

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461022

研究課題名(和文) 新しい腸内細菌叢マーカーとしての末梢血胆汁酸誘導体分析と消化器疾患診療への応用

研究課題名(英文) Application of serum bile acid profile as a new marker for gut microbiota

研究代表者

本多 彰 (Honda, Akira)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：10468639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓で生合成された一次胆汁酸は、ヒトの腸内細菌によって二次胆汁酸へと代謝される。従って、個人の便中および血中の胆汁酸組成を調べると、その人の腸内細菌叢がわかるのではないかと考えた。我々は、健常者および各種消化器疾患患者の便と血清を収集し、便中の腸内細菌組成を末端標識制限酵素断片多型分析(T-RFLP)法にて、また便および血清の胆汁酸分画分析を高速液体クロマトグラフィー・タンデムマスマスペクトロメトリー(HPLC-MS/MS)法にて分析した。その結果、便中、さらには血中胆汁酸のうち、ある種の腸内細菌クラスターの比率を反映するものが見出され、臨床的に有用なバイオマーカーになることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Primary bile acids biosynthesized in the liver are metabolized to secondary bile acids by specific microbes in human intestine. We hypothesized that the individual bile acid profile in feces, and possibly in serum, could be a convenient biomarker for the gut microbiota. The fecal microbiota profile in patients with gastrointestinal diseases and healthy controls were determined by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis. Bile acid compositions in serum and feces from the same subjects were also quantified by HPLC-MS/MS. Our results showed that the fecal proportions of some bacterial clusters were significantly and positively correlated with not only fecal but also serum proportions of specific bile acids. Therefore, the serum bile acid profile could be a convenient surrogate marker for the intestinal proportion of a certain bacterial cluster.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胆汁酸 LC-MS/MS 腸内細菌叢 消化器疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトの腸管内には 100 兆個、100 種類以上の細菌が生存している。それらは複雑な共同体(腸内細菌叢)を形成し、病原菌の増殖阻害、ビタミンの産生、免疫系の活性化、発癌物質の産生など様々なことを行っている。腸内細菌叢には個人差があり、食生活習慣や投与薬物によって影響を受ける。一方、腸内細菌叢の変化は腸内の代謝や免疫機能に影響を与え、NASH、肝癌、炎症性腸疾患などの発症に関与している可能性が示唆されている。

(2) 従来、腸内細菌叢の解析は培養法によって行われたが、70~80%が培養困難な嫌気性菌であることが明らかになった。従って現在は、便中細菌の 16S リボソーム RNA 遺伝子解析が行われることが多い。しかし、便の均一化、煩雑性やコストの面から臨床現場で容易に利用できる状況ではない。

(3) そこで腸内細菌自体の解析ではなく、腸内細菌によって特徴的な代謝を受ける胆汁酸の分画分析が、腸内細菌叢の有用なバイオマーカーにならないかと考えた。

2. 研究の目的

HPLC-MS/MS を用いて、通常の 15 種類の一次胆汁酸と二次胆汁酸に加えて、それらを基質にして腸内細菌が生成するケト体、エピ体なども含めた、胆汁酸の高感度一斉分析法を確立することを目的とした。さらに、健常者および消化器疾患患者の便中腸内細菌分画、便中胆汁酸分画、血中胆汁酸分画を測定し、血清胆汁酸分画が腸内細菌叢のマーカーになり得るか検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胆汁酸標準品の準備

コール酸 (CA), グリココール酸 (GCA), タウロコール酸 (TCA), ケノデオキシコール酸 (CDCA), グリコケノデオキシコール酸 (GCDCA), タウロケノデオキシコール酸 (TCDC), デオキシコール酸 (DCA), グリコデオキシコール酸 (GDCA), タウロデオキシコール酸 (TDCA), リトコール酸 (LCA), グリコリトコール酸 (GLCA), タウロリトコール酸 (TLCA), ウルソデオキシコール酸 (UDCA), グリコウルソデオキシコール酸 (GUDCA), 3-デヒドロコール酸 (3-dehydro-CA), 7-デヒドロコール酸 (7-dehydro-CA), 12-デヒドロコール酸 (12-dehydro-CA), 3-デヒドロケノデオキシコール酸 (3-dehydro-CDCA), 7-デヒドロケノデオキシコール酸 (7-dehydro-CDCA), 3-デヒドロデオキシコール酸 (3-dehydro-DCA), 12-デヒドロデオキシコール酸 (12-dehydro-DCA), 3-デヒドロリトコール酸 (3-dehydro-LCA), 3-エピデオキシコール酸 (3-epi-DCA), 3-エピリトコール酸 (3-epi-LCA), 5 -cholanic acid-3,7-dione は, Steraloids (Newport, RI, USA) から購入した。[2,2,4,4-²H₄]CA, [2,2,4,4-²H₄]DCA

および[2,2,4,4-²H₄]LCA は, C/D/N Isotopes (Pointe-Claire, Canada) から, [2,2,4,4-²H₄]TCA は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。TUDCA, [11,11,12,12-²H₄]UDCA および[11,11,12,12-²H₄]TUDCA は, 東京田辺株式会社から, [11,11,12,12-²H₄]CDCA は日本化薬株式会社から, それぞれ過去に供与されたものを使用した。

3-epi-CA, 3-epi-CDCA, 7-epi-CA, 12-epi-CA, 12-epi-DCA は, sodium borohydride を用いて, それぞれ 3-dehydro-CA, 3-dehydro-CDCA, 7-dehydro-CA, 12-dehydro-CA, 12-dehydro-DCA を還元することによって合成した。また, 3-epi-UDCA は, 5 -cholanic acid-3,7-dione を還元することによって合成した。一方, 3-dehydro-UDCA は, UDCA の 3 位にある水酸基を 3 -hydroxysteroid dehydrogenase によって酸化することにより合成した。

(2) HPLC-MS/MS による胆汁酸一斉分析方法の検討

血清 (20 μl) または糞便 (約 1 mg) に内部標準として [2²H₄]CA, [2²H₄]CDCA, [2²H₄]DCA, [2²H₄]LCA, [2²H₄]UDCA, [2²H₄]TUDCA, [2²H₃]TCA を添加した。糞便サンプルは 100 μl の 5% 水酸化カリウム水溶液中で 80 °C, 20 分間加水分解を行った後, また血清サンプルには直接, 2 ml の 0.5 M リン酸カリウムバッファー (pH 7.4) を添加し, Bond Elut C18 カートリッジ (200 mg, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) に通して胆汁酸を吸着させた。カートリッジを 1.6 ml の蒸留水で洗浄後, 3 ml のエタノール/水 (9:1, v/v) で胆汁酸を回収した。蒸発乾固後に 20 mM 酢酸アンモニウムバッファー (pH 7.5) /メタノール (1:1, v/v) に再溶解し, その一部を HPLC-MS/MS に導入して分析した。HPLC カラムは Hypersil GOLD column (150 x 2.1 mm, 3 μm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用し, 移動相は Ando らの方法に従った (J Pharm Biomed Anal. 2006, 40:1179-1186)。MS/MS は negative ESI モードで行い, SRM によるモニタリングイオンは, 4. 研究結果の表 1 に記載した。

(3) 腸内細菌叢の分析

腸内細菌叢の分析はテクノスルガラボ (静岡) に委託して行った。糞便から DNA を抽出し, 16S rRNA 遺伝子の 5' 末端を 6'-carboxyfluorescein で標識しつつ PCR で増幅し, 制限酵素で切断後, terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法で分析した (Nagashima K et al. Appl Environ Microbiol 69: 1251-1262, 2003)。得られた結果を細菌クラスターごとに分類し, 便中の細菌群組成を比率で表した。

4. 研究成果

(1) HPLC-MS/MS による胆汁酸一斉分析方法の確立

表1に、通常の15種類の一次胆汁酸と二次胆汁酸に加えて、それらを基質にして腸内細菌が生成するケト体、エピ体、および内部標準に関する分析の基礎データを示す。今回の研究により、ヒトの血中および便中から、合計32種類の胆汁酸を抽出し、1時間以内に一斉分析することが可能になった。本分析の問題点としては、3-epi-CDCAと3-epi-DCAの分離が不良のことである。従って、今回の研究では、3-epi-CDCAと3-epi-DCAは3-epi-CDCA+3-epi-DCAとして計算した。

表1. 胆汁酸のHPLC-negative ESI-SRMデータ

ID	Bile acids	SRM Condition		HPLC Data (RRT ^a)
		Precursor to Product (m/z)	Collision Energy (V)	
1	CA	407 → 407	20	1.00
2	GCA	464 → 74	35	0.93
3	TCA	514 → 80	70	0.95
4	CDCA	391 → 391	20	1.26
5	GCDCA	448 → 74	35	1.14
6	TCDC	498 → 80	70	1.16
7	DCA	391 → 391	20	1.30
8	GDCA	448 → 74	35	1.19
9	TDCA	498 → 80	70	1.21
10	LCA	375 → 375	20	1.57
11	GLCA	432 → 74	35	1.39
12	TLCA	482 → 80	70	1.39
13	UDCA	391 → 391	20	0.92
14	GUDCA	448 → 74	35	0.83
15	TUDCA	498 → 80	70	0.85
16	3-dehydro-CA	405 → 405	20	0.89
17	7-dehydro-CA	405 → 405	20	0.74
18	12-dehydro-CA	405 → 405	20	0.76
19	3-dehydro-CDCA	389 → 389	20	1.18
20	7-dehydro-CDCA	389 → 389	20	1.01
21	3-dehydro-DCA	389 → 389	20	1.20
22	12-dehydro-DCA	389 → 389	20	1.04
23	3-dehydro-LCA	373 → 373	20	1.55
24	3-dehydro-UDCA	389 → 389	20	0.91
25	3-epi-CA	407 → 407	20	0.70
26	7-epi-CA	407 → 407	20	0.60
27	12-epi-CA	407 → 407	20	0.55
28	3-epi-CDCA	391 → 391	20	1.00
29	3-epi-DCA	391 → 391	20	1.00
30	12-epi-DCA	391 → 391	20	0.99
31	3-epi-LCA	375 → 375	20	1.49
32	3-epi-UDCA	391 → 391	20	0.81
Internal standards				
A	[2,2,4,4- ² H ₄]CA	411 → 411	20	1.00
B	[11,11,12,12- ² H ₄]CDCA	395 → 395	20	1.26
C	[2,2,4,4- ² H ₄]DCA	395 → 395	20	1.30
D	[2,2,4,4- ² H ₄]LCA	379 → 379	20	1.57
E	[11,11,12,12- ² H ₄]UDCA	395 → 395	20	0.92
F	[2,2,4,4- ² H ₄]TCA	518 → 80	70	0.95
G	[11,11,12,12- ² H ₄]TUDCA	502 → 80	70	0.85

^aRRT: relative retention time (コール酸の retention time を 1.00 とした時の相対値)

(2) 腸内細菌叢と便中・血中胆汁酸マーカーとの関係

糞便中腸内細菌分画と糞便中胆汁酸分画との関係をみると、糞便中のいずれかの胆汁酸マーカーと有意な正の相関を示した細菌は、Bacteroides, Prevotella, Clostridium cluster IV, Clostridium subcluster XIVa の4種類であった。そのうち、血中胆汁酸マーカーでも糞便中胆汁酸マーカーと同様に相関を認められたのは、Prevotella, Clostridium cluster IV, Clostridium subcluster XIVa

の3種類。しかし、Prevotella または Clostridium cluster IV のみと有意な正の相関を認めた血清胆汁酸マーカーはなかった。一方、C-7位の脱水酸化反応のマーカーと考えられる血中 DCA/(DCA+CA) は、Clostridium subcluster XIVa のみと有意な正の相関を示したことから、DCA/(DCA+CA) が Clostridium subcluster XIVa の血中マーカーとなる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3件)

Griffiths WJ, Abdel-Khalik J, Crick PJ, Ogundare M, Shackleton CH, Tuschl K, Kwok MK, Bigger BW, Morris AA, Honda A, Xu L, Porter NA, Björkhem I, Clayton PT, Wang Y. Sterols and oxysterols in plasma from Smith-Lemli-Opitz syndrome patients. 査読有, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2016 [Epub ahead of print].

DOI:10.1016/j.jsmb.2016.03.018.

Higashimura Y, Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Mizushima K, Ushiroda C, Ohnogi H, Kudo Y, Yasui M, Inui S, Hisada T, Honda A, Matsuzaki Y, Yoshikawa T. Protective effect of agaro-oligosaccharides on gut dysbiosis and colon tumorigenesis in high-fat diet-fed mice. 査読有, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2016; 310: G367-G375. DOI: 10.1152/ajpgi.00324.2015.

Shang Q, Guo GL, Honda A, Shi D, Saumoy M, Salen G, Xu G. Bile acid flux through portal but not peripheral veins inhibits CYP7A1 expression without involvement of ileal FGF19 in rabbits. 査読有, Am. J. Physiol. 2014; 307: G479-486.

DOI:10.1152/ajpgi.00062.2014.

[学会発表](計6件)

Murakami M, Iwamoto J, Miyazaki T, Monma T, Shoichiro Y, Ikegami T, Matsuzaki Y, Honda A. Detection of gut dysbiosis due to reduced *Clostridium* subcluster XIVa based on the serum bile acid profile. Digestive Disease Week 2017. Chicago, USA, May 7, 2017.

本多 彰, 宮崎照雄, 平山 剛, 池上 正, 松崎靖司. **マウスにおけるデオキシコール酸7-hydroxylaseの探索**. 第38回胆汁酸研究会, 久留米 11/26, 2016.

池上 正, 本多 彰, 松崎靖司. NASH-HCC患者における血清胆汁酸プロファイルの特徴. 日本消化器関連学会週間

2015 (ワークショップ) 東京 10/8-9, 2015.

Ikegami T, Honda A, Miyazaki T, Yara S, Matsuzaki Y. Characteristic features of serum bile acids profile in patients with non-alcoholic steatohepatitis with hepatocellular carcinoma. AACR Special Conference-Metabolism and Cancer. Bellevue, WA, USA. 6/7-10, 2015.

岩本淳一, 本多 彰, 松崎靖司. 脂質, 胆汁酸代謝からみたクローン病における脂肪肝合併メカニズムについての検討. 第 22 回日本消化器関連学会週間(ワークショップ) 神戸 10/23-24, 2014.

本多 彰, 池上 正, 岩本淳一, 宮崎照雄, 松崎靖司. 腸内環境マーカーとしての末梢血胆汁酸分画測定. 第 14 回日本抗加齢医学会総会(シンポジウム) 大阪 6/6-8, 2014.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 彰 (HONDA, Akira)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10468639

(2) 研究分担者

池上 正 (IKEGAMI, Tadashi)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40439740

(3) 研究分担者

宮崎 照雄 (MIYAZAKI, Teruo)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号: 60532687