

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11603

研究課題名(和文) 糞便ステロイドミクス解析による腸管ディスバイオーシスの新しい評価方法の開発

研究課題名(英文) A new method for detecting intestinal dysbiosis by fecal steroidomics analysis

研究代表者

平山 剛 (Hirayama, Takeshi)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30449219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌叢の遺伝子解析を行わずに、より簡易な方法で臨床的なdysbiosisを診断する方法の開発を目的とした。糞便からステロイドを抽出し、Girard's P ヒドラジンおよびピコリン酸を用いてカルボニル基と水酸基を誘導体化し、HPLC-MS/MS (positive ESI-SRM)にて一斉分析する方法を確立した。胆汁酸および食事によってdysbiosisを誘発したマウスの糞便を用いて、腸内細菌叢の遺伝子解析とステロイド分画の測定を行った。その結果、dysbiosis では5 β -cholestan-3-oneとCoprostanolの著明な減少を認め、バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、肥満や疾病の原因として腸内細菌叢の乱れ(dysbiosis)が非常に注目されているが、その診断には時間と費用のかかる腸内細菌のメタゲノム解析が必要であると考えられている。しかし、そこまでの詳細な解析は必要なく、臨床的にdysbiosisがあるかないか、もしあれば治療によって改善したか否かを簡易な方法で診断する手法を提案した点において、学術的にも社会的にも意義のある研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a simpler method for diagnosing clinical dysbiosis without genetic analysis of the intestinal microbiota. Steroids were extracted from feces, and the carbonyl and hydroxyl groups were derivatized with Girard's P hydrazine and picolinic acid. These steroids were analyzed simultaneously by HPLC-MS/MS (positive ESI-SRM) along with deuterium-labeled internal standards. We determined steroid fractions and intestinal microbiota using feces from mice with dysbiosis due to altered bile acid composition and high-fat/high-sucrose diet. The results showed that 5 β -cholestan-3-one and coprostanol were decreased in dysbiosis, suggesting they could be used as biomarkers for dysbiosis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：糞便 コレステロール ステロイド 腸内細菌叢 ディスバイオーシス LC-MS/MS

1. 研究開始当初の背景

肥満や疾病の原因として腸内細菌叢の乱れ(dysbiosis)が注目されている。ヒトの腸内に住む1,000種類、100兆個の細菌は、食事と生体由来の化合物を自身の栄養源にすると共に、その代謝物はヒトの健康に様々な影響を与えている。近年、腸内細菌メタゲノム解析の進歩により、各個人の腸内細菌叢を詳細に調べることができるようになった。しかし個体差が非常に大きく、各菌種の作用や相互作用が完全には解明されていないため、腸内細菌叢のデータのみからそれが異常か否かを診断するのは簡単ではない。このような現状から、腸内細菌叢の遺伝子解析を行わずに、より簡易的な方法によって、臨床的な dysbiosis の有無を診断できないかと考えた。これまでに我々は、糞便中または血清中の二次胆汁酸比率が、二次胆汁酸を生成する腸内細菌クラスターの比率とよく相関することを報告してきた (Inflamm Bowel Dis 24:1035-44, 2018)。しかし、二次胆汁酸が生成できなくなるような dysbiosis の状態は、高度な下痢などかなり特殊な病態であり、dysbiosis の検出感度としてはあまり高くない。このような背景から、腸内細菌による胆汁酸以外の代謝物でより高感度に dysbiosis を検出できる物質の探索を行なった。

2. 研究の目的

食事または生体由来化合物のうち、腸内細菌による代謝経路がある程度判明し、しかも大腸からの吸収率が低く、保存中は比較的安定な化合物である糞便のコレステロール代謝物に着目した (図1)。本研究では、1)糞便中コレステロール代謝物の高感度一斉分析方法を確立し、2)胆汁酸と食事内容の介入によって dysbiosis を起こさせたマウスを用いて、腸内細菌叢と糞便ステロイドとの関連性を明らかにすることを目的とした。

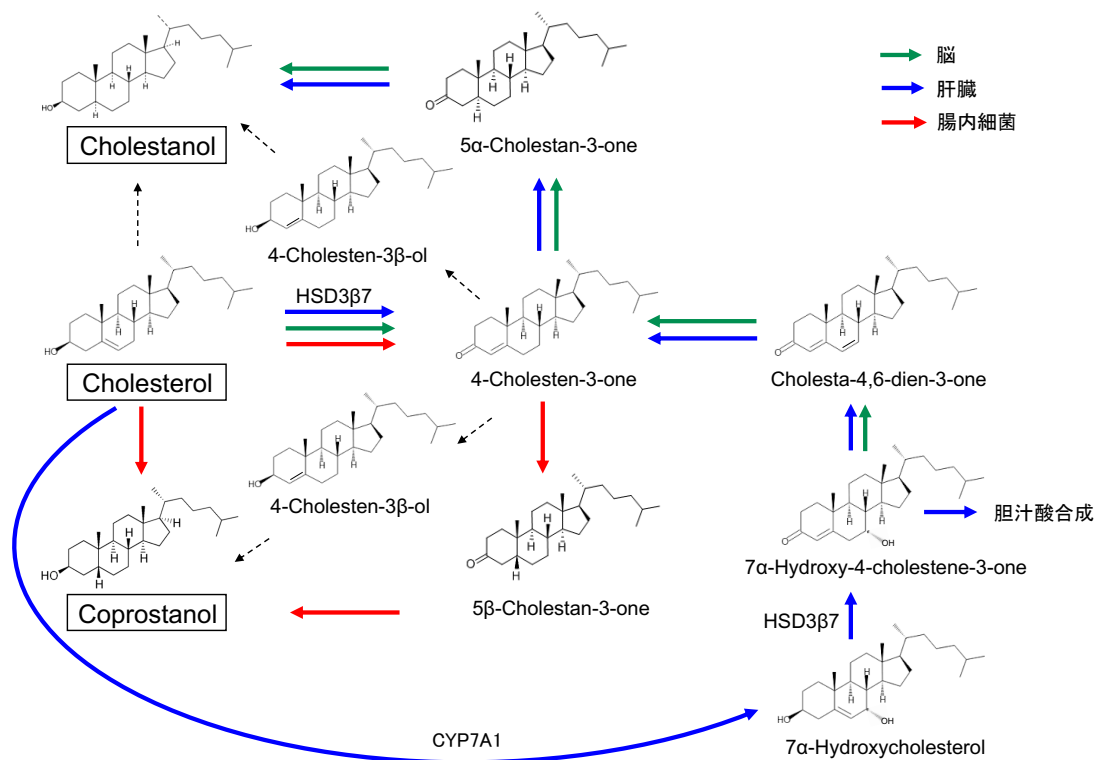


図1 生体におけるコレステロールの代謝経路(肝臓、脳、腸内細菌の関連)

3. 研究の方法

(1) 糞便ステロイド分析

ステロイドの高感度分析を行うために、誘導体化の方法を検討した。目的のステロイドにはカルボニル基または水酸基を持つものが存在するため、カルボニル基を有するものは Girard's P ヒドラジン (図2) により、また水酸基を有するものはピコリン酸 (図3) により誘導体化を行った。

Girard's P ヒドラジン (GP) 誘導体の作成

- ① 乾燥ステロイドにエタノール 90 μl を添加して溶解
- ② 酢酸 10 μl を添加

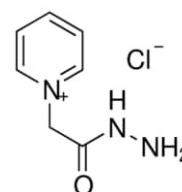


図2 Girard's P ヒドラジン

- ③ GP 試薬 (0.5 g/ml H₂O) を 10 μl 添加して混和
- ④ 60°C で 10 min インキュベート
- ⑤ 蒸発乾固
- ⑥ 100 μL のアセトニトリルに溶解
- ⑦ 遠心後上清を使用

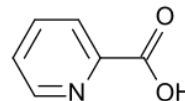


図3 ピコリン酸

ピコリン酸誘導体の作成

- ① 乾燥ステロイドにピコリン酸誘導体化試薬 85 μl (2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物 5 mg, 4-ジメチルアミノピリジン 1.5 mg, ピコリン酸 4 mg, ピリジン 75 μL, トリエチルアミン 10 μL) を添加して混和溶解
- ② 室温で 15 min インキュベート
- ③ n-ヘキサン 1 mL を添加して混和、遠心し、不溶物を沈殿除去
- ④ 上清を蒸発乾固後 100 μL のアセトニトリルに再溶解

HPLC-MS/MS 分析

上記 GP 誘導体とピコリン酸誘導体の最終アセトニトリル溶液を 1:1 で混和し、HPLC-MS/MS システムに導入した。カラムはサーモフィッシャーサイエンティフィック社の Hypersil GOLD (150 mm x 2.1 mm I.D., 3 μm) を使用し、移動相としてギ酸を含むアセトニトリル:水系を用い、各ステロイドの分離と分析時間から最適なグラジエント条件を検討した。

(2) 高脂肪・高糖質食投与マウスの作成

12 週齢の雄性 C57BL/6J (wild type, WT) マウスおよび同週齢の雄性ヒト型胆汁酸 Cyp2a12/Cyp2c70 ダブルノックアウト (DKO) マウスに、標準食または高脂肪・高シヨ糖食を投与した。4 週間投与後に糞便を回収し、-70°C で保存した。

(3) 腸内細菌叢解析

腸内細菌叢は、同時に採取した糞便の 16S ribosomal RNA gene sequencing にて解析した。

4. 研究成果

(1) 糞便ステロイド一斉分析方法の確立

ステロイド標準品を用いた基礎実験

前述の Hypersil GOLD カラムを使用した場合の HPLC の最適条件は、移動相の流量 0.3 mL/分で、A: 0.2%ギ酸を含むアセトニトリル:水 (5:95)、B: 0.2%ギ酸を含むアセトニトリルを、B (60%) → B (90%) までの 30 分間のグラジエントとし、B (90%) を 10 分間保持することによって得られた。誘導体化した主なステロイドの HPLC-positive ESI-SRM データを表 1 に示す。ほとんどの重要ステロイドは相互に分離可能であったが、4-Cholesten-3β-ol と Cholesterol はマススペクトルも retention time もほぼ同じであり、分離できなかった。

表 1 主な糞便ステロイド誘導体の HPLC-positive ESI-SRM データ

ID	Steroid derivative	Precursor ion (m/z, structure)		Product ion (m/z, structure)		CE (v)	RT (min)	IS
1	4-Cholesten-3-one-GP	518.4	[M] ⁺	439.4	[M-Pyridine] ⁺	30	14.59	A
2	5α-Cholestan-3-one-GP	520.4	[M] ⁺	441.4	[M-Pyridine] ⁺	35	15.49	A
3	5β-Cholestan-3-one-GP	520.4	[M] ⁺	441.4	[M-Pyridine] ⁺	35	15.01	A
4	Cholesta-4,6-dien-3-one-GP	516.4	[M] ⁺	437.4	[M-Pyridine] ⁺	30	13.56	A
5	4-Cholesten-3β-ol-PA	369.4	[M-PA+H] ⁺	369.4	[M-PA+H] ⁺	15	36.60	B
6	Cholesterol-PA	369.4	[M-PA+H] ⁺	369.4	[M-PA+H] ⁺	15	36.60	B
7	Coprostanol-PA	371.4	[M-PA+H] ⁺	371.4	[M-PA+H] ⁺	15	38.46	C
8	Cholestanol-PA	371.4	[M-PA+H] ⁺	371.4	[M-PA+H] ⁺	15	39.13	C
A	[² H ₇]4-Cholesten-3-one-GP	525.5	[M] ⁺	446.4	[M-Pyridine] ⁺	30	14.44	-
B	[² H ₇]Cholesterol-PA	376.4	[M-PA+H] ⁺	376.4	[M-PA+H] ⁺	15	36.39	-
C	[² H ₅]Cholestanol-PA	376.4	[M-PA+H] ⁺	376.4	[M-PA+H] ⁺	15	38.98	-

GP, Girard's P 誘導体; PA, ピコリン酸誘導体; CE, collision energy; RT, retention time; IS, internal standard for quantification

糞便サンプルを用いた基礎実験

- ① 糞便 2-5 mg を秤量して、8.9 M 水酸化カリウム水溶液 28 μL と エタノール 222 μL を添加。60°C で 60 min 加熱してステロイドの抽出と加水分解を行った。
- ② 遠心後の上清 10 μL (1/25) に内部標準として [²H₇]4-Cholesten-3-one 50 ng、 [²H₇]Cholesterol 500 ng、 [²H₇]Cholestanol 20 ng を含む 40 μL のエタノール、0.1% フェノールレッド水溶液 50 μL、n-ヘキサン 200 μL を添加して 2 回抽出

- ③ 2 回分の n-ヘキサン層抽出液を混合し (約 400 μ L)、2 つに分けて蒸発乾固
- ④ 一方は GP ヒドラジンで、他方はピコリン酸で誘導体化した。
- ⑤ 誘導体化後に混和したアセトニトリル溶液 (約 200 μ L) のうち 5 μ L を HPLC-MS/MS に導入して分析した。

以上の方法により、4-Cholesten-3 β -ol 以外の目的ステロイドを一斉分析することが可能になった。4-Cholesten-3 β -ol は生体中で存在が確認されていない理論上の中間代謝物である。存在したとしてもコレステロールよりはかなり少ないと考えられ、コレステロールの定量値には有意な影響を与えないと判断した。

(2) 胆汁酸組成と食事内容が腸内細菌叢に与える影響

腸内細菌叢は食事内容や胆汁酸によって影響を受けることが知られている。そこで、胆汁酸組成の異なる 2 種類のマウスを用いて、それぞれに標準食または高脂肪・高シヨ糖食を 4 週間投与した 4 群で、腸内細菌叢を比較した (図 4)。その結果、腸内細菌叢は胆汁酸組成よりも食事内容によって大きな影響を受けることが明らかになった。

(3) 胆汁酸組成と食事内容が糞便ステロイドに与える影響

前記 4 群のマウスで糞便中ステロイドを比較した (図 5)。糞便中ステロイドには、このほかに植物由来の植物ステロイドがあるが、今回は分析対象としなかった。糞便中総ステロイド量には各群で有意差がなかった。今回の高脂肪・高糖質食ではコレステロールは負荷しておらず、むしろ標準食よりも少なかった (24 mg vs. 65 mg/100 g)。4,6-Cholestadien-3-one および 4-Cholesten-3-one にはグループ間で有意な差が見られなかったが、5 β -Cholestan-3-one と Coprostanol (同じ代謝経路に存在) は高脂肪・高糖質食で著明に減少していた。一方、Cholestanol は高脂肪・高糖質食で増加していた。その他、標準食において胆汁酸のヒト化は 5 β -Cholestan-3-one と Coprostanol を特に上昇させ、ヒト化した胆汁酸の存在下では、高脂肪・高糖質食によって 5 α -Cholestan-3-one が増加する傾向を認めた。糞便中ステロイドの大部分はコレステロールと Coprostanol であり、Coprostanol が食事関連の dysbiosis 検出に有用なマーカーとなる可能性が示唆された。

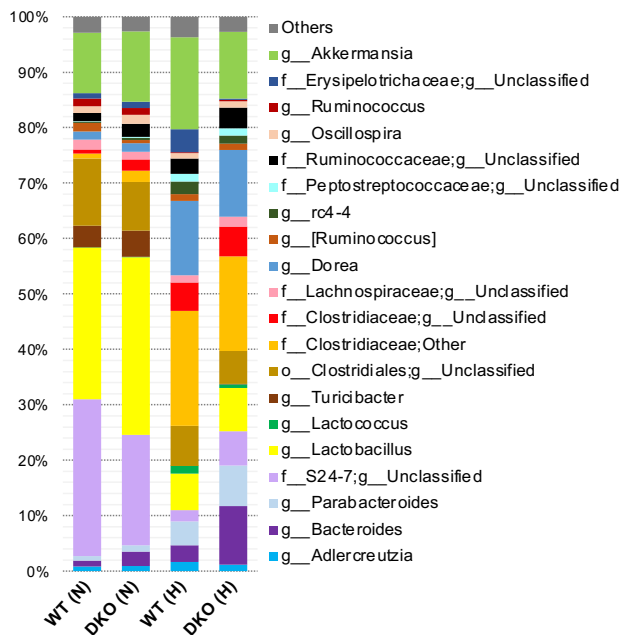


図4 胆汁酸組成および食事内容の異なるマウスでの腸内細菌叢の比較

WT, 通常マウス; DKO, ヒト型胆汁酸マウス; N, 標準食; H, 高脂肪・高糖質食

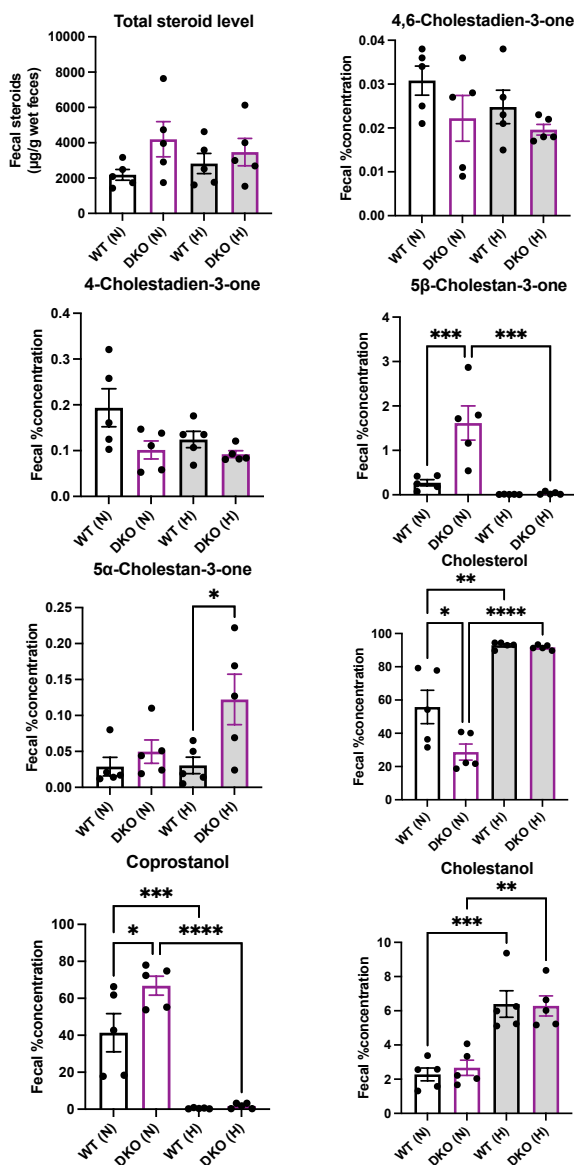


図5 糞便中ステロイド濃度および各ステロイドの比率

(4) 腸内細菌叢と糞便ステロイドの関連

図6に糞便中のステロイド分画(%)と腸内細菌比率(%)との相関を示す。個々のステロイドは、個々の細菌と強い相関があるというよりも、複数のステロイドが、ある細菌群と有意に相関していた。特に、5 β -Cholestan-3-oneおよびCoprostanol比率の上昇は、Ruminococcus, Turicibacter, Lactobacillus, S24-7などの細菌比率と高い正の相関を示し、コレステロールからCoprostanolを生成する主要な菌種である可能性が示唆された。一方、コレステロール比率と有意に相関があった菌種は、コレステロールが基質であり細菌が新たにコレステロールを産生することはないと考えられることから、Coprostanol生成を抑制(またはCoprostanol生成菌を抑制)する菌であると推測される。以上のように糞便中ステロイド

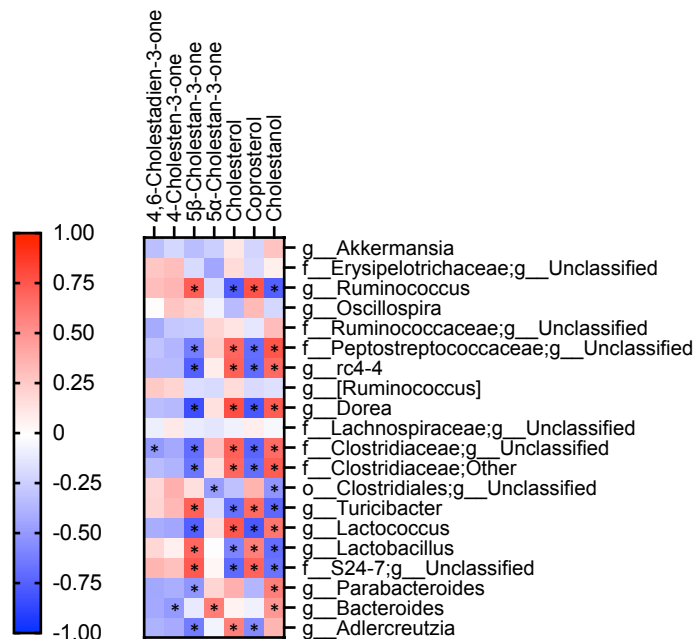


図6 糞便中ステロイド分画(%)と各腸内細菌比率(%)との相関 (Spearman's rank correlation coefficients) * $P < 0.05$

の分画を測定することにより、腸内細菌叢の変化をある程度推測することができた。

(5) 今後の展望

糞便中ステロイド分画分析は、腸内細菌のメタゲノム解析を行わずに腸内細菌叢の dysbiosis を検出するためのツールとなりうることが示された。既に我々が報告している胆汁酸分画分析を用いた dysbiosis 検出方法と合わせて、ヒトへの応用を目指し、現在検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iwamoto Junichi, Honda Akira, Miyazaki Teruo, Monma Tadakuni, Ueda Hajime, Morishita Yukio, Yara Sho-ichiro, Hirayama Takeshi, Ikegami Tadashi	4. 巻 5
2. 論文標題 Western Diet Changes Gut Microbiota and Ameliorates Liver Injury in a Mouse Model with Human Like Bile Acid Composition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 2052 ~ 2067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Hajime, Honda Akira, Miyazaki Teruo, Morishita Yukio, Hirayama Takeshi, Iwamoto Junichi, Nakamoto Nobuhiro, Ikegami Tadashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Sex-, age-, and organ-dependent improvement of bile acid hydrophobicity by ursodeoxycholic acid treatment: A study using a mouse model with human-like bile acid composition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0271308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0271308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Monma Tadakuni, Iwamoto Junichi, Ueda Hajime, Tamamushi Makoto, Kakizaki Fumio, Konishi Naoki, Yara Shoichiro, Miyazaki Teruo, Hirayama Takeshi, Ikegami Tadashi, Honda Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 Evaluation of gut dysbiosis using serum and fecal bile acid profiles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World Journal of Clinical Cases	6. 最初と最後の頁 12484-12493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12998/wjcc.v10.i34.12484	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩本淳一、本多 彰、宮崎照雄、門馬匡邦、上田 元、池上 正
2. 発表標題 西欧食による腸内細菌叢と胆汁酸代謝の変化：胆汁酸ヒト化マウスを用いた検討
3. 学会等名 第42回胆汁酸研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩本淳一、門馬匡邦、玉虫 惇、上田 元、中川俊一郎、森山由貴、柿崎文郎、小西直樹、屋良昭一郎、宮崎照雄、平山 剛、池上 正、本多 彰
2. 発表標題 炎症性腸疾患における血中胆汁酸分析を用いたdysbiosisの評価
3. 学会等名 第54回日本消化吸収学会総会
4. 発表年 2023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
研究分担者	本多 彰 (Honda Akira) (10468639)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	
研究分担者	宮崎 照雄 (Miyazaki Teruo) (60532687)	東京医科大学・医学部・准教授 (32645)	

	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
研究協力者	岩本 淳一 (Iwamoto Junichi)		
研究協力者	上田 元 (Ueda Hajime)		

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
---------	---------