

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20730

研究課題名(和文) ノンターゲットリポドミクスによる腸内細菌が産生する心不全抑制性代謝物の探索

研究課題名(英文) Untargeted Lipidomics for Heart Failure Inhibitory Metabolites Produced by Microbiome

研究代表者

安田 柊 (Yasuda, Shu)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：90824483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：心臓特異的GPx4欠損マウスに低ビタミン添加食を与える心不全モデルマウスにおいて、抗生剤を投与することで心不全を抑制できるが、この抑制効果には少量のビタミンEが必要であることが明らかとなった。また、餌に少量のビタミンEを含んだ心不全マウス(生存する)と餌に全くビタミンEを含んでいない心不全マウス(死亡する)の盲腸内容物・心臓・血漿のノンターゲットリポドミクスを行い、生存するマウスで多く存在するものを解析することで、この心不全を抑制する可能性のある候補代謝物を複数見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全は日本における主な死因の一つとして知られ、特にスポーツ選手などで見られる過度な運動時に急に生じる心不全は原因が明らかになっていない。脂質酸化依存的な細胞死はこの急性心不全に関与するとも言われ、本研究で用いた心臓特異的GPx4欠損マウスに低ビタミンE添加食を食べさせる心不全モデルは、心不全の分子メカニズムを明らかにできる可能性がある。今回見出した、腸内細菌や腸内細菌由来の心不全を抑制する可能性のある代謝物群は、心不全の予防薬となる可能性があり、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In a mouse model of heart failure in which heart-specific GPx4-deficient mice are fed a low vitamin E-added diet, it was found that antibiotics can suppress heart failure, but that a small amount of vitamin E is required for this suppression. We also performed untargeted lipidomics of the cecum contents, heart, and plasma of heart failure mice with a small amount of vitamin E in the diet (survived) and heart failure mice with no vitamin E in the diet (died), and analyzed the metabolites that were more abundant in the surviving mice, and found several candidate metabolites that may suppress this heart failure.

研究分野：脂質生化学

キーワード：GPx4 腸内細菌 リポドミクス 過酸化脂質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化管内に共生する多種多様な腸内細菌は、宿主の腸管のみならず脳や心臓、肝臓など全身の恒常性維持に寄与することが近年知られている。心不全には血管の梗塞による場合と、運動疲労時などでみられる心筋突然死が原因となるが、後者は原因不明で治療法がない。申請者が4月より赴任したラボでは、心筋内で生成する脂質酸化が心筋突然死の原因となることをはじめに明らかにしている。GPx4(リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ)は過酸化リン脂質を直接還元する酵素である。心臓特異的 GPx4 欠損マウスは胚致死となるが、脂質酸化を抑制するビタミン E を餌に添加することにより完全にレスキューされる。この成体の心臓特異的 GPx4KO マウスをビタミン E の少ない食事に変えると心臓に酸化脂質依存的細胞死が誘導され、約 15 日で心不全を起こす。申請者が4月より赴任した研究室では、この心不全モデルにおいて抗生剤のセフォペラゾン(CPZ)を飲水投与することで、脂質酸化依存的な心突然死が抑制されることを見出し、CPZ 投与で生き残った腸内細菌 Enterococcus 属が脂質酸化依存的な心不全を抑制することを発見したが、この菌がどのようにして脂質酸化依存的な細胞死による心筋突然死を抑制するのか明らかでなかった。

腸内細菌の宿主に作用するメカニズムの一つとして腸内細菌由来の代謝物が挙げられ、短鎖脂肪酸など一部の代謝物ではその生理活性が報告されている。腸内細菌は宿主である哺乳類とは異なる独自の代謝活性を持ち、宿主と相互作用することで複雑な代謝系を構築しているため、その代謝物はユニークな構造を持つ未知のものが多い。腸内細菌由来の代謝物の全容解明は生体の恒常性維持機構の理解のために重要であるが、それら代謝物は特に脂質において構造多様性に富んでいるため解析は困難であったものの、申請者は様々な物性を持つ脂質を幅広く捉えるノンターゲットリピドミクスと Feature-Based Molecular Networking(FBMN)という解析手法を組み合わせることで、未知の構造も含む数千種の腸内細菌由来の代謝物を包括的に捉える系を構築し、実際に既存のデータベースに存在していなかった腸内細菌由来の新規脂質群 AAHFA を見出してきた(iScience, Volume 23, Issue 12, 2020)。

2. 研究の目的

心臓特異的 GPx4 欠損マウスは、低ビタミン E 量添加食にすると心突然死が生じる一方で、CPZ を飲水投与することにより生存する。また、ビタミン E 欠乏食にすると CPZ を投与しても心突然死が生じる。そこで、以下の2点を研究目的とした。

(1)Enterococcus 属が産生する脂質酸化依存的な心筋細胞死に關与する代謝物の同定

脂質酸化依存的な心突然死を抑制する Enterococcus 属の菌が腸内でどのような代謝物を産生するのか明らかにする。

(2)腸内細菌叢変化による全身の代謝変動の解明および心突然死の抑制メカニズムの解明

CPZ 投与により増加する腸内細菌叢はどのような全身の代謝変動を生じさせ、心突然死を制御するのか、心不全の発症および抑制メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1)Enterococcus 属が産生する脂質酸化依存的な心筋細胞死に關与する代謝物の同定

心臓特異的 GPx4 欠損マウスは、低ビタミン E 量添加食にすると心突然死が生じる一方で、CPZ を飲水投与することにより生存する。また、ビタミン E 欠乏食にすると CPZ を投与しても心突然死が生じる。よって、これらのマウスの盲腸内容物から、申請者の樹立したノンターゲットリピドミクス解析系を用いて脂溶性代謝物を同定し、腸内環境に存在する心突然死の発症や抑制に關する代謝物群を明らかにする。

(2)腸内細菌叢変化による全身の代謝変動の解明および心突然死の抑制メカニズムの解明

本研究において CPZ 投与により増加する腸内細菌叢は以下のようなメカニズムで心突然死を抑制することが考えられる。ビタミン E の体内への取り込みを増加させる 心臓の脂質に対して単独でまたはビタミン E と協調して抗酸化作用を発揮する 酸化脂質の下流シグナルに作用し脂質酸化依存的な細胞死を抑制する。よって、申請者の樹立した測定・解析系を用いて、CPZ 投与時のマウスの血液や心臓のリピドミクス解析を行うことで全身の代謝変動を明らかにし、心不全の発症および抑制メカニズムを解明する。

4. 研究成果

(1)CPZ 投与マウスにおける腸内細菌叢由来の代謝物変化

はじめに、心臓特異的 GPx4 欠損マウスに低ビタミン E 添加食を与える心不全モデルマウスにおいて、CPZ 飲水投与時(生存)と通常水飲水投与時(死亡直前)の糞便を回収し、メタボローム解析を行なった。その結果、1000 を超えるイオンが検出されたものの、ほとんどの代謝物が CPZ 投与により減少しており、心不全の制御に關する代謝物候補の同定に至らなかった。

(2)CPZ 投与による心不全の抑制には少量のビタミン E が必要

心臓特異的 GPx4 欠損マウスに低ビタミン E 添加食を与えることによる心不全が CPZ 投与により抑制されるメカニズムを探索する中で、CPZ 投与による心不全抑制効果のビタミン E の濃度依存性を確かめた。その結果、完全にビタミン E を欠損させた餌で飼育した場合は CPZ 投与条件でも心不全を抑制することができず、CPZ 投与により心不全を抑制するためには餌に含まれるビタミン E が餌 100g 中に 0.3mg 以上必要であることが明らかとなった (図 1)。

(3)心臓特異的 GPx4 欠損マウスにおけるビタミン E 依存的な代謝物変化

(2)より CPZ 投与によって心臓特異的 GPx4 欠損マウスの心不全が抑制されるためには、少量のビタミン E が必要であることが明らかとなった。そこで、このマウスの低ビタミン E 含有食条件 (生存) とビタミン E 欠乏食条件 (死亡直前) の盲腸内容物の代謝物を比較することで、心不全を制御する代謝物の道程を目指した。メタボローム解析の結果、1406 ピークのイオンを検出し、その内低ビタミン E 含有食で 2 倍以上高かったピークが 255 ピーク、2 倍以上低かったピークが 102 ピーク存在した (図 2)。増加していたピークは脂質群として、リゾリン脂質であるホスファチジルコリン (PC) やホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS) のリゾ体 (LPC、LPE、LPS) や、モノアシルグリセロール (MG) やジアシルグリセロール (DG)、トリアシルグリセロール (TG) のような中性脂質が含まれ、これらの脂質がビタミン E 添加食により増加することが明らかとなった。また、腸内細菌と関連のある抱合型胆汁酸も増加していた。一方で、減少していたものとして、酸化脂肪酸やアシルセラミド (AcylCer) が含まれ、腸内細菌関連代謝物としては一次胆汁酸や二次胆汁酸、糖の付加したセラミド (GCer) が減少していた。以上の結果より、CPZ のみならずビタミン E によっても腸内細菌叢そのものまたはその代謝活性バランスが変化し、一部の代謝物が群として大きく変動することが明らかになった。

続いて、更なるメカニズム解明のため、同じ条件のマウスの心臓組織と血漿のメタボローム解析も行なった。その結果、心臓で 1100 ピーク、血漿で 555 ピークが検出され、それらの中には低ビタミン E 添加食により増加するものが存在していた (図 3)。全体としては心臓・血漿・盲腸内容物でそれぞれ異なった代謝変動を示した。その中で、LPC や LPE、LPS が共通して増加した代謝物に含まれていた。また、DG や TG といった中性脂質も心臓や血漿でそれぞれ増加していた。

以上の結果より、心臓特異的 GPx4 欠損マウスにおけるビタミン E 依存的な代謝物変化をノンターゲットリポミクスにより詳細に捉えることができた。中でも、心不全抑制を制御する候補分子として、LPC や LPE、LPS といったリゾリン脂質や胆汁酸や中性脂質などを見出した。一般にリゾリン脂質は、受容体を介し炎症反応を制御するなど生理活性が知られているが、脂質酸化依存的な細胞死に対する活性の報告はほとんどない。一方で、胆汁酸や中性脂質は腸管内でミセルを形成することで脂質の体内への吸収に関与することが知られている。これらのことから、CPZ 投与および少量のビタミン E によって変動する腸内細菌叢やその代謝活性が、リゾリン脂質や胆汁酸などの代謝を促進し、これらが直接細胞死を抑制したり、ビタミン E そのものの吸収を促進させる、という可能性が考えられ、今後は *in vitro* での実験や脂質投与実験によって検証していく必要がある。

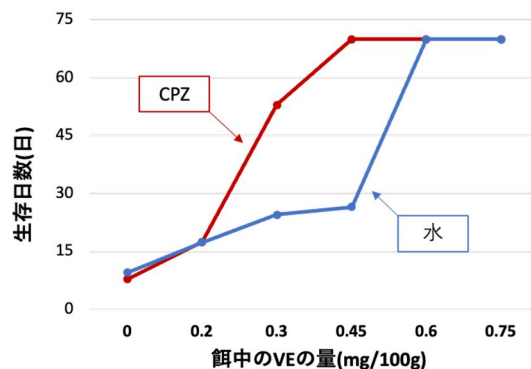


図 1 CPZ 投与による致死抑制効果のビタミン E の濃度依存性

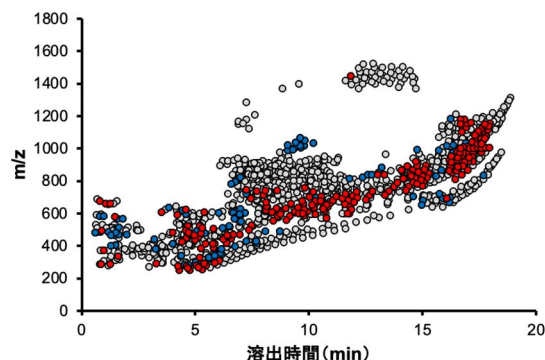


図 2 糞便のメタボローム解析結果 (赤: 低ビタミン E 食で増加 青: 減少)

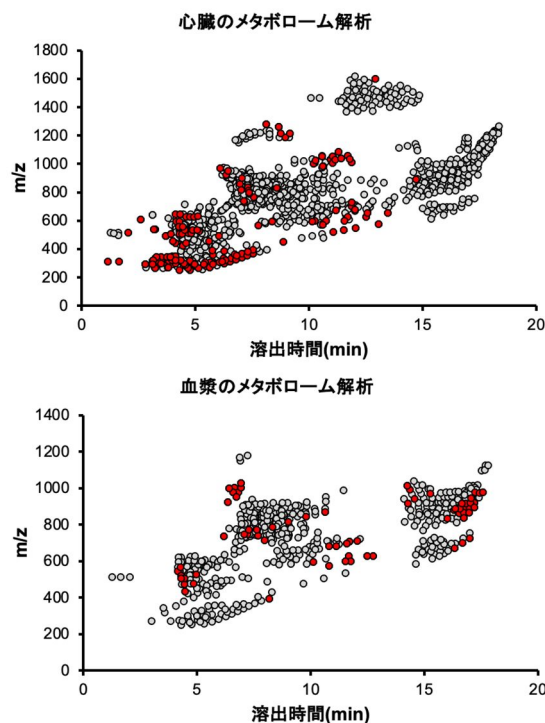


図 3 心臓 (上) と血漿 (下) のメタボローム解析結果 (赤: 低ビタミン E 食で増加)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤 光咲、幸村 知子、今井 浩孝
2. 発表標題 抗生剤セフォペラゾン耐性腸内細菌が脂質酸化依存的心不全突然死を抑制する
3. 学会等名 第34回バイオサイエンスフォーラム・第23回微生物アカデミー研究集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 莊原 直人、伊藤 光咲、工藤 春伸、幸村 知子、今井 浩孝
2. 発表標題 心臓特異的GPx4欠損マウスの心不全突然死抑制効果を示す抗生剤の同定
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幸村 知子、熊谷 直哉、伊藤 光咲、今井 浩孝
2. 発表標題 CPZ耐性腸内細菌がビタミンE低下による脂質酸化依存的心突然死を抑制する
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田 柊
2. 発表標題 ノンターゲットリピドミクスと16SrRNA解析による腸内細菌依存的な脂質代謝系の解明
3. 学会等名 レドックスR&D 戦略委員会 第1回若手シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幸村 知子、莊原 直人、伊藤 光咲、工藤 春伸、今井 浩孝
2. 発表標題 心臓特異的GPx4欠損マウスの心不全突然死抑制効果を示す抗生剤の探索
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幸村 知子、莊原 直人、今井 浩孝
2. 発表標題 心臓特異的GPx4欠損マウスの心不全突然死抑制効果を示す抗生剤の探索
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------