

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17956

研究課題名（和文）ステロイドメタボロミクス解析による生活習慣病発症バイオマーカーの探索的研究

研究課題名（英文）Exploratory study of biomarkers for the development of lifestyle-related diseases by steroid metabolomics analysis

研究代表者

唐島 成宙（Karashima, Shigehiro）

金沢大学・GS教育系・助教

研究者番号：30801584

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）：予備実験より、高血圧症の発症機序にステロイド代謝物と腸内細菌叢の関与が疑われた。そこで我々は一般住民242名を対象に、腸内細菌叢の構成と高血圧有病率を比較し、Bifidobacterium属などの存在比の低い腸内細菌叢を持つ群は、低食塩摂取でも高食塩と同等の高血圧有病率であることを示した。特にB. bifidumやB. Breveとの関連が強い傾向にあり、IL-17などのサイトカインとの関連が強く、ステロイドメタボロミクス解析の結果、いくつかのミネラルコルチコイドとの関与が示唆された。さらなる食塩感受性高血圧発症機序を解明のためにメタゲノム解析や動物モデルへの移植実験を追加予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌叢代謝ネットワークを介した食塩感受性高血圧の発症機序の解明後、食塩感受性高血圧の診断バイオマーカーとしての腸内細菌叢の構成比や細菌叢由来代謝物の有用性を臨床的に示し食塩感受性の個体差を考慮した精密医療へつなげることが次の展開と考えている。心血管イベントの発症しやすい食塩感受性高血圧の早期診断やプロバイオティクス、プレバイオティクスによる治療介入を行うことで、日本の国民病ともいべき高血圧の新しい診療アプローチに繋がり、最終的には、心血管イベントを抑制し現代人の健康寿命の延伸に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Hypertension causes stroke, heart disease, and kidney disease. Hypertension is classified into two groups: salt-sensitive hypertension, in which blood pressure improves with salt reduction, and salt-resistant hypertension, in which blood pressure does not. We compared the composition of the gut microbiota and the prevalence of hypertension in 242 general residents, and found that the prevalence of hypertension in the group of patients with gut microbiota low in Bifidobacterium was similar to that in the group with high salt intake, even with low salt intake. In particular, there was a strong tendency to be associated with B. bifidum and B. breve, and steroid metabolomics analysis suggested involvement with some mineralocorticoids. To further elucidate the mechanism of salt-sensitive hypertension, we plan to conduct additional metagenomic analysis and transplantation experiments into animal models.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：ステロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の約 25%が心疾患と脳血管障害を合わせた心血管病である。致死的な心血管病予防のために、我が国においては、糖尿病、高血圧、高脂血症といった生活習慣病の早期発見、介入を目的に健康診断システムが発展してきた。その結果、我が国においては、寿命は世界トップ水準であるが、今後、超高齢化社会を迎え、健康寿命の延伸こそが最重要課題である。そのため、生活習慣病の予防のための新たな健康診断システムや先制医療の確立が重要であり、ゲノミクスならびにメタボロミクスの技術の応用が注目されている。

我々は、志賀町研究において、一般住民を対象にステロイドホルモンの1種であるアルドステロンの過剰産生と高血圧の発症の関係について報告した (*Clin Exp Hypertens*. 2018; 40:118-125)。その結果、臨床的に高血圧を認めない健康な対象においても、アルドステロン過剰産生を示す症例 (Subclinical Primary Aldosteronism) が存在し、経過で高血圧が顕在化することが明らかとなった。これは、未病の状態でもバイオマーカーとなるホルモンにより将来的な患者を早期に抽出し介入が可能であることを示している。

ステロイドホルモンは副腎、精巣、卵巣から分泌される重要なメディエーターである。ステロイドでは、糖質、脂質、蛋白代謝の代謝調節を司る糖質コルチコイド、腎臓でのナトリウムイオンの再吸収を促す鉱質コルチコイド、性腺ステロイドに分類され、生体内では 18 種類以上のステロイド代謝産物を合成される (図 1)。それらの合成は、コレステロールを基質としてステロイド合成酵素により調節され、ステロイド受容体に作用し、糖尿病、高血圧といった生活習慣病、心血管疾患の発症や進展に密接な関係があると報告されている。研究代表者は、富山県立大学工学部との共同研究によって、高感度液体クロマトグラフィー (LC) とフーリエ変換型質量分析計 (FTMS) を組み合わせた LC-FTMS を用いて、10 μ L の血清検体から網羅的ステロイドホルモンの高感度分析、測定を確立とした。誘導体化試薬のジラルール試薬でステロイドのカルボニル基を誘導体化し検出感度を増加させ、10pg/mL 以下の検出限界の低濃度測定も可能となった (図 2)。

生体内では、副腎、性腺、脂肪細胞からの合成、分泌された多種多様なステロイドホルモン作用が互いにフィードバックを掛け合いながら生体恒常性を維持するように努め、その調整機構の破綻が生活習慣病、心血管病への発症、進展に関与しているものと考えられる。しかし、高血圧、糖尿病、脂質異常症などの発症にステロイドパスウェイがどのように恒常性の破綻を引き起こし、心血管病のリスクである生活習慣病の病態を形成するのかは未だ不明のままである。

2. 研究の目的

志賀町研究の 5 年の経過で採取された一般住民の採血検体、尿検体、糞便検体を用いて、生活習慣病に関わるバイオマーカーステロイド、腸内細菌を探索し同定することが目標である。生活習慣病発症を予測するバイオマーカーステロイドは、未病段階の一般住民の中から将来的に生活習慣病に罹病しやすい対象を早期発見し、適切な治療や指導を効率よく行うことができる。また、そのステロイドを合成に関与する遺伝子、ステロイド合成酵素阻害や促進が生活習慣病の新たな創薬のターゲットとなる可能性が高い。ステロイドメタボロミクス解析と腸内細菌の構成比といった膨大な臨床情報は、機械学習による解析を行い、未病の段階で少量の検体からホルモン異常を指摘する先制医療モデルを形成し、健康寿命を延伸することが本研究の目標である。

3. 研究の方法

2017年度の志賀町スーパー予防医学健診に参加し糞便サンプルを入手できた239名。糞便から細菌DNAを抽出し、アダプター付きプライマーで16S rRNA配列(V3V4領域)を増幅し、次世代シーケンサー(MiSeq)により遺伝子配列を決定データベースと照合し細菌種とその存在比率を推定した。血漿アルドステロン濃度、レニン活性は、それぞれ、RIA法、EIA法を用いて測定された。ステロイドメタボロミクス解析は、LC-FTMSにて測定された。推定食塩摂取量は、随時尿を用いた24時間尿ナトリウム排泄量の推定式より換算された。

4. 研究成果

被検者の群分け、臨床背景

降圧薬の内服中である74名を除外し、165名の腸内細菌叢データを用いて検討を行った。全165検体を平均血圧および1日食塩摂取量の2軸による散布図で示し散布図回帰線付近の検体を食塩至適反応群(n=30)とし、それ以外を散布図回帰線からの距離および全239名1日食塩摂取量中央値(g/日)に基づき4群化した(それぞれ低食塩低血圧群(n=29)、低食塩高血圧群(n=30)、高食塩低血圧群(n=30)、高食塩高血圧群(n=30))。以上の5群に属さない検体はその他として示す。平均血圧および1日食塩摂取量により分類された5群において、収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧は、低血圧群と高血圧群の間で有意差が認められた($P<0.01$)。1日食塩摂取量は、低食塩摂取群と高塩分摂取群の間で有意差が認められた($P<0.01$)。年齢、女性比率、BMIは5群間で有意差は認められなかった。

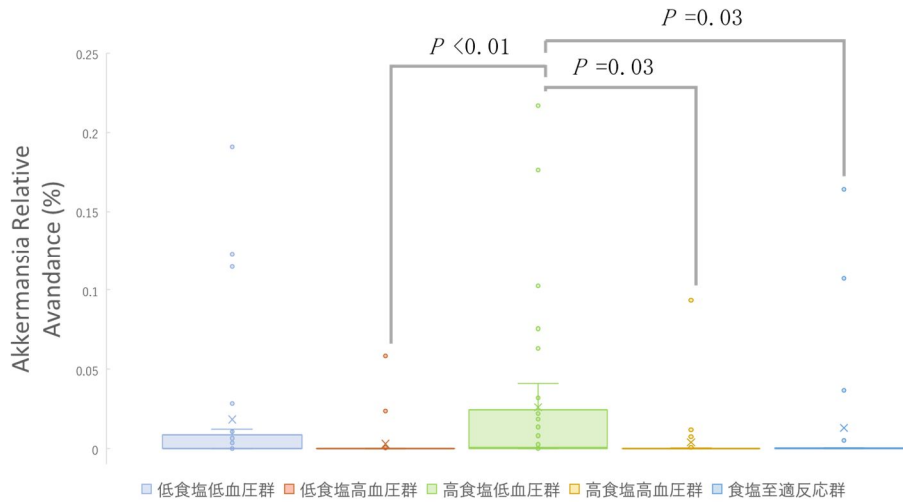
5群における *Akkermansia* 存在比の差

糞便中の細菌叢解析によって得られた全検診者の細菌属平均存在比率(上位15細菌属)を表2に示す。これらの細菌属存在比率を先に示した5群で比較した。比較には共分散分析(ANCOVA)および多重比較検定(TukeyHSD)を用い、調整因子は年齢、性別、BMIとした。平均存在比率9位の *Akkermansia* 属において、高食塩低血圧群での存在比率が低食塩高血圧群($P<0.01$)、高食塩高血圧群($P=0.03$)、食塩至適反応群($P=0.03$)と比較し有意に低値であった(図2)。一方、低食塩低血圧群との有意差は認められなかった($P=0.67$)。

表1. 全検診車の細菌属平均存在比率(上位15細菌属)

細菌属名	平均存在比率, %
<i>Bacteroides</i>	16.93
<i>Faecalibacterium</i>	11.53
<i>Blautia</i>	9.14
<i>Bifidobacterium</i>	7.09
<i>Streptococcus</i>	3.40
<i>Escherichia-Shigella</i>	3.01
<i>Eubacterium rectale group</i>	2.56
<i>Subdoligranulum</i>	2.41
<i>Akkermansia</i>	1.94
<i>Fusicatenibacter</i>	1.90
<i>Klebsiella</i>	1.75
<i>Prevotella 9</i>	1.71
<i>Lachnoclostridium</i>	1.51
<i>Parabacteroides</i>	1.49
<i>Eubacterium hallii group</i>	1.43

図2 . *Akkermansia* 属の5群における存在比率



ショットガンメタゲノム解析

今後予定している全サンプルのショットガンメタゲノム解析に先立ち、*Akkermansia* 属の存在比率に有意差が認められた高食塩低血圧群と高食塩高血圧群からそれぞれ1検体抽出し、計2検体のショットガンメタゲノム解析を行った。

高食塩低血圧対象 A は、1日の推定食塩摂取量 10.8g/日、高食塩高血圧対象 B の1日の推定食塩摂取量 10.9g/日であった。2検体の細菌叢構成を図3に示す。低食塩高血圧では、プロテオバクテリア門(紫)の割合が多く、高食塩高血圧対象では、プロテオバクテリア門の割合が非常に少なく、赤で示されたファーミキュテス門の割合が多い。細菌叢構成で最も存在比率が大きい細菌種は、症例 A では *Klebsiella pneumoniae* の 33%であるのに対し、症例 B では *Bacteroides uniformis* の 14%であった。

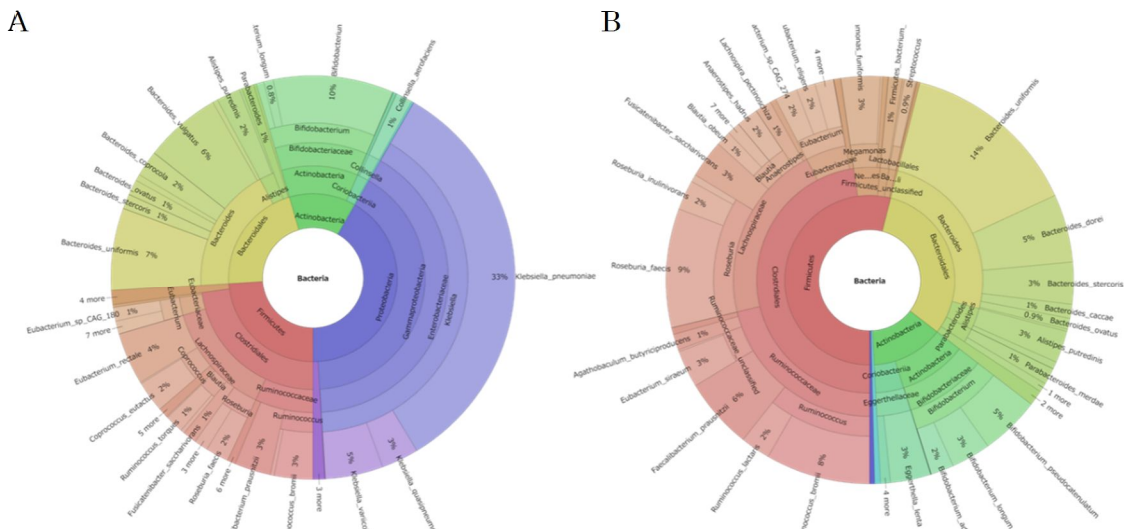


図3. ショットガンメタゲノム解析を実施した2検体の細菌叢構成. A: 高食塩低血圧対象、B: 高食塩高血圧対象.

【考察】

前回の一般住民調査の結果では、腸内細菌叢から、低食塩摂取群でも高食塩群と同等の高血圧有病率を示す群が存在することを示した。今回は、高血圧と塩分によって分けた患者群で、特定の細菌種の存在比率について検討し、平均存在比率が9位と高い *Akkermansia* 属に注目した。 *Akkermansia* 属の存在比率は、高食塩低血圧群では、低食塩高血圧群、高食

塩高血圧群，食塩至適反応群と比較し有意に低値であった。特に高食塩摂取しても，*Akkermansia* 属細菌の存在によって、個人の血圧反応に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。

Liらは、健常対照者 41 名、プレ高血圧症患者 56 名、高血圧症患者 99 名のコホートを対象に、メタゲノム解析およびメタボローム解析を行い、高血圧群が健常群より *Akkermansia* 属の存在比が少ないことを報告した(2)。逆にブラジル人集団においては、高血圧患者の主な特徴は、*Akkermansia* の割合が増加していること、酪酸産生細菌の相対的な豊富さが減少していることを報告した(3)。高血圧発症の機序には、*Akkermansia* 属の構成比以外に人種や食塩摂取量などの要素も関連があるのかもしれない。

また、*Akkermansia* 属の一種である *Akkermansia muciniphila* は、ムチン分解と腸管バリアの完全性に重要な役割を持つ。低温殺菌された *A. muciniphila* サプリメントを過体重/肥満のインスリン抵抗性ボランティアを投与した無作為化二重盲検プラセボ対照パイロット試験では、*A. muciniphila* サプリメント投与群でインスリン感受性が改善し、インスリン血症および血漿中総コレステロールを減少させた(4)。本研究では、血圧の変化について評価されていないが、*A. muciniphila* の補給がいくつかの代謝パラメータを改善することを示された。既報のデータからも、*Akkermansia* 属とその細菌種やその代謝産物が、生活習慣病や高血圧に関連している可能性が高いと考えられる。

従来の 16SrRNA (V3V4 領域)菌叢解析では細菌属までの同定であったが、ショットガンメタゲノム解析では細菌種、株まで同定可能である。今後、ショットガンメタゲノム解析の検体数を増やすことにより、食塩摂取量と血圧に関わる細菌種を特定する。

Akkermansia 属を含めた細菌種 X を食塩感受性動物モデルへ移植し、短鎖脂肪酸、アミノ酸やステロイドホルモンの網羅的な測定を行い、また腎組織の炎症細胞浸潤を免疫組織学的に半定量式腎硬化インデックスなどを用いて評価し、腎障害への影響を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagase S, Karashima S, Tsujiguchi H, Tsuboi H, Miyagi S, Kometani M, Aono D, Higashitani T, Demura M, Sakakibara H, Yoshida A, Hara A, Nakamura H, Takeda Y, Nambo H, Yoneda T, Okamoto S.	4. 巻 7
2. 論文標題 Impact of Gut Microbiome on Hypertensive Patients With Low-Salt Intake: Shika Study Results	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Med (Lausanne) .	6. 最初と最後の頁 475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2020.00475.	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 唐島成宙、米谷充弘、武田仁勇、米田隆
2. 発表標題 一般住民における腸内細菌叢の構成と塩分摂取量が高血圧有病率に及ぼす影響
3. 学会等名 第8回臨床高血圧フォーラム
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 唐島成宙、武田仁勇
2. 発表標題 腸内細菌叢の構成と塩分摂取量が高血圧有病率に及ぼす影響
3. 学会等名 第140回日本循環器学会北陸地方会
4. 発表年 2020年～2021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
---------	---------