

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24680075

研究課題名(和文) 腸管内自然炎症を制御するメタボリック症候群新規診断法開発の探索的基盤研究

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of pro-inflammatory metabolites in feces for the development of diagnostic biomarkers of metabolic syndrome

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、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起炎症性分子の探索・同定・機能解析を行った。特に、腸内細菌叢と生体との相互作用がメタボリック症候群の表現型を決定する大きな因子であることが明らかになりつつあるので、糞便中に含まれる化合物の分析を行い、既存のバイオマーカーよりも早期に且つ正確に、また非侵襲的に評価できる新規診断法開発を目的とした。各モデルマウス糞便試料分析より、疾患群糞便で変動する化合物としてヘム関連化合物を複数同定し、生活習慣病の表現型に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is strongly suggested that intestinal microflora is playing pivotal roles in metabolic homeostasis. However some factors, stress, aging, and dietary pattern, possibly influence the intestinal microflora, in which deteriorated composition possibly triggers the low-grade chronic inflammation associated with several lifestyle-related diseases including obesity and diabetic mellitus. In this study, we explored pro-inflammatory molecules in feces from metabolic syndrome model animals. We identified precursor or metabolites of heme were prominently increased in feces of disease group animals including ob/ob, KK-Ay, high-fat fed C57BL/6J mice, and also found that oral administration of the heme metabolites for 8weeks in normal C57BL/6J mice impaired the glucose metabolism. These results suggest that pro-inflammatory metabolites formed in small intestine could be affect to the metabolism of dietary nutrition in host.

研究分野：食品機能学

キーワード：生活習慣病 炎症

1. 研究開始当初の背景

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る。例えば、肥満マウス (*ob/ob*) の腸内細菌叢の菌組成は、有意に野生型と異なっており (メタゲノム解析)、その細菌叢を 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す。また、内臓脂肪の蓄積、インスリン抵抗性、高血圧等の症状を示す toll 様受容体 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、肥満や過食の症状までもが抑制される。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ており、その腸内細菌叢の変化は食餌内容 (高脂肪) や過食と相互に影響しあうことが示唆されている。一方でヒトにおける腸内細菌叢の増悪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低レベルの持続的な炎症 (自然炎症) 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。しかし現実には、汎用されている炎症マーカーのうち酸化修飾核酸・タンパク質・脂質などは、炎症産物であるため生体内における生成 (蓄積) と消去のバランスが低レベルの炎症を正確に反映できずリスク評価を困難にしている。また、血中や組織中の炎症性サイトカイン定量解析は低レベルの炎症状態を反映するため動物実験などで用いられているが、ヒトへの応用を考えると侵襲的な操作が必要であり、コスト的にも決して簡便な検査・診断法とはいえない。それゆえ腸管内の起炎性分子が同定されれば、それ自身が炎症の原因であるために、その後引き起こされる炎症応答を早期に判定できる可能性がある。さらに腸管免疫を介した

シグナルは全身に影響を及ぼすため、多くの慢性疾患のリスク評価をする優れたバイオマーカーになりえる。また、コレステロールや尿酸の結晶化物が炎症の引き金となることや、ピフィズ菌の糖代謝産物として産生された酢酸が腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染死予防に効果を示す可能性が示唆されているため、腸管内に存在する普遍的な化合物の量的変動を捉えることにより、生体内で多量に存在する良く知られた化合物の新たな側面 (活性) が解明される可能性がある。また、生体内には依然リガンドが不明な TLR も存在しているため、新規の腸管免疫作動メカニズムを解明できる可能性もある。さらに、多くの動物実験で本当に低濃度で炎症性疾患に効果を示す機能性食品因子の機能性発現メカニズムとして、食品因子と生体成分とのダイレクトな相互作用ではなく、腸管内自然炎症の制御を介した新規の活性発現分子機構を解明できる可能性もある。さらに、腸内細菌叢は食事に大きく影響を受ける特性を利用すると、腸内炎症バイオマーカーを指標とした栄養指導による介入試験へ発展させることができる。それゆえ、医療従事者などによる採血を必要としない簡便な炎症評価法を確立することにより、慢性炎症疾患を基盤とする様々な疾病予防に世界レベルで貢献することが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、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起炎性分子の探索・同定・機能解析を行う。特に、腸内細菌叢と生体との相互作用がメタボリック症候群の表現型を決定する大きな因子であることが明らかになりつつあるので、糞便中に含まれる化合物の分析を行い、血中の炎症性サイトカイン等のバイオマーカーよりも早期に且つ正確に、また非侵襲的に評価できるメタボリック症候群の新規診断法開発を目的とした起炎性分子の探索的基盤研究を行い、腸

管内自然炎症の制御を目指す。

3. 研究の方法

動物実験 1 では、肥満モデル (*ob/ob*) と対照 (C57BL/6J) マウスを AIN76 標準食および水道水を自由摂取で 24 週間飼育した。動物実験 2 では、C57BL/6J マウスを飲酒群と対照群の 2 群に分け、対照群には水道水を与え、飲酒群には 20% エタノール水を自由摂取で与え、AIN76 標準食で 26 週間飼育した。動物実験 3 では、生活習慣病モデルマウス (*KK-A^y*) と対照の C57BL/6J マウスを普通脂肪食 (NFD) あるいは高脂肪食 (HFD) の計 4 群で 20 週間飼育した。動物実験 4 では、C57BL/6J に化合物 3 を水道水に 0, 1, 10, 100 ppm で溶解し、自由摂取で 10 週間投与した。いずれの動物実験において経時的に体重、摂餌量の測定、採糞、採血を行い以降の分析に用いた。飼育期間中に経時的にサンプリングした糞便試料は、Bligh&Dyer 法により、水溶性画分と脂溶性画分に調製した。調製した各試料については、UPLC-Q-TOF/MS を用いた成分分析と NF- κ B reporter assay を用いた起炎症性試験に供した。UPLC-TOF-MS 分析で検出された MS イオンピークについては市販のアプリケーションで解析し、病態および飼育条件に依存して変化する化合物の探索を行った。特徴的な MS イオンピークについては、MSMS 解析及び標準品との比較により、化合物を同定した。

4. 研究成果

動物実験 1 において、飼育 10 週目および 20 週目の C57BL/6J および *ob/ob* マウス糞便の可溶性画分を NF- κ B reporter plasmid を導入したマウスマクロファージ様 RAW264 細胞へ曝露し、NF- κ B の活性化を評価したところ、C57BL/6J マウス群に比べて *ob/ob* マウス糞便の水溶性画分曝露によって有意に強く NF- κ B 経路の活性化を示した。一方、C57BL/6J および *ob/ob* マウス糞便の脂溶性画分は、活性化を示さなかった。

C57BL/6J および *ob/ob* マウス糞便の水溶性画分を逆相 HPLC で分画し、NF- κ B reporter assay に供したところ、保持時間 8 – 11 分の画分が強い NF- κ B の活性化応答を示した。この画分を UPLC-Q-TOF/MS を用いて分析したところ、C57BL/6J マウス群に比べて *ob/ob* マウス群で有意に増加する MS イオンピークが検出され、MS/MS 解析および標品との比較により、この化合物をヘムの代謝物である化合物 1 と同定した。いずれの週齢 (6, 10, 14, 18, 22 週齢) においても *ob/ob* マウス糞便中の化合物 1 は C57BL/6J 群に比べて高値を示し、化合物 1 の標品を用いた起炎症性試験より、濃度依存的な NF- κ B の活性化も認められた。

動物実験 2 においても同様に、飼育期間中に経時的に採取した糞便の可溶性画分を UPLC-TOF-MS に供したところ、アルコール摂取群で高値を示す MS イオンピークが一つ抽出され、MS/MS 解析および標品との比較により、これをヘム生合成前駆体である化合物 2 を同定した。

一方、生活習慣病モデルマウス (*KK-A^y*) と対照の C57BL/6J マウスを普通脂肪食 (NFD) あるいは高脂肪食 (HFD) の自由摂取で 20 週間飼育した。特餌開始 8 週間の空腹時血糖値に群間差が認められたので、本研究では 9 週目の糞便試料を分析に用いた。糞便試料から Bligh&Dyer 法により H₂O/MeOH 可溶性画分を調製し、UPLC-TOF-MS を用いた糞便中化合物の一斉分析を行った。得られた糞便化合物プロファイルデータの統計解析より宿主の生理病理的表現形の変化に相関する化合物を探索したところ、食事 (HFD) および宿主の遺伝型 (*A^y*) に依存して増加する化合物の一つとしてヘムの代謝物である化合物 3 を同定した。

ここまでの解析で、生活習慣病の表現型に関連して変化する糞便中化合物として、ヘム関連化合物が複数同定されてきたので、その中でも高脂肪食摂取によって増加する化合物 3 が生活習慣病の表現型へ及ぼす影響を検討する目

的で、化合物 3 標準品を 5 週齢オス C57BL/6J マウスに 10 週間飲水投与(0, 1, 10, 100 ppm) した。その結果、試験期間中に有意な体重の群間変動は認められなかったが、化合物 3 (10 ppm) 摂取群において血中の化合物 3 濃度の上昇に伴う食後高血糖、血中 TG 高値、肝組織中炎症性サイトカインの増加、膵臓の肥大、大腸炎の兆候が認められた。

これらのことから、生体との相互作用によって変動する糞便中化合物としてヘム関連化合物を複数同定し、その中でも化合物 3 が、食事成分の代謝異常に関連する生活習慣病の表現型に影響を及ぼす可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 21 件)

Miyoshi N. Chemical alterations and regulations of biomolecules in lifestyle-related diseases. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2016) **80**, 1046-53.

Miyoshi N., Iuliano L, Tomono S, Ohshima H. Implications of cholesterol autoxidation products in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2014) **446**, 702-8.

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.

[学会発表] (計 60 件)

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

ob/ob マウス糞便に含まれる起炎症性分子の探索、眞田峻佑、大島寛史、三好規之、日本農芸化学会 2014、2014.3/27-30、東京

Lipopolysaccharide 構成分子 lipid A の LC-MS 分析、大石美月、大島寛史、三好規之、第 86 回日本生化学会、2014.10/15-18、東京

グラム陰性菌リポ多糖構成分子 lipid A の LC-MS 分析法の確立、大石美月、吉川悠子、大島寛史、三好規之、日本農芸化学会 2015、2015.3/26-29、岡山

[図書] (計 6 件)

Suzuki T, Miyoshi N., Hayakawa S, Imai S, Isemura M, Nakamura Y. Health benefits of tea consumption. In: Ted Wilson T, Temple NJ, editors. Beverage Impacts on Health and Nutrition. 2nd ed. Chan, Switzerland: Springer International Publishing AG. In press 2015.

Miyoshi N. Anti-diabetic effects of green tea. Scientific evidence for the health benefits of green tea. Japan Tea Central Public Interest Incorporated Association. P118-125, 2015.

[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