

審査の結果の要旨

氏名 安田 柊

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、ヒトの体内には1000種類を超える腸内細菌が生息している。腸内細菌は食物の消化吸收を補うのみならず、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提唱されている。例えば、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、その代謝物の一部には宿主に対し生理活性を発揮することがあり、腸内細菌の形成する腸内代謝環境は宿主生体の恒常性維持において重要であると考えられている。以上のような背景から、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これまで行われてきたが、脂溶性代謝物については構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た。そこで安田は博士課程において、高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法により、既知分子のみならず想定外の分子も網羅する脂質メタボローム解析を行い、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。

まず、腸内細菌依存的に産生される代謝物を捉える目的で、4種の抗生剤カクテル投与マウスとコントロール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、糞便から数百のピークが検出した。同定されたピークには胆汁酸やリン脂質、セラミド類など既知物質も多く含まれていた。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することを確認した。

次に、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。その結果、胆汁酸・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。更に安田は、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。それぞれのクラスターに対しMS/MSスペクトル解析を行った結果、代謝物群の一つはアシルセラミド類と推定した。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。そこで安田は、この腸内環境で産生される新規脂質代謝物群に着目し、その構造決定と生理活性の解明を目指した。

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、安田はこれをAAHFAと名付けた。そこで、糞便中の主要なAAHFAの1つであったC4-AAHFA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とのスパイク実験の結果、糞便中のピークと合成化合物の溶出時間とMS/MSフラグメントが一致し、新規脂質代謝物のひとつがC4-AAHFAであることが確認できた。

次に、合成したC4-AAHFAを用いてAAHFAの生理活性について検討を行った。マウスマクロファージ系細胞であるRAW264.7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ない一方で、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。AAHFA処理によるIL-10発現の亢進は、マウス腹腔から採取した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。以上の結果から、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産生機能を促進して抗炎症機能を発揮する可能性を初めて見出した。

最後に安田は、AAHFAの産生にどのような腸内細菌が関わるかについて解析を行った。前述の4種の抗生剤の混合投与の代わりに、それぞれ単剤で投与したマウスの糞便を用いて、菌叢変化と代謝物量変化の相関解析を行った。その結果、AAHFAはPrevotellaceae科の菌と強い正の相関が認められた。

以上本研究において安田は、1) 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、新規の代謝物群AAHFAを見出した。2) 糞便中の主要なAAHFAの1つであるC4-AAHFAが、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を見出した。3) Prevotellaceae科の菌がAAHFA産生菌の有力候補であることを見出した。以上の成果は、腸内細菌環境の宿主に及ぼす影響を分子レベルで解明した新しい発見であり、よって本論文は博士(薬科学)の学位請求論文として合格と認められる。