

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05923

研究課題名（和文）腸内細菌と代謝物の性差の違いが疾患に与える影響についての研究

研究課題名（英文）Studies on the effects of sex differences in gut bacteria and metabolites on diseases

研究代表者

中西 裕美子（Nakanishi, Yumiko）

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：10614274

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：腸内細菌叢と代謝物を組み合わせて性差の違いを評価した解析はほとんど報告されていないため、本研究ではマウス、及び、ヒト検体を用いて腸内細菌叢と代謝物の性差に解析を行った。その結果、ヒト試験において動脈硬化のリスクとなるトリメチルアミンの産生が男女差で異なること、また産生にかかる腸内細菌との関係が男女間で異なることを発見した。また、マウス試験においては胆汁酸産生に男女間で差があることを発見した。興味深いことに、ヒト試験とマウス試験の結果両方で、オスで代謝物と腸内細菌の関連性が強く出ている結果であった。さらなる解析は必要であるが、腸内細菌叢と代謝物との関連性が男女間で異なる可能性も考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト研究において、性別は交絡因子として扱われ、マウス試験では基本的に雌雄どちらかにそろえて実験を行う。本研究で発見した代謝物は性差による生理的な違いも反映しているが、代謝の過程で腸内細菌が関与することから腸内細菌叢の性差の違いも反映していることが予測された。また、本研究ではオスで代謝物と腸内細菌の関連性が強く出ている結果であったことから、性差特有の腸内細菌が特定の代謝の役割を果たす可能性も考えられ、腸内細菌が関わる疾患、もしくは健康増進を評価する上で本研究の結果は重要な知見となると予測される。

研究成果の概要（英文）：It had been few reports of analysis of the sex differences by combining the intestinal microbiota and metabolites. In this study, to focus on the sex differences in the intestinal microbiota and metabolites, we analyzed plasma and fecal samples from mouse and human. As a result, we found that the production of trimethylamine, which is one of risk factor for arteriosclerosis, differs between men and women in human studies, and that the relationship with intestinal bacteria related to production differs between men and women. We also found differences in bile acid production between males and females in mouse studies. Interestingly, results from both human and mouse studies showed strong associations between metabolites and gut bacteria in males. Although further analysis is required, the relationship between the intestinal microbiota and metabolites may differ between men and women.

研究分野：メタボロミクス

キーワード：代謝物 腸内細菌 性差 動脈硬化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢には性差があり、腸内細菌叢の違いが性別特有の免疫システムに関与することが報告されている。申請者はこれまでに、腸内細菌由来の代謝物を網羅的に調べるため、C57BL/6 系統、12 週齢の無菌マウスと SPF マウスのオスとメスの代謝物を比較した結果、アテローム性動脈硬化の原因の 1 つとされているトリメチルアミン N-オキシド (trimethylamine N-oxide, TMAO) の肝臓中の濃度が SPF マウスのメスで有意に高いことを発見した。食事由来のコリンやカルニチンが腸内細菌により代謝されトリメチルアミン(trimethylamine, TMA) が産生され、TMA は宿主により肝臓で TMAO に変換される。TMAO はマクロファージを泡沫化させることなどによってアテローム性動脈硬化を進展させ心血管疾患を惹起する要因となることが報告されている[1]。先行研究では腸内細菌の性差の影響については調べておらず、メスでの TMAO 増加が腸内細菌由来の変動である可能性もあり腸内細菌の関与を調べる必要がある。また、腸内細菌叢や代謝物の性差についてはまだ研究報告が少ないため、詳細に調べることで新たな知見を得られる事が期待できる。また、ヒト研究において、性別は交絡因子として扱われるが、性差の観点で腸内細菌叢とメタボロームデータを比較し、疾患を持つ人、また健康者に関しても男女の違いを明らかにする事は重要である。

### 2. 研究の目的

腸内細菌叢と代謝物を組み合わせて性差の違いを評価した解析はほとんど報告されていないため、本研究では無菌マウスと SPF マウスでの腸内細菌叢と代謝物を性差で比較することで、まず腸内細菌と代謝物の性差における違いを明らかにする。さらに、ヒト検体を用いてヒトでの腸内細菌叢と代謝物の性差における違いについても明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) LC-MS を使用したメタボローム解析の構築

申請者はこれまで GC/MS を使用したメタボローム解析を行ってきたが、TMAO を含む一部の代謝物は GC/MS では測定することが難しい。そこで、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LCMS) を使用し計測する代謝物を増やし解析するため、新たな分析系を構築した。

LCMS-8040 (島津製作所) を用いて、カラムは Discovery HS F5 (Merck) を使用し移動相 A 液 (0.1% ギ酸) B 液 (0.1% ギ酸/アセトニトリル) をグラジエント溶出し代謝物の分離を行い、MRM モードで測定を行う系を構築した。このシステムを使用し、アミノ酸系代謝物を 14 物質、ビタミン 6 物質、また、TMAO 産生に関わる代謝物 4 物質を新たに計測することが可能となった。以上より、GCMS のシステムで 310 物質、LCMS のシステムで 22 物質を計測することが可能となった。

また、以前のデータから一部の胆汁酸が性別で異なることがマウス実験よりわかっていたため、胆汁酸を網羅的に計測する方法を構築した。LCMS-8040 (島津製作所) を用いて、カラムは ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters) を使用し移動相 A 液 (0.01% ギ酸) B 液 (0.01% ギ酸/アセトニトリル) をグラジエント溶出し代謝物の分離を行い、MRM モードで測定を行う系を構築した。このシステムを使用し、胆汁酸を 28 種類計測することが可能となった。

#### (2) ヒトにおける腸内細菌叢と代謝物の性差について

日本人の健康者、肥満・糖尿病予備軍の被験者 300 名の「生活習慣病における腸内細菌の役割について」の検体からデータ取得と解析を行った。ヒト糞便から細菌の DNA を抽出し 16S メタ解析を行い、腸内細菌叢を調べた。また同時に、ヒト糞便から水溶性代謝物を抽出しメタボローム解析を行った。

#### (3) マウス肝臓と糞便中の胆汁酸の性差の比較

腸内細菌由来の代謝物を網羅的に調べるため、C57BL/6 系統、12 週齢の無菌マウスと異なる 2 つの施設の SPF マウス (SPF-1 マウスと SPF-2 マウス) のオスとメスの代謝物を比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒトにおける腸内細菌叢と代謝物の性差について

日本人の健康者、肥満・糖尿病予備軍の被験者それぞれ 100 名の検体からデータ取得と解析を行った。その結果、腸内細菌叢のバランスを評価する多様性については女性がやや低い傾向にあるものの、男女で有意な差は見られなかった。腸内細菌の構成を比較したところ、Prevotella 属、Coprococcus 属、Dorea 属が男性で多く、Faecalibacterium 属、Bacteroides 属、Streptococcus 属、Alistipes 属、Veillonella 属は女性で多い特徴が見られた (図 1)。これらは、糖尿病予備群と肥満群で主に観測された特徴であった。また、メタボローム解析の結果、男女間で有意に異なる代謝

物がいくつか見られた。肥満、糖尿病予備軍の被験者に着目して解析を行うと、糖尿病予備軍の女性で糞便中の糖類が増加していることが分かった。

TMAO とその関連代謝物について、まず、性別で分けて健康者群、肥満群、糖尿病予備群で比較した結果、血漿中のコリンが健康者群と比較し糖尿病予備群で有意に増加していたが、その他の TMAO 関連代謝物は糖尿病予備群で高い傾向にあるものの有意差はなかった。性差の違いについて比較したところ、女性で血漿中のコリンが健康者群と比較し糖尿病予備群で有意に増加していたが、男性では有意差は見られなかった。血漿中のコリンとカルニチンは 3 群ともに女性で有意に低いという特徴がみられた(図 2)。糞便中ではコリンが糖尿病予備群において女性で有意に低い結果であったが、その他の群では有意差はなかったが女性で低い傾向にあった。コリンやカルニチンが糞便中で低い傾向にあることはマウス実験と一致していたが、血漿中の TMAO はマウス実験ではメスで有意に高かったがヒト試験では有意差はつかなかった。TMAO 濃度の性差については ApoE-/-マウスのメスで有意に高いという報告があったが、他のマウスでは性差が見られない報告もあった[2]。ヒト研究では男性の方が TMA と TMAO の血清中濃度が高いという報告があり、さらに肥満とも関連する報告があった[3]。このことから、TMA や TMAO は肥満に関わる疾患や脂質代謝にも関わり濃度が変化している可能性があり、重要なバイオマーカーとしても評価できると共に、TMAO の評価には性差の影響も大きく関連すると予測された。

TMA の前駆体であるコリンは、アセチルコリン、リン脂質、メチル供与体ベタインの前駆体としても機能することから生体にとって必要な栄養素でもある。腸内細菌の代謝により糞便中、血中のコリンやカルニチンが変化している可能性も考えられるため、腸内細菌叢とコリン関連代謝物との相関解析を行った。その結果、興味深いことに女性ではコリンと 1 つの腸内細菌しか有意な相関関係が見られなかったが、男性では TMA、コリン、カルニチンと有意な相関がある腸内細菌が多数同定された(図 3)。コリンから TMA を産生する遺伝子 cutC は複数種の腸内細菌種が保有するため、ある腸内細菌の集団が TMA 産生に関わると考えられる。相関関係の男女の違いは、腸内細菌叢の違いにより男性における TMA 産生の増加を反映している可能性が考えられた。

以上の結果から、男女間で異なる腸内細菌や代謝物は、健康者、および、肥満や糖尿病予備軍ではそれぞれ異なる傾向を示す場合もあることが分かった。疾患を持つヒトの男女間に特有の腸内細菌や代謝物は疾患と関わりがある可能性もあるため、今後は血液検査の結果等の臨床情報と腸内細菌叢や代謝物との相関解析を行い、詳細に解析していく予定である。

## (2) マウスの胆汁酸産生の性差について

以前の研究の結果から、タウロコール酸などの胆汁酸がマウスの代謝物で性差がみられたため、胆汁酸を網羅的に調べるため、C57BL/6 系統、12 週齢の無菌マウスと異なる 2 つの施設の

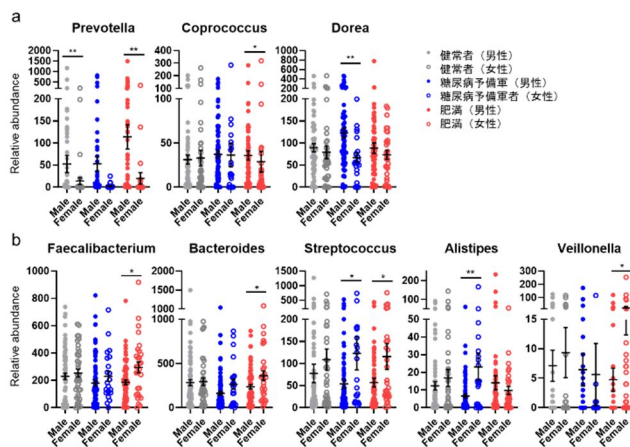


図 1. 腸内細菌叢の性差の違い

a. 男性で多い腸内細菌。b. 女性で多い腸内細菌

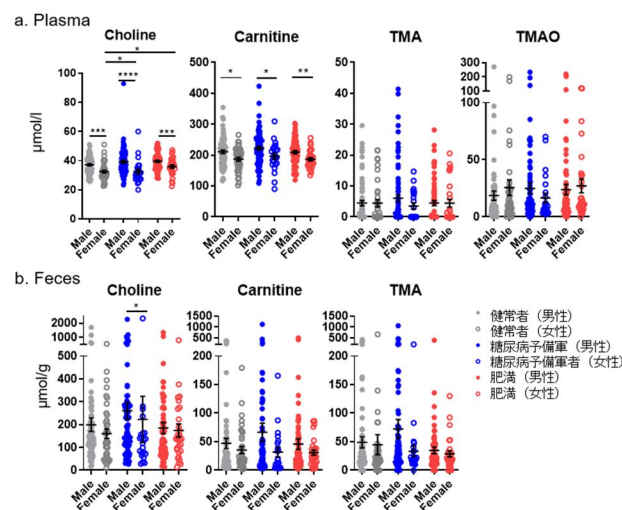


図 2. TMAO とその関連代謝物の性差の違い

a. 血漿中の代謝物。b. 糞便中の代謝物

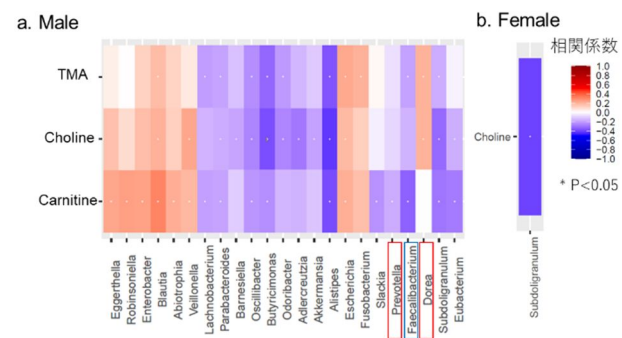


図 3. TMAO とその関連代謝物と糞便中の腸内細菌叢との相関 Heatmap

a. 男性のデータ b. 女性のデータ

相関関係の男女の違いは、腸内細菌叢の違いにより男性における TMA 産生の増加を反映している可能性が考えられた。

SPF マウス (SPF-1 マウスと SPF-2 マウス) のオスとメスの胆汁酸を比較した(図4)。その結果、マウスの肝臓、及び、糞便ではほぼすべての検出された胆汁酸がメスにおいて高い結果だった。無菌マウスのメスにおいて胆汁酸濃度が高いことから、胆汁酸産生は生理的にメスの方が高いことがわかる。胆汁酸は小腸へ分泌されたのち腸内細菌により代謝を受け、二次胆汁酸を産生する。また、腸内細菌はタウリンやグリシンが抱合した一次胆汁酸を分解し脱抱合を行う。一次/二次胆汁酸の比、及び、抱合/脱抱合の比を計算したところ、抱合/脱抱合の比は総胆汁酸量の結果と同じくメスで高い傾向だった。一次/二次胆汁酸の比では、糞便中では総胆汁酸量の結果と同様であったが、肝臓中では性別で差は見られなかった。これは小腸にて再吸収される胆汁酸は一次胆汁酸の割合が多く、二次胆汁酸は主に大腸の腸内細菌により産生されるため、肝臓と糞便中では異なる結果となったと考えられる。メスで胆汁酸量が多く観察されたのは、女性ではエストロゲンの作用によりコレステロールや胆汁酸産生が制御されることは報告されているため[4]、性差が観察されたと考えられる。しかし、本研究の結果から糞便中の抱合/脱抱合の比では SPF-2 のメスではばらつきが大きく有意な差は見られなかったことから、これは腸内細菌の影響で脱抱合される胆汁酸量が変化したためと考えられる。

糞便中の胆汁酸と腸内細菌叢との相関解析を行った結果、メスでは有意な相関関係が検出されなかったが、オスでは有意な相関関係が多数検出された(図5)。二次胆汁酸産生や脱抱合化胆汁酸を含む胆汁酸自体の産生はメスの方が多いが、その理由は、おそらくメスでのコレステロール代謝と宿主による胆汁酸産生自体が多いことに起因する。オスでは二次胆汁酸や脱抱合化胆汁酸との相関関係が強く出ていることから、腸内細菌叢の変動が糞便中の胆汁酸組成に大きく影響していると考えられた。

興味深いことに、ヒト試験での TMA 産生と腸内細菌叢との相関解析の結果と同様に、オスで代謝物と腸内細菌の関連性が強く出ている結果であった。他の代謝物と腸内細菌叢との相関関係等、さらなる解析は必要であるが、腸内細菌叢と代謝物との関連性が男女間で異なる可能性も考えられた。

#### < 引用文献 >

- Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, 2011, 472, 57-63.
- Trenteseaux C, Gaston A-t, Aguesse A, et al. Perinatal Hypercholesterolemia Exacerbates Atherosclerosis Lesions in Offspring by Altering Metabolism of Trimethylamine-N-Oxide and Bile Acids. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2017, 37, 2053-63.
- Obeid R, Awwad HM, Rabagny Y, et al. Plasma trimethylamine N-oxide concentration is associated with choline, phospholipids, and methyl metabolism. *The American journal of clinical nutrition*, 2016, 103, 703-11.
- Phelps T, Snyder E, Rodriguez E, et al. The influence of biological sex and sex hormones on bile acid synthesis and cholesterol homeostasis. *Biology of Sex Differences*, 2019, 10, 52.

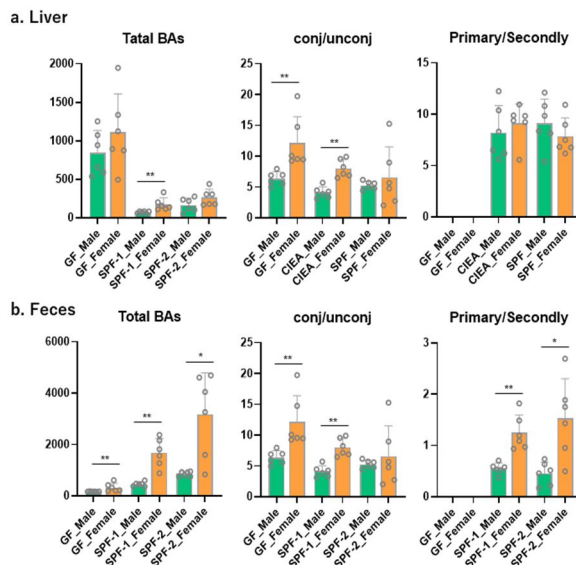


図4. 胆汁酸の性差の違い

a. 肝臓中の胆汁酸。 b. 糞便中の胆汁酸

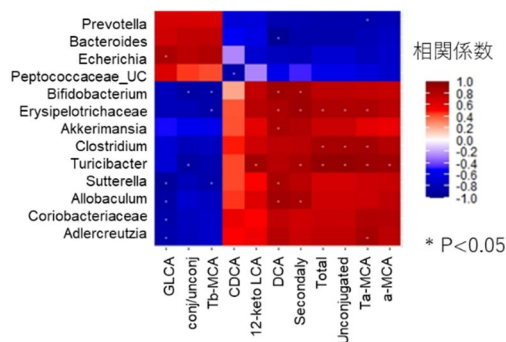


図5. 糞便中の胆汁酸と腸内細菌叢との相関 Heat map

Figure 5 is a heatmap showing the correlation between various gut bacterial genera and different bile acid types in feces. The y-axis lists bacterial genera: Prevotella, Bacteroides, Echerichia, Peptococcaceae\_UC, Bifidobacterium, Erysipelotrichaceae, Akkermansia, Clostridium, Turicibacter, Sutterella, Allobaculum, Coriobacteriaceae, and Adlercreutzia. The x-axis lists bile acid types: GLCA, conj/unconj, Ta-NCA, CDCA, DCA, 12-keto LCA, Total, Secondary, Unconjugated, Ta-NCA, and a-NCA. The color scale represents the correlation coefficient, ranging from -1.0 (blue) to 1.0 (red). Significant correlations (P < 0.05) are indicated by asterisks.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中西裕美子、竹内直志、水野由子、山道信毅、須田互、服部正平、窪田直人、窪田哲也、大野博司
2. 発表標題 2型糖尿病や肥満の発症に関わる腸内細菌と代謝物の探索
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------