

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 26 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650486

研究課題名（和文）腸管内炎症マーカー探索

研究課題名（英文）Chemical analyses of microflora and feces in lifestyle-related disease animals for the identification of intestinal inflammatory biomarkers

## 研究代表者

三好 規之 (MIYOSHI NORIYUKI)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：70438191

研究成果の概要（和文）：肥満や糖尿病などのメタボリック症候群様症状を示す生活習慣病において、近年重要視されている慢性的な軽度の炎症レベルを評価できるバイオマーカーの探索・同定を目的とし、疾患モデル動物の盲腸・大腸内容物・糞便などに含まれる化合物の LC-MS 分析を行ったところ、疾患モデル群で有意に変動する複数の MS イオンピークが認められた。今後これらの成果を基にして、生活習慣病モデル動物の糞便、腸管内容物、腸管粘膜組織、血液を解析し発展型研究を展開していく。

研究成果の概要（英文）：Recent pioneering studies have revealed that intestinal flora was an important factor to determine the host phenotype associated with lifestyle-related diseases. Moreover low level but continuous inflammation derived from the alteration of intestinal flora appears to contribute to the pathogenesis of these serious diseases. Therefore, in this study, we performed chemical and statistical analysis of intestinal flora and feces to identify the inflammation biomarkers. We examined conditions for the breeding, sample preparations, MS analyses, multivariate analyses, and etc. Using optimum condition, harvested samples were subjected to UPLC-TOF-MS or GC-EI-MS. Several MS ion peaks were detected as a candidate for inflammation biomarker. Based on these results, further study is in progress to identify inflammation biomarker in intestinal tract.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活

## 1. 研究開始当初の背景

腸内細菌研究は 1919 年の Leeuwenhoek の腸内菌の発見に始まったとされているが、個人差が大きい、不変ではない、さらに多く（75%以上）の菌が培養困難・不可能であること等が理由で、これまで腸内細菌の全体像をつかむことが出来なかった。しかし無菌飼育装置や次世代シーケンサー等の技術の進歩に伴い、腸内細菌叢が様々な生体調節機能の中心的役割を担っていることが明らかになりつつあり、腸内細菌研究は今後 10 年

の最もホットな研究分野の一つとして注目されている。その中で、Gordon らによる肥満症やメタボリック症候群に関する最近の報告は興味深い。食欲調節ホルモン *leptin* 遺伝子に異常のある *ob/ob* マウスの腸内細菌叢は、有意に菌組成が野生型と異なっており、*ob/ob* マウスの腸内細菌叢を野生型 *germ-free* マウスへ移植すると宿主の *genotype* に依存しない肥満の表現型を示した。また別の報告によると、メタボリック症候群の症状を示す *toll* 様受容体 (TLR) 5 欠損マウスの腸内細菌叢の

移植も宿主の野生型 genotype に依存しないメタボリック症候群を引き起こし、抗生物質による殺菌の結果、肥満や過食の症状が抑制された。このようなメタボリック症候群の症状は腸内細菌叢の変化に起因していることが確認され、その腸内細菌叢の変化は食餌内容（高脂肪など）に依存していることが強く示唆されている。さらに腸内細菌叢の変化は、肥満やメタボリック症候群だけでなく現代の3大死因である、がん・心疾患・脳血管疾患、さらに痴呆など多くの病気と関係していることが指摘されている。その一つの理由として、これら疾患の共通リスク要因として炎症があり、腸内細菌叢の変化に伴う炎症が様々な疾患を惹起・進行・重症化させることが示唆されているからである。例えば、遺伝的要素や高脂肪食等によって変動する腸内細菌叢（グラム陰性菌）の細胞壁成分であるリポ多糖（LPS）がTLRを介した慢性的な低レベルの炎症を持続的に誘導し、インスリン抵抗性を引き起こすメカニズムが提唱されている。それゆえ、腸内容物の網羅的解析により慢性炎症疾患に関連する化合物の探索し、その中で起炎性物質が同定できれば、プロ・プレバイオティクスへの応用や栄養指導や食事療法における有望な疾病予防戦略となりえるだけでなく、多くの炎症関連疾患バイオマーカーとして非侵襲的な早期診断への利用が可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究では疾患モデル動物腸内容物のメタボロミクス解析を行い、統計学的手法により慢性炎症疾患特異的なバイオマーカー候補分子群を抽出する。さらにその候補分子群の中から起炎活性の評価を行い、腸管内炎症バイオマーカー分子を同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究で行った全ての動物実験は静岡県立大学における動物実験に関する指針に従い静岡県立大学倫理委員会の承認を得て行った。

まず高脂肪食負荷および糖尿病態による腸管内容物の変動を捉えることを目的として、5週齢雄性 KK- Ay/TaJcl マウス及び、対照群 C57BL/6J マウスを日本クレア社から納入し単独飼育した。飼育条件は、温度  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$  の空調、照明時間は7時から19時、消灯時間は19時から7時とした。1週間普通食（CE-2：日本クレア社）で予備飼育をおこなった後、体重によって高脂肪食群（Fat kcal 30% の高脂肪食 Quick Fat を自由摂取）と普通食群（標準飼料 CE-2 を自由摂取）に群分けし、24週間飼育した。給水は水道水とした。24週間飼育後の各マウスより盲腸を採取した。その一部（20 mg）にアセトニトリル（500  $\mu\text{l}$ ）を添加し懸濁後、一晚シェイカ

ーで攪拌し、遠心分離後上清をUPLC-TOF-MS解析に供した。分析条件は、UPLC（Acquity™, Waters）、TOF-MS（Micromass LCT Premier™ XE mass spectrometer, Waters）を用い、カラムはAcquity UPLC™ BEH C18 column（1.7  $\mu\text{m}$ , 100 mm $\times$ 2.1 mm i.d., Waters）、カラムオーブンは $40^\circ\text{C}$ 、移動相Aは0.1% 蟻酸を含む超純水、移動相Bは0.1% 蟻酸を含むアセトニトリルを用い、流速0.4 ml/minで0-3分（A:B=95:5%）、20-25分（A:B=10:90%）のリニアグラジェント方式で分離を行った。イオン源はESIのポジティブモード、検出器は以下の条件で行った（capillary voltage at 3000 V, sample cone voltage at 10 V, desolvation gas flow at 650 l/hr, cone gas flow at 50 l/hr, source temperature at  $120^\circ\text{C}$ , desolvation temperature at  $350^\circ\text{C}$ , mass range  $m/z$  100–2000）。またlock sprayによるMS軸補正にはレファレンスとしてleucine-enkephalin ( $m/z$  556.2771)を用いた。UPLC-TOF/MS分析によって得られたMSデータはMarkerLynxソフトウェア（Waters）によって以下の条件でピーク検出を行った（mass tolerance = 0.05 Da; apex track peak parameters: peak width at 5% height (seconds) = auto, peak-to-peak baseline noise = auto, apply smoothing = Yes; collection parameters: intensity threshold (counts) = 50, mass window = 0.05, retention time window = 0.1, noise elimination level = 4, deisotope data = Yes)。検出されたMSイオンピークは主成分解析（PCA）および判別分析（OPLS-DA）に供した。

さらに食生活の欧米化や、それに伴う炎症と強い関連がある大腸発がんを引き起こす化合物の探索を目的として、大腸発がんリスクの一つである飲酒の影響に注目し、飲酒マウスの糞便分析を行った。ここでは飲酒マウスの腸内細菌が生成する成分のうち炎症や発がん性が指摘されている $\alpha$ -ジカルボニル化合物の網羅的解析を行った。C57BL/6CrSlc マウス雄 10週齢を日本エスエルシー株式会社より納入した。飼育条件は、温度  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$  の空調、照明時間は7-19時、消灯時間は19-7時の条件下にて、3-4匹ずつゲージで飼育した。納入から1週間は予備飼育とし、給餌はマウス用標準合成試料（CE-2）を自由摂取させ、給水は水道水を与えた。納入2週目に、体重を測定しコントロール群とエタノール投与群で差のないよう3-4匹ずつに群分けした。その後の2週間、給水はコントロール群には純水を自由摂取させ、エタノール投与群には20%エタノールを自由摂取させた。24時間代謝ゲージにて採糞を行い、得られた糞試料は水抽出後 $\alpha$ -フェニレンジアミンを加え還流冷却下煮沸によりキノキサリン誘導体を得た。シリカゲルカラムにより粗精製したキノキサリン誘導体画分を遠

心エバポレーターで濃縮乾固し、酢酸エチルに溶解し (1 µg/µl) スプリトレス (1.0 µl) で GC-MS に注入した。GC 装置は 6850 (Agilent)、MS 装置は 5975 (Agilent) を使用した。キャリアガスは He (1.0 ml/min)、注入口温度は 158°C、カラムは HP-5MS (30 m × 0.25 mm id, 0.25 µm) を用い、初期温度 70°C で 4 分間保持し 10°C/min のグラジエントで 300°C まで上昇させた。イオン化は EI 法を用い、MS イオン源 230°C、MS 四重極 150°C で、スキャン範囲は 50-1050 で分析した。

#### 4. 研究成果

まず、世界中で罹患率、罹患者数が共に増加している糖尿病の腸管内起炎性分子の探索を行う目的で、糖尿病マウス KK-Ay とその対照マウス (C57BL/6) を高脂肪食あるいは普通食の自由摂取にて 24 週間飼育した。各マウス盲腸内容物のアセトニトリル抽出画分を UPLC-TOF/MS 分析に供し、得られた MS ピークの主成分分析 (PCA) を行った。その結果、食餌含有物 (高脂肪) の影響というよりはむしろ糖尿病の進行具合に依存した盲腸内容物の成分プロファイルである可能性が示唆された (図 1)。また判別分析 (OPLS-DA) より、糖尿病群特異的な化合物 (MS ピーク) の抽出にも成功した (図 2)。

さらに、食生活の欧米化や、それに伴う炎症と強い関連がある大腸発がんを引き起こす化合物の探索を目的として、大腸発がんリスクの一つである飲酒の影響に注目し、飲酒マウスの糞便分析を行った。ここでは飲酒マウスの腸内細菌が生成する成分のうち炎症や発がん性が指摘されている  $\alpha$ -ジカルボニル化合物の網羅的解析を行った。糞便抽出物中の  $\alpha$ -ジカルボニル化合物を *o*-フェニレンジアミンで誘導体化し、GC-EI/MS で分析したところ、特異的な開裂パターンを示す  $\alpha$ -ジカルボニル化合物を網羅的に検出することに成功した (図 3)。検出された  $\alpha$ -ジカルボニル化合物は有意ではないものの、飲酒に依存した量的変動が認められた。

このような疾患モデル動物を用いた解析のなかで、飼育方法 (単独飼育、飼料の標準化)、サンプル調製法 (抽出法、誘導体化法) の検討、分析機器 (分離・検出器) の検討、統計解析法 (PCA、OPLS-DA など) について検討を行った。

今後これらの成果を基にして、生活習慣病モデル動物の糞便、腸管内容物 (大腸・盲腸・小腸)、腸管粘膜組織、血液に分析対象を絞り、先行研究の発展型研究を展開していく。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

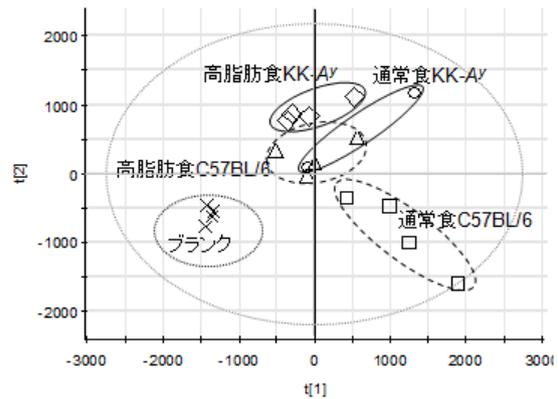


図 1 各マウス (n=2-4) 盲腸内容物アセトニトリル抽出画分の UPLC-TOF-MS 分析によって得られた MS イオンピークの PCA (主成分分析)。糖尿病病態の進行に依存した成分プロファイルである可能性を示唆している。

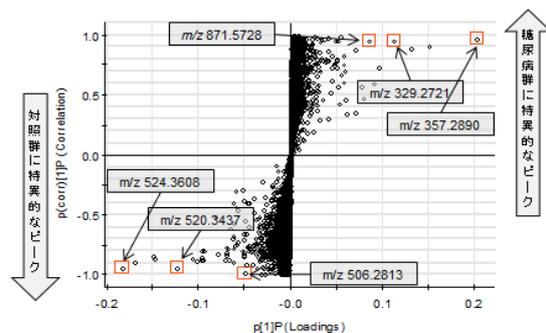


図 2 高脂肪食 KK-Ay および普通食 C57BL/6j マウス盲腸内容物抽出物の UPLC-TOF-MS 分析によって得られた MS イオンピークの OPLS-DA。

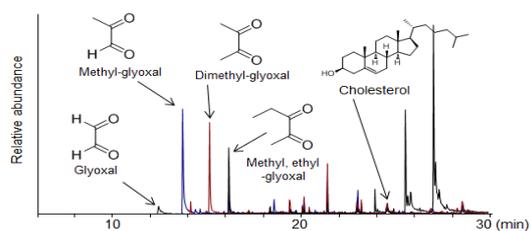


図 3 エタノール摂取マウス糞便中の  $\alpha$ -ジカルボニル化合物 (DCC) 分析。DCC は *o*-phenylen diamine 誘導体化し GC-EI-MS で検出した。さらに糞便試料からは cholesterol などのステロイド化合物も検出された。

〔雑誌論文〕(計6件)

Miyoshi N, Yonemochi T, Tomono S, Fukutomi R, Nakamura Y, Ohshima H. Development and application of a method for identification of isothiocyanate-targeted molecules in colon cancer cells. *Anal. Biochem.*, (2012) **429**, 124-31.

Mabuchi R, Kurita A, Miyoshi N, Yokoyama A, Furuta T, Goda T, Suwa Y, Kan T, Amagai T, Ohshima H. Analysis of N $\epsilon$ -ethyllysine in human plasma proteins by gas chromatography-negative ion chemical ionization/mass spectrometry as a biomarker for exposure to acetaldehyde and alcohol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, (2012) **36**, 1013-20.

Miyoshi N, Wakao Y, Tomono S, Tatemichi M, Yano T, Ohshima H. The enhancement of the oral bioavailability of  $\gamma$ -tocotrienol in mice by  $\gamma$ -cyclodextrin inclusion. *J. Nutr. Biochem.*, (2011) **22**, 1121-6.

Tomono S, Miyoshi N, Ito M, Higashi T, Ohshima H. A highly sensitive LC-ESI-MS/MS method for the quantification of cholesterol ozonolysis products secosterol-A and secosterol-B after derivatization with 2-hydrazino-1-methylpyridine. *J. Chromatogr. B*, (2011) **879**, 2802-8.

Miyoshi N, Nagasawa T, Mabuchi R, Yasui Y, Wakabayashi K, Tanaka T, Ohshima H. Chemoprevention of azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced mouse colon carcinogenesis by freeze-dried yam sanyaku and its constituent diosgenin. *Cancer Prev. Res.*, (2011) **4**, 924-34.

Tomono S, Miyoshi N, Shiokawa H, Iwabuchi T, Aratani Y, Higashi T, Nukaya H, Ohshima H. Formation of cholesterol ozonolysis products in vitro and in vivo through a myeloperoxidase-dependent pathway. *J. Lipid Res.*, (2011) **52**, 87-97.

〔学会発表〕(計8件)

糖尿病モデルマウス腎臓での糖化反応と血管拡張因子 NO の産生阻害、三好規之、大畑美幸、浅井奈津子、頼盈伶、金澤寛明、大島寛史、第11回日本 NO 学会学術集会、2011.5/13-14、東京

Development of a comprehensive analytical method for identification of isothiocyanates-binding proteins, N Miyoshi, T Yonemochi, Y Nakamura, H Ohshima, 2011 International conference on Food Factors, 2011.11/20-23, Taipei, Taiwan

がん予防食品因子イソチオシアネート結合タンパク質の探索、三好規之、米持巧、中村宜督、大島寛史、2012.3-22-26、京都

肥満モデルマウス KK-Ay における山薬およびジオスゲニンの大腸発がん予防分子機構解析、三好規之、長澤友樹、田中卓二、若林敬二、大島寛史、がん予防学会 2012、2012.6/22-23、岐阜

糖尿病モデルラット肝における DNA 付加体の網羅的解析、三好規之、松田知成、大島寛史、第71回日本癌学会、2012.9/19-21、札幌

がん予防食品因子イソチオシアネート結合タンパク質の網羅的探索法、三好規之、米持巧、伴野勲、中村宜督、大島寛史、第84回日本生化学会、2012.12/14-16、博多

ob/ob マウス糞便抽出物の分析によるメタボリック症候群新規診断バイオマーカーの探索、眞田峻佑、蛭川頌子、大島寛史、三好規之、日本農芸化学会 2013、2013.3/24-27、仙台

飲酒によって変動するマウス糞便中化合物の探索、蛭川頌子、眞田峻佑、大島寛史、三好規之、日本農芸化学会 2013、2013.3/24-27、仙台

〔その他〕

ホームページ等

<http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/cellbioc/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三好 規之 (MIYOSHI NORIYUKI)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：70438191