をはじめとする様々な疾患の発症や進行に関与する可能性が指摘されている。その作用機序の一つとして腸内細菌が生成する代謝物を介した機構が知られている。腸内細菌は宿主である哺乳類とは異なる代謝系を有しており、その代謝物の一部は宿主に対し生理活性を発揮することが報告されている。すなわち、腸内細菌の形成する独自の腸内代謝環境は生体の恒常性維持において重要であると考えられる。これまで腸内細菌の代謝物について、短鎖脂肪酸やアミノ酸など水溶性代謝物に着目した研究が行なわれてきた。一方、脂溶性代謝物については構造多様性や物性の違いによる抽出法や解析法など技術的要因から、未だ不明な点が多く残されている。

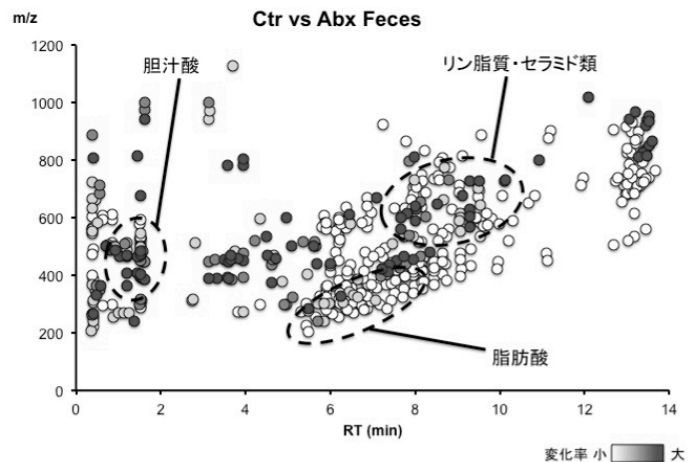
そこで私は、高速液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー(LC-MS/MS)を用いたノンターゲット解析により、既知分子のみならず想定外の構造も網羅する脂質メタボローム解析を実現し、腸内環境における脂質代謝系とその機能的役割の解明を試みた。

【方法と結果】

1. 腸内細菌依存的に産生される脂質代謝物の包括的メタボローム解析

一般的に腸内環境を反映する生体サンプルとして糞便が挙げられる。始めに、腸内細菌依存的に産生される代謝物を捉える目的で、Ampicillin・Vancomycin・Neomycin・Metronidazole の 4 種の抗生剤カクテル投与(Abx)マウスとコントロール(Ctr)マウスの糞便を採取し、LC-MS/MS を用いたノンターゲット解析によって糞便中の脂溶性代謝物を包括的に測定した。その結果、糞便から数百のピークが検出された(図 1)。同定されたピークには胆汁酸やリン脂質、セラミド類が含まれた。また抗生剤投与により、リノール酸や二次胆汁酸などの既知の腸内細菌由来の代謝物を含む多数のピークが顕著に変化した(図 1)。

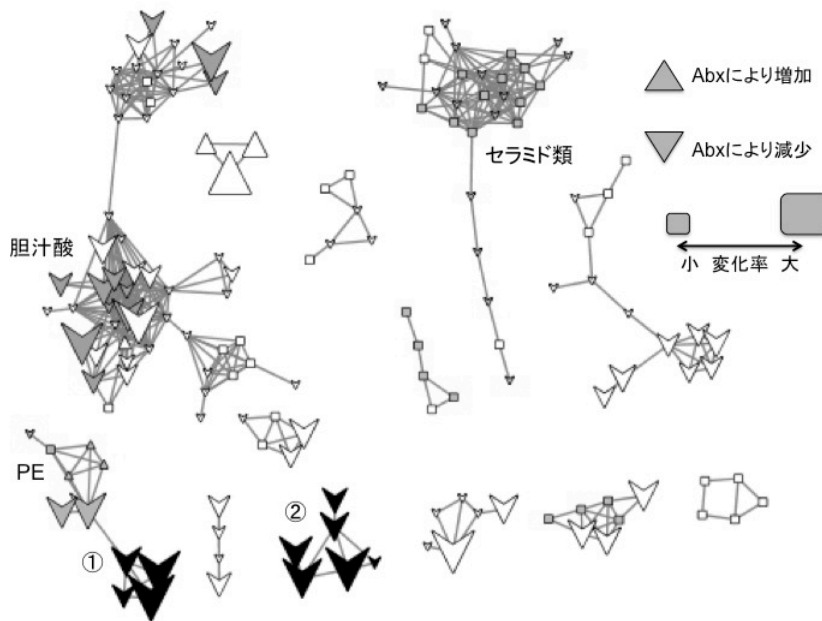
次に、Ctr マウスの糞便中に検出された全ピークの MS/MS フラグメント情報を用いて、その類似性によるクラスター解析を行なった。これにより検出された代謝物が構造の類似性によって分類されることが期待される。結果、確かに胆汁酸やホスファチジルエタノールアミン(PE)・セラミド類などの既知分子群がそれぞれクラスターを形成したことから、このクラスター解析の妥当性が確認された(図 2)。更に、抗生剤投与により群として大きな減少率が認められるクラスターを 2 つ見出した(図 2)。次に、それぞれの



【図 1】 マウス糞便の包括的メタボローム解析クロマトグラム

代謝物群の一つはアシルセラミド類と推定

された。しかしながら、もう一方の代謝物群は MS スペクトルデータベースに存在しない新規の代謝物群であることが示唆された。そこで私はこの腸内環境で産生される新規脂質代謝物群に着目し、その構造同定と生理活性の解明を目指した。



【図2】MS/MS フラグメント情報を用いたクラスター解析
 上矢頭が抗生剤投与により増加したピーク、下矢頭が減少したピークを示し、面積の大きさはその変化率を表す。

確かに既知分子がクラスターを形成する中、2つのクラスターが抗生剤投与によって大きく減少していた(①,②)。

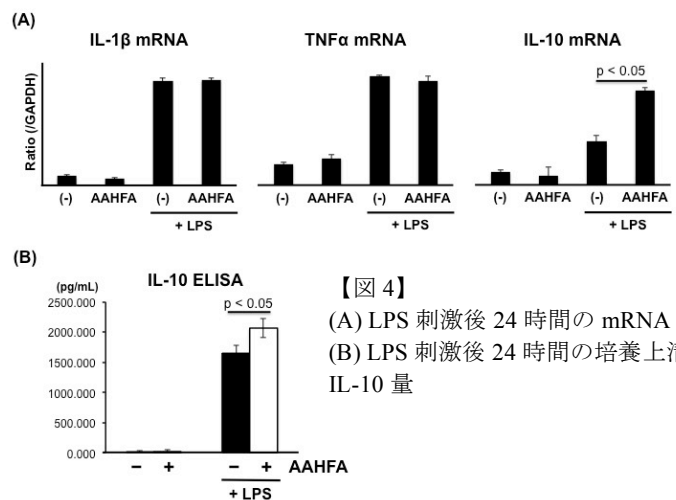
2. 腸内環境で産生される新規代謝物群 AAHFA の同定

MS/MS スペクトルの解析により今回見出された新規脂質代謝物群は共通した基礎骨格を持っており、これを以下 AAHFA と名付けた。次に、糞便中の主要な AAHFA の1つであった C4-AAHFA の標準化合物を化学合成した。合成した C4-AAHFA と糞便から抽出したサンプルのスパイク実験の結果、糞便中のピークと標準化合物の溶出時間と MS/MS フラグメントが一致し、これらの同一性が確認された。

3. 新規代謝物 AAHFA はマクロファージの LPS 刺激依存的な IL-10 産生を亢進する

次に、今回見出した新規代謝物 AAHFA の生理活性について、合成した C4-AAHFA を用いて検討を行った。

マウスマクロファージ系細胞である RAW 264.7 細胞を用い、LPS 刺激後 24 時間の mRNA 発現量を調べたところ、AAHFA 処理により IL-1 β や TNF α などの炎症性サイトカインの発現量に変化が見られず、一方で抗炎症性サイトカインである IL-10 の発現量が有意に亢進することを見出した(図 3A)。更に ELISA により培養上清中の IL-10 量を測定したところ、同様の結果が認められた(図 3B)。AAHFA 処理による IL-10 発現の亢進はマウス腹腔マクロファージの初代培養系においても同様に認められた。以上より、腸内環境で産生される新規代謝物 AAHFA はマクロファージの IL-10 産生を介して抗炎症作用を発揮する可能性が示唆された。

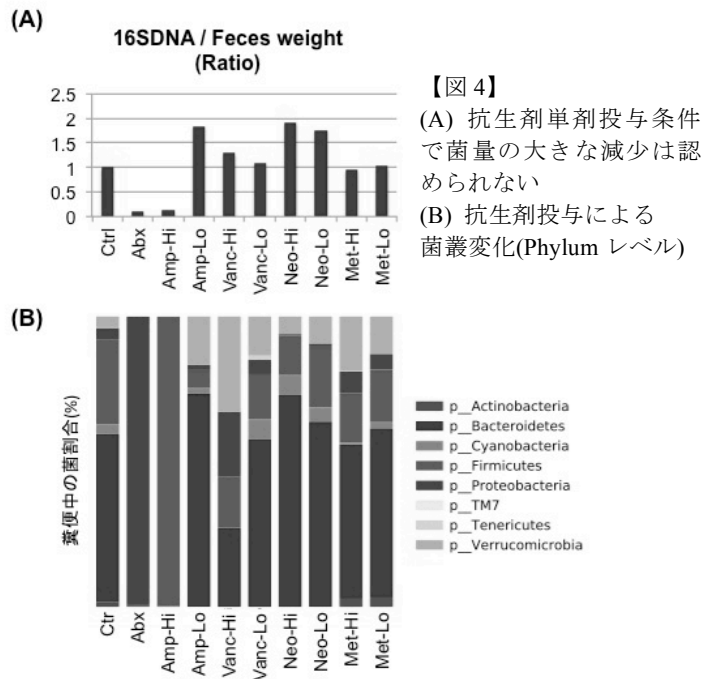


【図4】
 (A) LPS 刺激後 24 時間の mRNA 発現量
 (B) LPS 刺激後 24 時間の培養上清中の IL-10 量

4. 腸内細菌叢と代謝物の相関解析による AAHFA 産生菌探索

次に、AAHFA の産生に関わる腸内細菌叢について解析を行った。前述の 4 種の抗生剤をそれぞれ単剤で投与したマウスの糞便を用い、菌叢変化と代謝物量変化の相関解析を行った。糞便重量辺りの 16SrRNA 量によって菌数を評価し、Ampicillin 投与条件を除いて菌数の大きな減少が認められないことが確認された(図 4A)。続いて 16SrRNA 系統解析を行いマウス糞便中の菌叢組成を調べた結果、抗生剤ごとに異なる腸内細菌叢が構成されていることが確認された(図 4B)。一方で抗生剤単剤投与により AAHFA をはじめとする代謝物量の変動が認められ、腸内細菌叢の構成が変化することに相関して腸内の脂質代謝バランスが変化したことが示唆された。

そこで、腸内細菌叢の構成の変化と脂質代謝系の変化について相関解析を行った。リノール酸代謝物や二次胆汁酸など既知の細菌と代謝物との間に相関関係が認められる条件下で、AAHFA は Prevotellaceae 科の菌と強い正の相関が認められた(図 5)。



【図 4】
(A) 抗生剤単剤投与条件で菌量の大きな減少は認められない
(B) 抗生剤投与による菌叢変化(Phylum レベル)

AAHFAと菌の相関係数



【図 5】全 AAHFA と菌の相関係数。Prevotellaceae が AAHFA と強く正に相関した。

【まとめと考察】

本研究において私は、腸内細菌により制御される脂質代謝系の包括的なメタボローム解析を行い、その結果新規の代謝物群 AAHFA を見出した。糞便中の主要な AAHFA の 1 つである C4-AAHFA はマクロファージの LPS 刺激依存的な IL-10 産生を亢進する活性を持ち、抗炎症作用を発揮することが示唆された。また、Prevotellaceae 科の菌が AAHFA 産生菌の有力候補であることを見出した。

多種多様な腸内細菌の形成する複雑な代謝環境は宿主の恒常性維持に関与することが知られているが、今回見出された AAHFA がそのメカニズムの一端を担う可能性が考えられる。今後は AAHFA 産生に関わる酵素系を明らかにし、宿主の恒常性維持における本代謝系の意義を明らかにしたいと考えている。