

博士論文

サンプル保存条件、食事、腸内細菌叢が 哺乳類メタボローム解析に及ぼす影響

2019年1月

守谷 岳郎

目次

略語

序章

- 第一節 メタボロームにおける外的因子の影響
- 第二節 臨床研究におけるメタボローム解析
- 第三節 腸内細菌研究におけるメタボローム解析
- 第四節 研究の目的

第一章 保存条件が血漿代謝物に及ぼす影響の解析

- 第一節 序
- 第二節 材料および方法
- 第三節 結果
- 第四節 考察
- 第五節 図表

第二章 食事の影響の解析；日本人健常者での検討

- 第一節 序
- 第二節 材料および方法
- 第三節 結果
- 第四節 考察
- 第五節 図表

第三章 腸内細菌が宿主代謝に及ぼす影響の解析

- 第一節 序
- 第二節 材料および方法
- 第三節 結果
- 第四節 考察
- 第五節 図表

第四章 総括と今後の展望

引用文献

謝辞

略語

AHR; Aryl hydrocarbon receptor
BHB; beta-hydroxybutyrate
BMI; Body mass index
BSTFA; *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
BV; Bioventure
CE; Capillary electrophoresis
CoA; Coenzyme A
Cys-Gly; Cysteinylglycine
DiHODE; Dihydroxyoctadecadienoate
EDTA; Ethylenediaminetetraacetic acid
eGFR; Estimate glomerular filtration rate
EI; Electron ionization
EPA; Eicosapentaenoic acid
ESI; Electron spray ionization
FAAH; Fatty acid amide hydrolase
FDR; False discovery rate
FGF15; Fibroblast growth factor 15
FXR; Farnesoid X receptor
GC-MS; Gas chromatography mass spectrometry
GF; Germ-free
GPC; Glycerophosphatidylcholine
HbA1c; Hemoglobin A1c
HCL-C; High density lipoprotein-cholesterol
HILIC; Hydrophilic interaction liquid chromatography
HMDB; Human metabolome database
HODE; Hydroxyoctadecadienoate
HOMA-IR; Homeostasis model assessment of insulin resistance
HPLC; High performance liquid chromatography
IL-18; Interleukin 18
KEGG; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LCFA; Long chain fatty acid
LC-MS/MS; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LDL-C; Low density lipoprotein-cholesterol
LPC; Lysophosphatidylcholine

LPE; Lysophosphatidylethanolamine
MAG; Monoacylglycerol
NAPE; N-Acylphosphatidylethanolamide
NIST; National Institute of Standards and Technology
NMR; Nuclear magnetic resonance
OTU; Operational taxonomical unit
PC; Phosphatidylcholine
PCR; Polymerase chain reaction
PE; Phosphatidylethanolamine
PFPA; Pentafluoropropionic acid
QA; Quality assurance
QIIME; Quantitative Insights Into Microbial Ecology
RNase; Ribonuclease
ROS; Reactive oxygen species
SOP; Standard operating procedures
SPF; Specific pathogen free
SM; Sphingomyelin
SNPs; Single nucleotide polymorphisms
TAG; Triacylglycerol
TCA; Tricarboxylic acid
TMA; Trimethylamine
TMAO; Trimethylamine oxide
TRP; Transient receptor potential
UPLC; Ultra performance liquid chromatography

序章

第一節 メタボロームにおける外的因子の影響

親から受け継いだ染色体 DNA 配列に基づいて mRNA が発現し、タンパク質に翻訳され、酵素の働きによって様々な低分子代謝物が作り出される。遺伝情報に基づいて発現したタンパク質は酵素、受容体、転写因子、トランスポーター、あるいは分泌タンパク質として細胞の内外で機能を発揮する。主に酵素反応を経て生成する低分子代謝物もまた細胞内だけでなく細胞外に放出され機能する。哺乳類では血流で運搬されて近位/遠位の臓器で蓄積あるいは代謝されて細胞の構成成分となり機能を発揮する。また低分子代謝物は、細胞に発現している G タンパク質共役型受容体、核内受容体のリガンド、あるいはセカンドメッセンジャーや神経伝達物質として働き、生命現象を引き起こす。遺伝子そのものは機能体ではなく、タンパク質や低分子代謝物が機能を発揮して生命現象を規定するが、SNPs に代表される遺伝子配列の違いによってタンパク質の量や活性、低分子代謝物の量が支配され、個体の違いが生み出される (1)。

生体内に存在する糖質、有機酸、脂質、アミノ酸、核酸、無機物質 (硫酸等) を含めた低分子代謝物をメタボロームと総称する。KEGG などの代謝マップで全体像が表現され、短い DNA/RNA やペプチドも含めた分子量 1,000 未満の化合物群になる。タンパク質を分析する技術として質量分析計を用いたプロテオーム解析技術が開発されるのに従って、より構造が単純で分析し易い低分子代謝物について NMR や質量分析計を用いて一度に大量のデータを取得できることから上記メタボロームの概念が定義付けられた (2)。メタボローム解析では多様な物性を有する化合物を対象とするため、複数の LC-MS/MS 法や GC-MS 法を組み合わせることによって広範囲な代謝物をカバーしている。

メタボロームに含まれる低分子代謝物は DNA や mRNA よりも表現型に近い分子変動を表す。例えば神経伝達物質は中枢機能を直接反映して増減し、解糖系や TCA 回路の糖代謝物、脂肪酸合成や β 酸化などの脂質代謝物は臓器のエネルギー産生機能に従って変動する。こうした鍵分子については生命現象のメカニズムを解明するために HPLC 法など様々な分析系が開発されてきた。メタボローム解析はそれらのデータを一度にまとめて取得できるため、表現型を与えるメカニズムを探索する際に頻繁に用いられる (3)。探索的なメタボローム解析によって鍵代謝物の候補を見出し、分析対象分子を限定して検証的に精密分析する手法はメカニズムの解明に効果的である。このため病態形成、改善などの表現型がどうして表れるかを明らかにするために、患者と健常人、野生型動物と変異型動物、あるいは薬剤投与群と非投与群をメタボローム解析で比較することが盛んに行われている (4)。

表現型に近い特性から、内在性低分子代謝物はヒトの病態診断あるいは薬効予測、さらには患者層別化のためのバイオマーカーとしても有望視されている (5)。血漿中グルコース、コレステロール、トリグリセリドは生活習慣病を診断するマーカーとして、また血漿中クレアチニンは腎機能、さらに尿中クレアチンは筋機能を推定するマーカーとして確立さ

れており、以前から低分子代謝物が利用されていることがわかる。現代の医療においては病気の診断だけでなく治療法選択、薬効予測など、様々な目的のためにバイオマーカーのニーズが高まっており、その探索や検証を目的とした臨床サンプルのメタボローム解析は世界的に注力されている (6)。

生体のメタボロームの多くは酵素によって形成されるため、基本的にはゲノムの支配を受けている。しかしながら哺乳類は食物を摂取し、その消化産物を吸収するために、メタボロームは食物の影響を大きく受ける。また腸内細菌が食物成分を利用して多様な低分子代謝物を生産し、宿主のメタボロームに影響を与える。つまり、哺乳類メタボロームはゲノムで規定される宿主酵素の反応生成物以外に、食物消化物、加えて腸内細菌由来代謝物を含んでいる。ゲノム (染色体 DNA)、トランスクリプトーム (mRNA)、あるいはプロテオーム (タンパク質) は宿主細胞の状態を反映して増減するのに対して、メタボロームはさらに宿主細胞外の食事成分や腸内細菌の生産物が含まれることは大きな違いと言える。しかし同じ遺伝子を有する双子でも異なる体形を有し、別の病気に罹患することは珍しくなく、生体は環境の影響を強く受けている。高脂肪食は肥満やインスリン抵抗性を引き起こし (7)、プロバイオティクスやプレバイオティクスは健康に大きく寄与することから、食物や腸内細菌叢が宿主生理に深くかかわることがわかる (8)。食事や腸内細菌は環境因子の一つであり、その影響を受けて変動するメタボロームを理解することは、環境因子が生体機能に影響を与えるメカニズムの理解に繋がる。

血漿メタボロームは腸管から吸収された食物消化物の影響を短期的に強く受けて増減する (9)。ヒトは特別な場合を除いて空腹⇒摂食のサイクルを日単位で繰り返すため短期的な食物の影響は明暗周期や睡眠も含めた日内変動の一部として表れる。mRNA やタンパク質も日内変動するものがあるが、これらは生体側の反応である。これに対してメタボロームはこうした生体反応に加えて食物消化物の影響を直接的に受けるので遥かに変動が大きい。従ってメタボローム解析、あるいは特定の低分子代謝物の分析結果はサンプリングタイミングの影響を強く受ける。一方、生体試料中の低分子代謝物はサンプリング中とサンプリング後においても様々な外的因子の影響を受けている (10)。例えば採血時に血球を壊して溶血を起こすこと等で変動するものがあり、また保存状態によって受ける影響もある。メタボロームの分析対象分子は多種多様であり、酸化・還元などの化学反応を受け易いものもあれば、検体内の酵素によって分解を受け易いものもある。我々が取得した分析値には生体の内外から受ける影響を含んでいる。

第二節 臨床研究におけるメタボローム解析

医薬品の処方を初めとする医療行為はヒトを対象として開発されるが、その効果や副作用を評価する際に、通常はまず動物を用いて試される。例えば創薬のプロセスではヒトでの

効果を検討する前に重厚な動物試験によって薬効と毒性を調べる。しかし一方で、病態モデル動物が完全にヒトの疾患を反映することは難しく、ヒトと反応性が異なるリスクを避けられない。膨大な動物試験の後に臨床試験が行われた結果、ヒトで効果が無い、副作用が出るなどで開発が中止になると、それまでに払われた多くの労力が無駄になり経済的な損失が大きい。モデル動物を用いた評価の限界について議論が高まっており、直接ヒト検体を分析して病態を理解することや、医療行為の効果を早期にヒトで確認することに薬剤開発の力点が置かれている。同じ遺伝的背景を持ち、単一施設で繁殖した動物と違って、ヒトは先天的・後天的要因が多様でバラツキが大きいことから、結論を出すには困難を伴うことも多い。しかし、逆に個人差を利用して疾患パラメーターと相関する代謝物を見出し、病態機序の解明やバイオマーカーの発見に繋げる試みも盛んに行われている (11)。

臨床上で使えるバイオマーカー探索を目的に、ヒトの血液、糞、尿、唾液、脳脊髄液などを用いたメタボローム解析例が増加している。2017 年末の総説(12)では論文数が約 1,600 に上り、糖、有機酸、アミノ酸、脂質など多種多様なバイオマーカー候補が見出されている。大規模なコホート試験例として健常時に採取した 1,000 以上の血清サンプルをメタボローム解析し、その後の心不全発症との相関を調べたスウェーデンの試験がある (13)。バリデーション試験も経て最終的に 4 種の脂質 (LPC18:1、LPC18:2、MAG18:2、および SM28:1) が発症予測マーカーとして提案されている。

バイオバンク等のプロジェクトにおいて血漿や尿などヒト生体試料が多施設で長い年月をかけて収集されている。こうした大規模サンプルの分析結果は後の病態発症情報と合わせて疾患予測マーカーの探索に使われる大変貴重なものである。しかし大きな問題点として、多施設サンプリングの場合には採取や保存条件の厳密なコントロールは非常に難しいことが挙げられる (14)。血漿を調製、保存する際に必要な遠心機やディープフリーザーが、すべての施設で整っておらず、施設によっては分析時にメタボロームが生体内の状態から変動してしまっていることが頻繁に起こる。また実験動物と異なりヒトは個々の行動に制限を設けることに限界があり、過去の試験においてサンプリングタイミングが統一されていないものが多い (15)。比較する意味が無いデータが含まれているために、総合的に統計解析しても間違った解釈を導きかねない。こうしたサンプルから意義ある試験結果を導き出すには、サンプルを取捨選択して分析する、あるいはすべてを分析して信頼性のあるデータのみを取り扱うなど、統計解析の精度を上げることが重要である。また、臨床サンプルを用いて特定代謝物を精密定量する場合には目的に合った検体採取や保存のプロトコルを規定し、採取する施設に提示しなければならない。

治療方針を決めるための診断マーカーや、治療効果を予測する薬効マーカーは日内変動による影響が少ないものが望ましい。例えば、血糖低下薬の処方や薬効を判断するために使われるバイオマーカーとして、食後に増加する血漿中グルコースよりも食事等の影響が少ない HbA1c が重要視される (16)。数分、あるいは数時間単位でバイオマーカーの経時変化を追跡する場合には特に日内変動の影響に注意を払う必要がある。代表例として代謝酵

素阻害薬の治験早期（フェーズ 1 など）において、標的酵素の上流や下流の代謝物を測定し、標的に対する作用を確認するターゲットエンゲージメントマーカーの分析が挙げられる。投薬後経時的に採取した血漿を分析して用量依存性を評価し、薬効試験（フェーズ 2 や 3）の投薬量を定める。このため大変重要な指標になり、経時変化を正確に追跡しなければならないので日内変動が少ないマーカーが求められる（15）。従って代謝物の日内変動に関する情報を多く集め、最適なバイオマーカーを選択することは、治験や臨床研究で成果を収める鍵となる。

薬の臨床試験の成否は経済的、あるいは社会的なインパクトが大きく、分析データの正確性は常に議論に上がる。重要な判断に使われるバイオマーカー分析では、被験者の選択基準、サンプリング条件から前処理、分析法に至るまで非常に厳密に試験方法が SOP として規定される。臨床研究においては、代謝物に固有の日内変動や保存安定性の情報を多く集め、それに基づいて試験プロトコルを定義する必要性がより一層高くなる。

第三節 腸内細菌研究におけるメタボローム解析

次世代シーケンサーによる細菌のポピュレーション解析が発達するのに従って、マイクロバイオーム研究が飛躍的に発展した。土壌や皮膚など様々な部位の細菌叢が解析されているが、腸内細菌叢への注目度が高い。再発性（難治性）クロストリディウム・ディフィシル感染症患者に健常人の腸内細菌を移植（糞便移植）することによって、90%以上の寛解率を達成したことは腸内細菌叢の制御を様々な疾患に対する治療オプションと考える大きなきっかけとなった（17）。現在、炎症性大腸炎を初めとした他の疾患において健常人の糞便移植の臨床試験が行われている（18,19）。また肥満やパーキンソン病、炎症性大腸炎の患者便を無菌マウスに投与することによって病態を呈することから、腸内細菌が疾患の原因になり、その改善が治癒に繋がることが直接的に示されている（20-22）。その他にも疾患のパラメーターと相関することが見出された特定の菌株を無菌マウスへ投与することによって疾患が悪化、あるいは改善することが報告されている（23）。さらに腸内細菌叢は薬効の個人差を判定する層別化マーカーとしての有用性にも注目が集まっている。癌免疫薬剤の投与効果の個人差が癌患者の糞便を移植したノトバイオートマウスにおいて再現される結果が報告された（24, 25）。癌免疫療法は特定の患者に対して大きな効果を発揮するが、一部の患者には副作用が出てしまうのが現状である。しかし、その効果が腸内細菌叢で決まるのであれば、効かない患者に対しても便移植によって効く可能性が生まれる。

こうした研究から創出される薬剤として、上記糞便移植用の便サンプルそのものが検討されているが、倫理面、心理面、および品質管理面での問題が指摘されている（26）。このため単一の善玉菌薬剤や（27）、特定菌種のカクテル剤が検討されている（28）。興味深いアイデアとして治療効果を有する物質を産生する遺伝子組換え細菌製剤が挙げられる（29）。

NAPE アシルトランスフェラーゼ発現プラスミドを導入した組換え大腸菌をマウスに投与して腸内に定着させることによって、食物由来脂質から摂食抑制作用を有する NAPE を持続的に産生させ、大きな抗肥満作用が得られた (30)。経口投与によって微生物を腸内に静着させることができれば、少ない投与回数で持続的な効果が期待できる。AnaeroPharma (信州大から設立された BV) は、オプジーボを産生するように遺伝子改変したビフィズス菌をマウス担癌モデルに静脈注射すると、嫌気レベルが高い癌組織に集積し抗癌作用を発揮することを報告した (31)。その臨床試験のために世界的なファンドである Seventure Partners が \$13M という巨額な投資をしている。日本ではまだこうした BV に対する投資活動は少ないが、大手ファンドによる BV 支援というビジネスモデルが確立している欧米では様々なマイクロバイオームベンチャーが軌道に乗っている。治療法開発に有用な現象の発見や魅力的なモダリティの確立によって巨額の投資を受けられる環境が整っており、こうした好循環の中で様々なアイデアが実現している。

腸内細菌が宿主の健康維持に寄与し、その乱れが疾患の原因となることが明らかになる一方で、作用メカニズムに関しても鋭意検討されている。その中で最も威力を発揮するのが内在性低分子代謝物の解析である (32)。腸内細菌は宿主が摂取した食物を利用して固有の代謝経路により多彩な低分子代謝物を生産している。彼らは低分子代謝物を介して宿主腸管内の生理機能、特に代謝や免疫バリア機構に直接的に影響を与える (33)。例えば二次胆汁酸が消化管のセロトニン分泌を介して蠕動運動を制御する (34)。トリプトファン代謝物が AHR を介して炎症性大腸炎の形成に寄与することが複数の研究室から示されている (35)。こうした現象が数多く報告されたことから、メタゲノム解析と同時に糞便や血漿のメタボローム解析を合わせて実施し、統計的に相関する菌種や代謝物を同定する試みが行われるようになった。そうしたアプローチの成果として大腸炎モデルマウスと正常マウスの盲腸メタボローム解析によって、特定の腸内細菌が作るタウリンが腸管における IL-18 産生を介して病態の改善を認めたという研究結果がある (36)。

腸内細菌が宿主に与える影響は腸管内に留まらない。宿主は摂取した食物の消化産物を栄養素として吸収すると同時に、腸内細菌が産生した低分子代謝物を吸収する。これらの代謝物は血流を介して様々な臓器に運搬され一部は蓄積し、また一部は体外に排泄され、宿主の健康状態や病態形成に影響する (37)。肥満者の糞便を無菌マウスに投与すると肥満を発症することから、この肥満マウスの盲腸内容物を用いてメタボローム解析と 16S rRNA 解析を行い、相関因子を抽出した結果、特定菌種が生産する胆汁酸が肝臓 FXR を介して FGF15 発現を促し体重低下作用を発揮することが報告された (20)。自閉症モデル動物の血清メタボローム解析により、腸内細菌酵素と肝酵素によって生成する 4-エチルフェニル硫酸が病態形成の原因となることが示された (38)。204 人の血清メタボローム解析を行い eGFR と相関する代謝物の探索を行った結果、やはり腸内細菌酵素と肝酵素を介して作られる 3-インドキシル硫酸が非常に強い負の相関を示した (39)。3-インドキシル硫酸が腎不全の原因となることが証明されて現在はレセプターアンタゴニストや合成酵素阻害をコンセプトと

した創薬が検討されている (40)。食物中 PC の消化物から腸内細菌酵素の働きによって作られる TMAO の血中レベルは、心不全患者の予後と非常によく相関する (41)。さらに動物モデルを用いた試験結果から腸内細菌内の TMA 合成酵素が心不全治療薬の標的となる可能性が示唆されている (42)。

腸内細菌は低分子代謝物を介して宿主全身に影響を与えることから、特定の菌株や菌叢が疾患に与えるメカニズムを解明する上で、メタボローム解析あるいは特定代謝物の定量分析は大きな威力を発揮する。これまで述べてきたように、メタボロームは宿主そのものが産生する物質だけではなく食物由来成分、さらには腸内細菌によって変換された代謝物を含んでいる。さらに、宿主-腸内細菌叢の相互作用によって引き起こされる宿主自身の生理反応が代謝物に反映される。そのため腸内細菌がどんな特異的代謝物を産生するか、彼らの影響が宿主のどこでどの代謝物に大きく表れるかという情報は、宿主-腸内細菌叢の相互作用メカニズムを理解するベースとなる。また、そのメカニズムを解明することで腸内細菌の酵素を阻害する薬剤や遺伝子組み換え微生物製剤を始めとした様々な創薬アプローチが可能となる。

第四節 研究の目的

これまで述べてきたように内在性低分子代謝物の分析 (メタボローム解析、および特定代謝物の精密定量) は臨床研究、あるいは腸内細菌研究における利用価値に期待が高まっている。しかし、冒頭で述べたように哺乳類の内在性低分子代謝物は食事や腸内細菌など生体外の影響、さらには生体から検体として取り出した後のハンドリングプロセスの影響を強く受ける。内在性代謝物の分析で特に重要なポイントは以下にまとめられ、それぞれにおいてこれらの影響をよく考慮しなければならない。

- ① 適切な試験プロトコルの規定
- ② 正確なデータの取得
- ③ 得られたデータの適切な解釈

個体差が大きいヒトサンプルを扱う臨床研究で内在性低分子代謝物を分析する場合には、①では特に被験者の選択、サンプリング条件の規定に重要性が高い。極端な異常値は有意差検定に影響し、統計解析に偏りが生まれる。異常値が予想される被験者を避けるために、年齢や性別、薬の服用歴、生活習慣などについて選択/除外基準を設定して被験者を募集する。そうした個人差に関わる因子が分析対象物質レベルに及ぼす影響がわかっているならば、より適切な被験者の選択が可能になる。またサンプリング条件の中で日内変動の影響を考慮して検体取得タイミングを規定することが大切である。明暗周期、睡眠、食事が個々の代謝物に与

える影響がわかっているならば、適切なサンプリングタイミングを決めることができる。

②の正確なデータを取得するためには適切な分析法の設定が重要なことは言うまでもない。治験においてバイオマーカー測定に用いられる分析法は決まったバリデーションをクリアすることが求められる。先に述べたようにメタボロームは多様な物性を有する分子で構成されており、保存中に分解などの影響を受けやすいものを多く含む。多施設で検体を採取する臨床研究では設備が整っていない施設が含まれるために特にこの点に留意しなければならない。個々の代謝物における保存温度の影響が予めわかっているならば、目的に応じて適切に条件を規定することができる。また既に取得したサンプルを分析する際に、分析対象物の保存安定性データに基づいて分解などの影響を受けていないサンプルを選んで分析する、あるいは分解の影響を受けていない分析値を選んで統計解析を行う必要がある。そのためには、各代謝物が保存条件によって受ける影響について、できるだけ多くの情報を有していることが前提となる。

内在性代謝物は生体の酵素反応だけを反映しているのではなく、食事や腸内細菌の影響を含んでいる。食物消化物や腸内細菌が生産した代謝物が腸管から吸収されて血液中に入り、様々な臓器に運ばれ、血液だけでなく臓器中の代謝物レベルに影響する。宿主が食事や腸内細菌に対して様々な反応を起こし各代謝物レベルに影響する。患者/健常人の比較のためにメタボローム解析を行い、何らかの代謝物の違いが認められた場合、その生理的意義を解釈し次の研究の方向性を決めていくことになる。変動を認めた代謝物に食事や腸内細菌の影響がどの程度あるかを知っていれば、腸内細菌叢や食事を是正することで病態改善の可能性を考えるなど、研究方針に重要な視点を与えることができる。

サンプル保存条件、食事、腸内細菌といった外的因子がメタボロームに与える影響を理解する重要性が世界的に認識された。それを受けて個々の因子の影響を意図的に加えたサンプルを調製してメタボローム解析を行った研究結果が 2010 年前後から報告され始めた (9, 43, 44)。室温や 4°C で保存した血漿サンプルを分析することによって保存条件の影響が調べられ、食事前後に採取した血漿サンプルの比較から食事の影響が調べられた。また腸内細菌の影響を調べるためには無菌動物と通常条件で飼育された動物、あるいは後天的に腸内細菌を移植して脱無菌化した動物との違いが調べられた。最初は NMR による分析結果が主体であり、同定された変動代謝物は数 10 程度であった。その後、質量分析計の導入により同定代謝物数が増加したが、多くても検出された総代謝物数が 250 程度に留まり、生体中で存在量が多い脂質やアミノ酸の情報が主体であった (45-47)。

現代のメタボロームで用いられる質量分析計は小数点 2 桁単位まで m/z の区別が可能な分解能を有する。加えてスキャンやフラグメント解析のスピードが飛躍的に向上した (48)。質量分析計の性能向上に伴って代謝物フラグメントのデータベースが日進月歩で充実し、低分子代謝物の同定効率が飛躍的に向上した。こうした質量分析計の高性能化に加えて、メタボロームの多様な物性をカバーするために LC、GC、あるいは CE のクロマトグラフィの適切な組み合わせが世界中で進められた。分析技術の進歩によって最先端の研究機関で

は約 1,000 種類の代謝物データを一度に取得できるまでになり、代謝物種に偏りなくデータが得られるまでに整備された (49)。これに伴いバイオマーカー候補分子やメカニズムを表す分子も多様なものが見出されているために、外的因子の影響に関する先行研究の分析結果では不十分である。そこで本研究では最先端のメタボローム技術を用いて約 1,000 代謝物について情報を集積した。数を増やすだけでなく、変動しなかった周辺代謝物 (構造類縁体や同一代謝パスウェイ分子) との比較により変動メカニズムを推定した。

本研究ではメタボローム解析の利用価値が高い臨床研究と腸内細菌研究での重要度を考慮して、保存条件 (温度と時間)、日本の臨床研究を考慮した食事、さらに腸内細菌という 3 つの外的因子を取り上げてその影響を検討した。保存条件の影響を調べるために血漿を室温、4°C、-30°C で保存し、ほぼ全代謝物が安定と考えられる -80°C 保存時と比較した。食事の影響は遺伝的背景、習慣、食事内容による違いが大きく個人差が出るが、過去に報告された試験は欧米で実施されたもので日本における臨床研究に有用な情報となっていない。そこで日本人が日本食を摂取した際に食事前後に採取した血漿のメタボローム解析を行い、食後変動のデータを集積した。さらに腸内細菌の有無を比較するために、無菌マウス (GF) に同系統 SPF マウスの腸内細菌叢を移植することによって脱無菌化したマウス (ExGF) を樹立し、GF と ExGF の比較を行った。人では採取が難しい組織や腸管内容物も対象サンプルに含め、部位による違いを精査することで宿主機能に与える影響を推定した。

第一章

保存条件が血漿代謝物に及ぼす影響の解析

第一節 序

序章で述べたように臨床検体は多施設で採取することが多いために、厳密に規定された条件で採取や保存が行われていないないケースが頻発する。また多数のサンプルを同レベルの熟練者の手で採取されておらず、採血者のハンドリングスキルが変動を与えているケースもある。例えば採血時の吸引や遠心分離が強すぎることによって溶血が起きるが、複数の採血者の手を要する臨床現場では特にそのリスクが高い (50)。他にも複数回の凍結融解が内在性代謝物に影響を与えることは容易に想像できる (51)。こうした問題点を鑑みて、生体試料を取って悪条件下で採取、あるいは保存してメタボローム解析を行い、個々の代謝物特有の変動特性を抽出する試みが行われた (52)。

ハンドリングプロセスによる影響の中で普遍的で重要視しなければならないものの一つは保存条件 (温度、時間等) であり、血球を含んだ採血直後と、遠心して血球を取り除いた血清や血漿で検討されている。血球を含んだ状態では、氷水中での保存時間の影響が検討されており、262 のメジャーな代謝物について 4 時間までは影響が無いと報告されている (45)。 -30°C などのより低温下では検討されていないが、これは血球が存在する状態で凍結保存すると融解時の代謝物に対する影響が大きいことは容易に想像され、現実的にそういった作業はあまり行われていないことが理由と思われる。

一方で、血漿は凍結状態を含めて様々な温度で保存される。このため血漿を室温や 4°C で短時間、あるいは -80°C で長時間静置した後に NMR や LC-MS/MS でメタボローム解析を行った結果が報告されている。先駆的な研究成果としてラット血漿を様々な温度と時間の組み合わせで保存した後に LC-MS/MS で分析した結果がある (43)。ここでは 67 の代謝物について分析結果が得られ、 37°C 、24 時間の保存により 29 種の LPC、5 種の LPE、コリン、セロトニンの増加とシチジン、デオキシシチジンの減少が認められた。PC や PE からアシル基が一つ外れた LPC や LPE が増加する現象はその後も多く観察されており、血漿中リパーゼによって脂質分解が亢進した結果と考えられている。その後、ヒト血漿を用いてメタボロームの保存安定性を検討した 2 つの試験結果が報告されたが、前者で同定された変動代謝物はスフィンゴシン 1-リン酸とヒポタウリン、後者は PC/LPC/SM の $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$ 基に由来するシグナルについて記載されているのみである (53, 54)。最も多くの変動代謝物の情報が得られた試験結果では 216 代謝物のデータから室温、16 時間の保存によって LPC (4 種)、FFA (10 種)、スフィンゴ脂質 (5 種)、コレステロール (2 種)、エイコサノイド (4 種)、アミノ酸 (3 種)、炭水化物 (7 種) の増加と TAG (3 種)、PC (3 種)、コレステロール (2 種)、ニューロトランスミッター (2 種)、アミノ酸 (3 種)、炭水化物 (2 種) の減少が報告された (45)。

メタボローム解析ではなく、特定の代謝物を対象とした検討であるが、システイン等のチオール基を有する代謝物が不安定で減少し易いことが知られており、還元剤の添加など

が分析安定性に寄与することが報告されている (55-57)。しかしこのように保存安定性が詳しく検討されているものは限られる。ここ数年のメタボローム解析の対象分子数は 1,000 を超え、バイオマーカーとしての可能性を有する代謝物の範囲が広がり、保存安定性の情報が不足している。そのため、これまでよりも多くの代謝物について保存安定性の情報が必要となっている。また多くの代謝物の情報があれば、僅かな構造の違いや生物学的意義の違いを保存安定性と比較することによって、変動メカニズムが凡そ推定できる場合がある。本研究では最新のメタボローム解析技術を用いて多くの代謝物について血漿中の保存安定性データを蓄積し、さらに変動代謝物の構造類縁体や、同一パスウェイ代謝物の動きを調べることでその変動メカニズムを推定した。

第二節 材料および方法

被験者および血漿の調製

35-50 歳の健常人男性 5 人をリクルートし、事前にインフォームドコンセントを取得した。試験プロトコールは武田薬品工業の倫理委員会で承認を受け、ヘルシンキ宣言に則った。それぞれの被験者より血液 10mL をベノジェット II 真空採血管（テルモ、VP-NA050KN、EDTA-2Na 入り）に採取し、すぐに 10,000 xg で 15 分間の遠心処理を行った。上清画分を 1.5mL エッペンドルフチューブに 200uL ずつ分注し、異なる温度と異なる時間の組み合わせからなる 10 条件で保存した (図 1a)。それぞれの条件で放置した後、-80°C でストックし、まとめて前処理を行った後メタボローム解析を実施した。

メタボローム解析

タンパク質除去のために過剰量のメタノールを血漿サンプルに添加した後、遠心分離により上清を取得した。上清を 4 画分に分注し、各分析プラットフォームに適合した 4 種類の溶媒に溶かして LC-MS/MS または GS-MS 用サンプルとした。LC-MS/MS 分析では Waters 社 Aquity UPLC と Thermo Fischer Scientific 社 Q-Exactive (プローブ; H-ESI) を分解能 35,000 unit で使用した。GC-MS 分析では Thermo Fischer Scientific 社の Thermo-Finnigan Trace DSQ MS を用いた。(58-60)

① LC-MS/MS (逆相酸性ポジティブモード)

カラムに Waters 社 UPLC BEH C18 (2.1×100 mm, 内径 1.7 μm) を用い、移動相 A として水を、移動相 B として 0.01% のギ酸入りメタノールを使ったグラディエントモードで実施した。

② LC-MS/MS (逆相塩基性ネガティブモード)

①と同じカラムを用い、移動相 A として水を、移動相 B として 6.5mM の炭酸アンモニウム入りメタノールを使ったグラディエントモードで実施した。

③ LC-MS/MS (HILIC ネガティブモード)

カラムに Waters 社 UPLC BEH Amide (2.1×150 mm, 内径 1.7 μm)を用い、移動相 A として水を、移動相 B として 6.5mM の炭酸アンモニウム入りアセトニトリルを使ったグラディエントモードで実施した。

④ GC-MS

ビスメチルシリルトリフルオロアセトアミド (BSTFA) を用いて誘導体化した。5%フェニル-95%ジメチルシリコンの 0.18 mm×20 m カラムを用い、18 分間で 60-340 °C の昇温グラジエント下 EI イオン化法により測定した。

データ解析と統計

試験サンプル測定の数本おきに同じ標準ヒト血漿サンプル (Bioreclamation IVT 社、市販ヒト血漿サンプルをプール) を分析し、各サンプルにおけるそれぞれの代謝物レベルを以下のように表した。すなわち、サンプル中の面積値をその日に測定した標準サンプルの平均面積値で割った相対値を各代謝物について算出した (図中に「相対シグナル強度」と表示)。検出下限以下のサンプル値はその代謝物を測定できたサンプルの最小値で置き換え統計解析を行った。ほとんどの血漿中内在性代謝物は-80°Cで約 2.5 年間安定なことが報告されているため (54)、-80°Cで1ヶ月間保存したサンプルの値を基準として、これに対する各保存条件における変動の有意性を評価した (図 1a)。個々の変動代謝物と類似物質との比較においては、-80°C保存時の平均値をコントロール値として相対倍率を計算した。統計解析の際には、すべての値を自然対数に変換し、ソフトウェア“R” (<http://cran.r-project.org/>) を用いた。変動代謝物数の多変量解析 (図 2a および 2b) は q 値を使った False Discovery Rate (FDR) 検定を行った (61)。実験群間の有意差は対応ある t 検定 (Matched Pairs t -test) によって計算した p 値で評価した。それぞれの検定において p 値あるいは q 値が 0.05 未満の場合に有意とし、0.1 未満を傾向有りと判断した。

第三節 結果

結果の概要

メタボローム解析によってヒト血漿中 992 代謝物の保存安定性データを取得し、保存の時間および温度による変動を統計学的に評価した。全データの主成分分析では各サンプルに相当するプロットが被験者毎に近接した 5 グループを形成し、主に個体差を反映した (図 1b)。一方で各個人内のプロットが横方向に分散していることから主成分分析の Component 1 に寄与する特定の代謝物が保存温度や時間によって変動し、被験者に共通して保存条件が影響を及ぼしていると考えられた。-80°C保存のコントロールに対して、それぞれの条件で有意な変動を示した代謝物数 ($q < 0.05$) をカウントしたところ、血中レベルが上がる代謝

物数と下がる代謝物数が共に温度および時間依存的に増加した。また温度および時間依存的に変動幅の大きい代謝物数が増加した (図 2a)。すなわち個体差に関わらず保存温度と時間に依存した変動を示す代謝物が本研究で得られていることが確認された。変動代謝物を分類すると、減少するものはアミノ酸、炭水化物や核酸など比較的均等に分かれるのに対して、増加方向にあるものは脂質が多かった (図 2b)。次項より各代謝カテゴリーにおいて新規に見出された変動を中心に述べると同時に、周辺代謝物の変動と比較し、メカニズムを吟味した。

脂質分解を反映して顕著な変動が認められた代謝物

先行研究 (43, 45, 53-58) と同様に、本研究でも室温や 4°C 保存下で EPA など長鎖脂肪酸、ならびに LPC や GPC が増加分子として多数検出された (図 3a-c)。保存温度および時間依存的にリン脂質の分解が亢進する現象が再現された (図 3d)。

同様に TAG の分解産物である MAG の顕著な増加が共通して認められた (図 4a, 4c および 4d)。本研究で検出された MAG の中で 1-ドコサヘキサエノイルグリセロールは室温・24 時間および 4°C・1 週間の保存でそれぞれ 43 倍および 41 倍に増加し、他と比較してもこの増加率は際立っていた (図 4a)。加えて 1-アラキドノイルグリセロリン酸も同様に増加幅が大きく、室温・24 時間および 4°C・1 週間の保存でそれぞれ 54 倍および 15 倍に増加した (図 4b)。過去の報告は血漿中に多く存在する PC の分解産物に偏っていたが、本研究ではそれ以外の分子種についての情報が多数得られたことで、こうした顕著な変動代謝物の存在が明らかとなった。

チオール基およびジスルフィド基を有する代謝物の不安定性

本研究でもっとも顕著な不安定性を示した代謝物の一つとしてシステインを挙げることができる (図 5a)。血漿中のシステインが保存中に低下することは、これまでも報告されており (55-57)、2 量体化してシスチンへ変換するメカニズムが考えられていた (54)。類似骨格を有しながら S-メチルシステインやメチオニンも安定なこと (図 5b)、これらはチオール基がメチル化されていることから (図 5c)、システインの不安定性はやはりチオール基の高い反応性に由来するものと考えられた。一方でジスルフィド基を有するシスチンと酸化型グリシニルシステインはチオール基が無いにもかかわらずシステインと同様に顕著に減少した (図 5b,c)。種々のメカニズムが推定されるが、ジスルフィド基を含む代謝物は求核性が高いチオール基を有する別代謝物 (還元型グルアタチオンなど) と反応し、ジスルフィド交換反応を経て別の代謝物に変換されている可能性が考えられた (考察で詳述)。

特徴的な不安定性を示した核酸代謝物

本研究によって不安定性が新たに見いだされた代謝物として核酸類の N⁶-メチルアデノシンとアラントインを挙げることができる。N⁶-メチルアデノシンの増加率は各条件におい

て個体差が少なく、すべての被験者で同程度であった (図 6a)。またアデノシンや *N*⁶-メチルアデノシンは変動が認められなかったが、RNA に特異的な塩基であるウラシルは *N*⁶-メチルアデノシンと同様に、温度および時間依存的な増加を示した (図 6b)。アデノシンの *N*⁶位メチル化は mRNA 鎖で特異的に起こる修飾反応であることから (62)、*N*⁶-メチルアデノシンの増加は血漿中の RNase による RNA 分解に起因する可能性が高いと考えられた。

プリン分解の最終産物であるアラントインは -80°C よりも高い温度ではすべて減少した (図 6c)。アラントインはヒトの体内にある尿酸が ROS を捕捉して生成するために、活性酸素マーカーとしての利用が検討されている (63)。そのため、アラントインがこのように顕著な不安定性を示したことは、臨床利用を考えた場合、留意すべきである。アラントインと尿酸のレベルには関連性が認められておらず、アラントインの不安定性は尿酸とは無関係であることが確認された (図 6c)。

第四節 考察

保存条件の影響を調べた過去の試験結果 (43, 45, 53-55) では最大 250 程度の代謝物を対象としていたが、本研究では代謝マップ全域に亘って 992 代謝物データを取得した。先行研究で報告されている遊離脂肪酸、リゾリン脂質、MAG の増加、システインの減少について再現を認めた他、脂質の中でも特に顕著な増加を示す分子が存在すること、チオール基含有代謝物だけでなくジスルフィド基を有するものが顕著に低下すること、核酸代謝物の中で *N*⁶-メチルアデノシンとアラントインが変動し易いことを見出した。さらに関連代謝物の変動と比較することによって不安定性の原因メカニズムを推定した。

温度および時間依存的に増加した脂質エステル分解物が既報と同じく非常に多く検出され (43, 54)、その中で 1-アラキドノイルグリセロリン酸と 1-ドコサヘキサノイルグリセロールの増加は顕著だった (図 4a および 4b)。後者の増加は数種類検出された 1-モノアシルグリセロールの中で特に際立っており (図 4c)、この違いは血漿中に存在するリパーゼの基質特異性を反映した結果と思われる。同じモノアシルグリセロールであり、エンドカンナビノイド類 (摂食シグナル脂質) の一つとして分析されることの多い 2-アラキドノイルグリセロールは同様に血漿中で不安定性を示すが、リパーゼ阻害薬であるオルリスタットの添加によって室温保存下での増加を著しく抑制できることが報告されている (64)。本研究で不安定性が認められた代謝物の保存にもリパーゼ阻害薬の添加が有効に使える可能性がある。

血漿中のシステインが保存中に低下するメカニズムとして二量体化によるシスチンへの変換が推定されていたが (55)、本研究ではシスチンも同時に減少した (図 5a)。類似した不安定性は酸化型 Cys-Gly (ジスルフィド結合を介してダイマー構造を形成) でも認められた (図 5b および c)。チオール基を有する化合物は他のチオール基含有化合物と速やかにジ

スルフィド結合を作り、ジスルフィド結合を有する化合物は高い求核性を持ったチオール化合物と反応してジスルフィド交換反応を起こす。つまりシステイン、シスチンともに未固定の誘導体に変換され、一方が減少すると平衡関係にあるもう一方が減少するためにこうした不安定性が生じたことが考えられる。-30°C保存時にも相対定量値が-80°C保存時より低下していることからシステイン/シスチンは保存安定性が悪く、測定時にはサンプルの保存条件を厳しく規定しなければならない。含イオウ代謝物は生体内レドックス状態をコントロールする他、多様な生理活性を有することが報告されており (65)、-SH 基を誘導体化して分析する技術も開発されている (66)。今後も様々なサンプルを正確に分析することによって生体内での役割解明がさらに進むことが期待される。

アデノシン *N*⁶ 位のメチル化は mRNA 鎖で特異的に起こる現象であること (62)、さらには一般的に mRNA が酵素分解を受け易いことから、*N*⁶-メチルアデノシンの温度および時間依存的な増加は RNase による mRNA の分解によるものと推定された (図 6a および 6b)。*N*⁶-メチルアデノシンの上昇程度は顕著なだけでなく、各保存条件における変動レベルに個人差が少ない。この特性を利用することによって血漿サンプルの保存状態を推定する QA マーカーとして有用に使えるかも知れない (45)。*N*⁶-メチルアデノシンが温度と時間で一定の分解傾向を示すのであれば、その絶対定量値や他の安定代謝物 (アデノシンなど) との比によってサンプルの保存状態を推定できる可能性がある。また、本研究で-30°Cでも低下が認められたアラントインはヒト特異的な活性酸素種の指標として臨床応用が検討されている (63)。他の哺乳類ではウリカーゼによる酵素反応によって尿酸からアラントインが生成するため、ROS マーカーとはならない。しかし、ヒトは遺伝子変異によりウリカーゼ機能を欠損しているため、体液中のアラントインは尿酸が ROS を捕捉したものがすべてと考えられ、ROS マーカーになり得ることが期待されている (67)。本研究で見出された不安定性は今後の臨床研究でアラントインを測定する際に充分留意すべき点になる。

以上、様々な条件で保存した血漿サンプルをメタボローム解析することによって 992 代謝物の保存条件による変動が明らかとなった。先行研究で報告された主だった結果が再現されると同時に、新たな知見として 1-ドコサヘキサエノイルグリセロールおよび 1-アラキドノイルグリセロリン酸が他の脂質より顕著に高い増加を示すこと、システインだけでなくシスチンが非常に不安定で低温下でも低下すること、*N*⁶ メチルアデノシンが個人差なく顕著に増加すること、臨床検査にも使われるアラントインが-30°C保存下でも減少することが挙げられる。多くの代謝物について変動が発生する温度と時間を知ること、個々を正確に測定するための保存温度と時間を規定することが可能になる。また、ある条件下で保存されたサンプルのメタボロームデータを解析する際に信頼性の高いデータを選択して、その後の統計解析の精度を上げることが可能になる。さらに推定された変動メカニズムを基に、酵素阻害剤の添加などより保存による影響をさらに軽減させるための基礎情報となる。

第五節 図表

すべての図表は *Metabolomics* (2016) 12, 179, DOI 10.1007/s11306-016-1126-2 (論文 1) より転載した。

(a)

Time Points	Storage Condition			
	RT	4°C	-30°C	-80°C
2 hr	X			
6 hr	X			
12 hr	X	X		
24 hr	X	X		
1 week		X	X	
1 month			X	X

➡ Control values; -80°C, 1 month

(b)

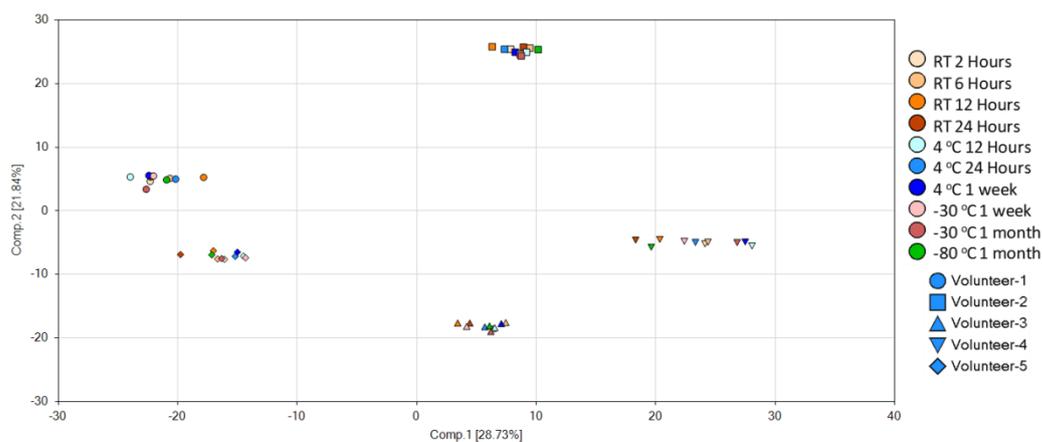


図1 保存安定性試験の概要

(a) 試験に使用した 10 の保存条件 (温度と時間) ; -80°C、1 ヶ月保存時を変動の無い基準値として各条件での変動を評価した。(論文 1, Fig.1a を一部改変)

(b) 得られたデータで示した各サンプルの主成分プロット;各プロットの形と色はそれぞれ被験者と保存条件の違い (右パネル) を表す。(論文 1, Supplemental Fig.1a)

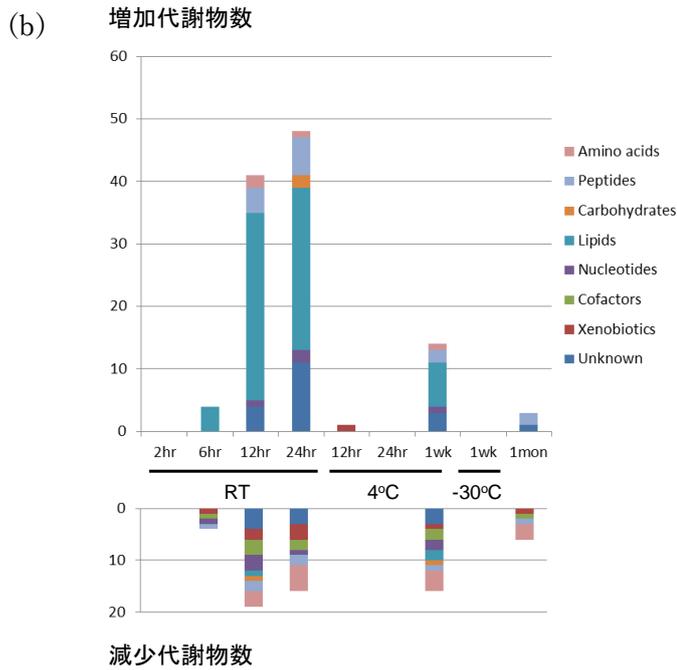
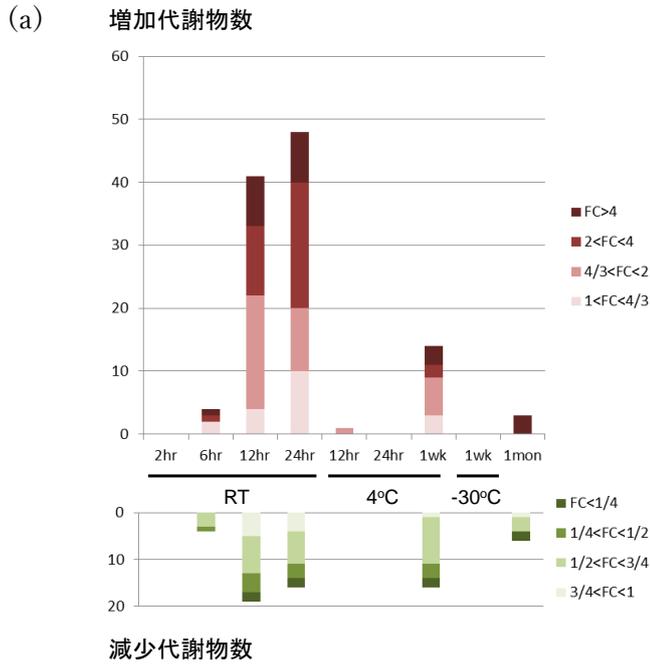


図2 保存温度および時間依存的に増加/減少した代謝物数；-80°C、1ヶ月間保存時の値に対して各保存条件での値をFDR検定で評価、 $q < 0.05$ の代謝物をカウントした。(縦軸；変動代謝物数、横軸；保存条件)

(a) 変動幅の違い (論文1, Fig.1bを一部改変)、(b) 代謝物種の違い；それぞれ右パネルに色分けの定義を記載した。(論文1, Supplemental Fig.1a)

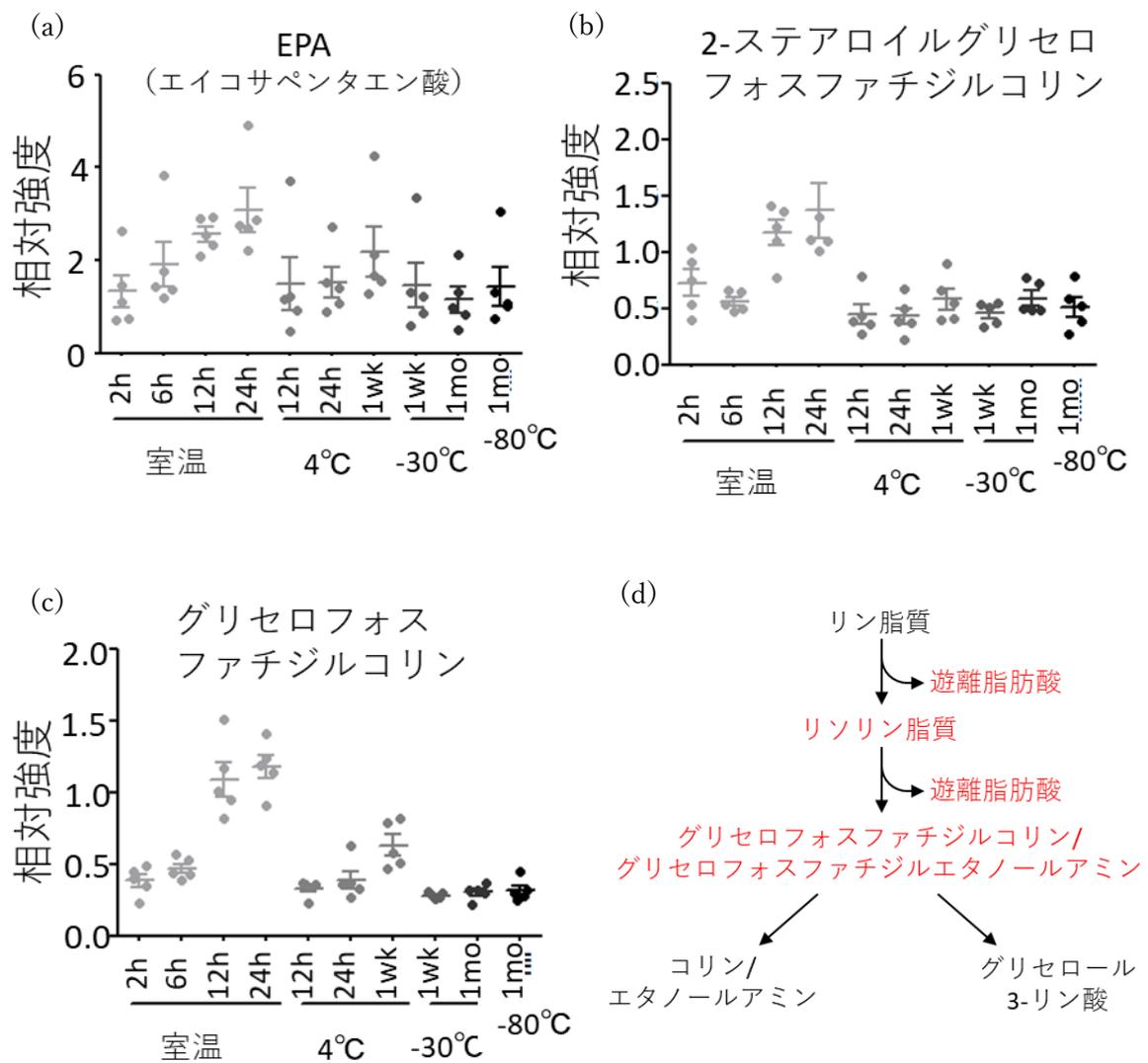


図3 リン脂質エステル分解物の保存温度・時間依存的な増加

(a) 遊離脂肪酸の典型例 (EPA) (論文 1, Fig.2a を一部改変)、(b) LPC の典型例 (2-ステアログリセロフォスファチジルコリン) (論文 1, Fig.2c を一部改変)、(c) GPC (論文 1, Fig.2d を一部改変)、(d) リン脂質の分解経路、増加が認められたものを赤字で表示 (論文 1, Fig.2b を一部改変)

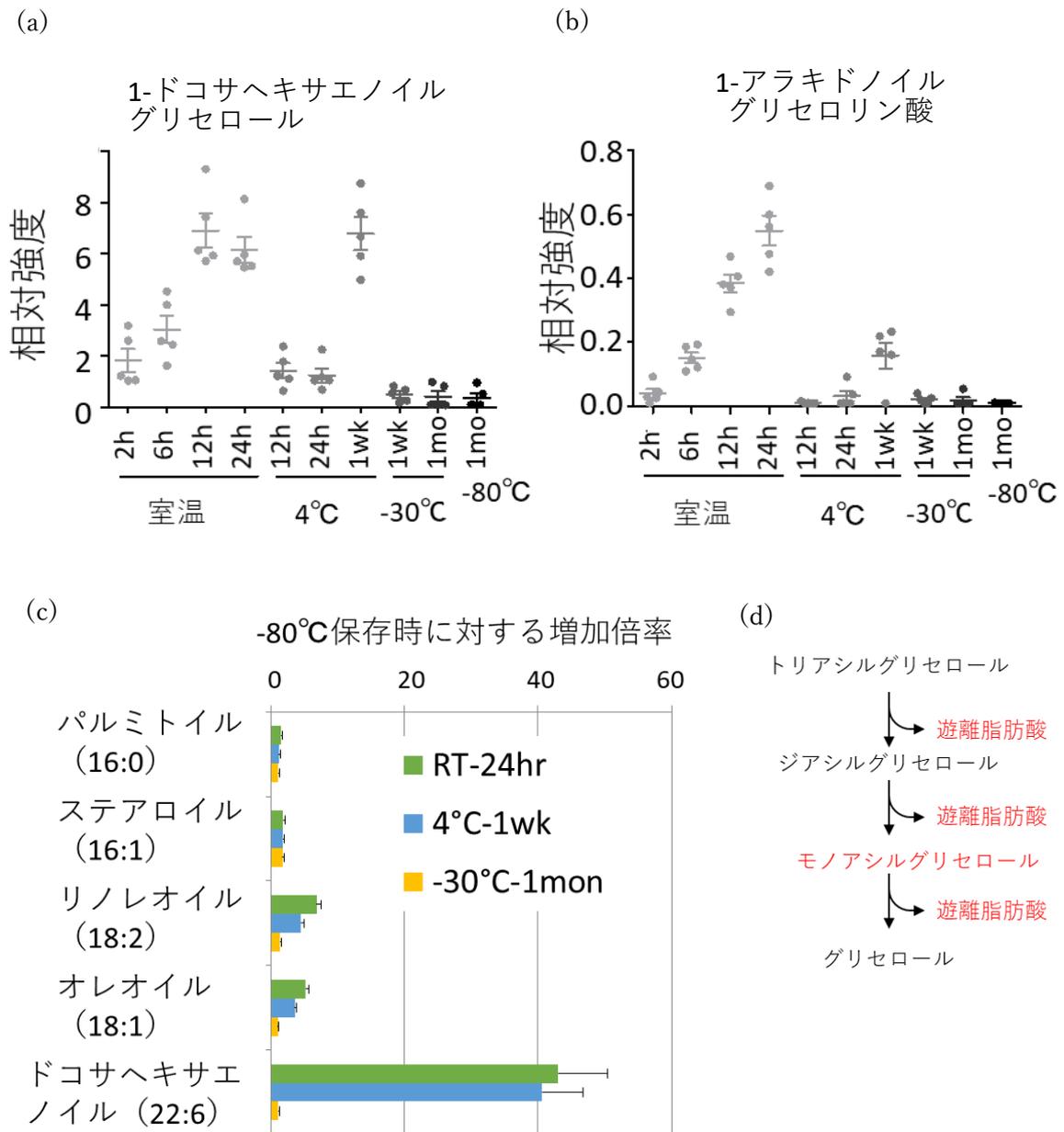


図4 中性脂質分解物の保存温度・時間依存的な増加と顕著な増加率を示した脂質分子
 (a) 1-ドコサヘキサエノイルグリセロール (論文1, Supplemental Fig.2d を一部改変)、(b) 1-アラキドノイルグリセロリン酸 (論文1, Supplemental Fig.2e を一部改変)、(c) モノアシルグリセロール変動の分子種による違い (論文1, Supplemental Fig.2c を一部改変)、(d) トリアシルグリセロールの分解経路、増加が認められたものを赤字で表示 (論文1, Supplemental Fig.2b を一部改変)

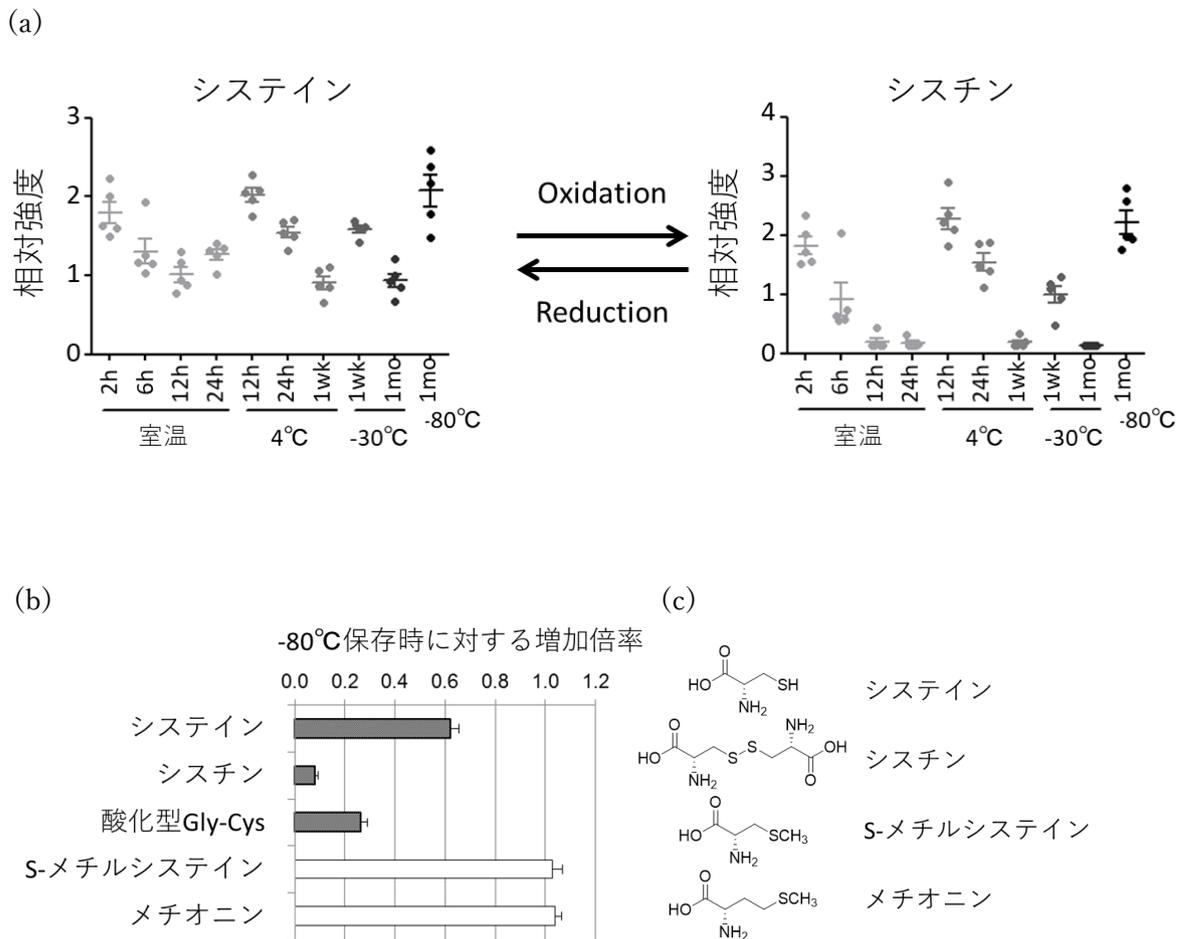


図5 チオール基、ジスルフィド基が引き起こすシステインと関連代謝物の不安定性
 (a) システイン、シスチンの不安定性と平衡関係 (論文 1, Fig.3a を一部改変)、(b) システインと関連代謝物の室温、24 時間保存時の分解；灰色バー (有意に減少)・白バー (有意差なし) (論文 1, Fig.3b を一部改変)、(c) システイン関連代謝物の構造式 (論文 1, Fig.3c を一部改変)

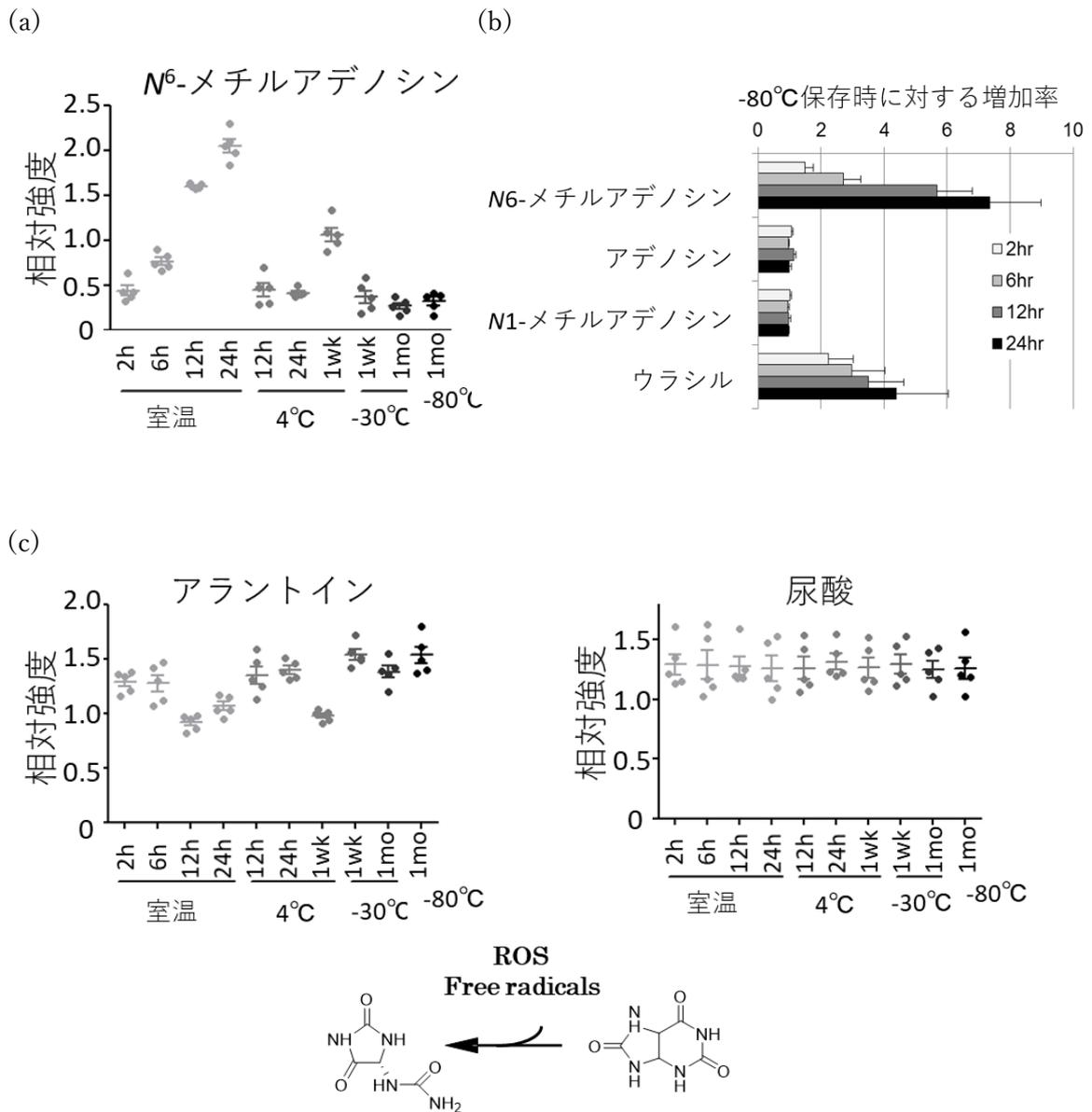


図6 *N*⁶-メチルアデノシンとアラントインの特徴的な変動

(a) *N*⁶-メチルアデノシンの温度依存的な増加 (論文 1, Fig.5a を一部改変)、(b) アデノシン関連塩基の時間依存的な増加 (室温保存時)；バーの色は右に示した保存時間を表す (論文 1, Fig.5b を一部改変)、(c) アラントインと尿酸の保存温度・時間依存的な変動 (論文 1, Fig.5c を一部改変)

第二章

食事の影響の解析；日本人健常者での検討

第一節 序

序章で述べたように経時的に採取した血漿を分析し、バイオマーカーの動きを追跡する場合には、これらバイオマーカーは短時間で日内変動が少ないものが望ましい。日内変動を引き起こす因子として睡眠、明暗周期、食事などがあり、こうした変動因子がメタボロームに与える影響をよく理解し、日内変動がより少ないものを選択する必要がある。睡眠や明暗周期の影響が純粋に表れるように被験者の睡眠時間や試験中の居住空間の光度、さらには摂食量をコントロールし、サンプリングした血漿のメタボローム解析を行った試験があり、睡眠や明暗周期の影響を受ける代謝物が見出されている (68, 69)。

一方、食事の影響については一般的に良く知られた現象がある。食物は消化管上部で分解された後、吸収されて血液成分に影響を与える。食後の血糖上昇やタンパク質分解の影響として表れるアミノ酸上昇はその典型例になる。そうした食物消化物による影響とは別に、摂食行為に対する反応として生体の摂食応答がある。絶食時には体内に蓄えられた脂質をエネルギー源として利用するが、食後は食物に含まれる糖분을エネルギー源として利用するために脂質分解が抑制され、その影響が代謝物レベルに影響する (9)。また食後に胆嚢から胆汁酸が分泌されて食物中の脂質をミセルとして吸収するため、血中の胆汁酸は食後に増加する (70)。

過去に食前食後に採血し、血漿や血清を用いてメタボローム解析が行われており、食事の内容や健康状態による変動の違いが検討されている。まず 15 人の白人男性が標準的な液体ミール食を摂取した際の変動を 275 代謝物について調べられた。脂質 β 酸化の指標であるアシルカルニチンが減少すると同時にカルニチンが対照的に増加すること、呼気や尿中のアセトンが減少することが報告されている (9)。その後、パンの種類による食後メタボローム変動の違いが検討されて、分岐鎖アミノ酸や、その下流代謝物の増加程度がパンの種類によって異なることが報告されている (47)。さらに健常者、健康な肥満者、不健康な肥満者 (肥満の基準は BMI、健康の基準は HDL-C、LDL-C、HOMA-IR で規定) の食後変化の違いについて検討された (71)。被験者の状態に関わらず多くのアミノ酸や短鎖/中鎖脂肪酸が増加し長鎖脂肪酸が減少する一方で、アスパラギン、セリン、グルタミン、シスチンの増加レベルや長鎖脂肪酸の減少レベルが 3 群間で異なっていた。また同一被験者が食習慣を変えた前後でそれぞれバナナ摂取による食後変化の違いが調べられて、アミノ酸や有機酸が増加する一方で脂肪酸が減少することが報告された (72)。食事がメタボロームに与える影響を理解することによって、単に食事成分がメタボロームに加わる影響がわかるだけでなく健康状態の理解に繋がり、食習慣の影響がわかる可能性がある。

こうした研究において質量分析計や NMR により最大 250 程度までの代謝物が同定されているが、変動が認められたのは食物消化物上昇としてのアミノ酸増加や、摂食応答として脂質 β 酸化抑制を反映した長鎖脂肪酸、アシルカルニチンの減少など生体内の存在量が豊

富なものに限られている。代謝酵素を標的として研究開発される薬剤は多く、必然的に内在性代謝物をターゲットエンゲージメントマーカーとして経時採血サンプルを臨床試験で分析する機会が多い。このためより広範囲な代謝物について食事による影響がわかれば、バイオマーカー選択において有利である。また先行研究はすべて白人を被験者としたものであり、日本の臨床研究に有用なデータが望まれる。そこで本研究では日本人が日本食を摂取した際に、食前食後の血漿を採取し、第1章と同じく約1,000の代謝物情報を取得した。有意な変動代謝物を抽出すると同時に、変動しなかった周辺代謝物との比較からメカニズムを推定した。

第二節 材料および方法

被験者および血漿の調製

定期健康診断で健康状態であることが判定された25-50歳の健常日本人10人（男性8、女性2）をリクルートし、事前にインフォームドコンセントを取得した。試験プロトコールは武田薬品工業の倫理委員会で承認を受け、ヘルシンキ宣言に則った。採血スケジュールを図1aに示した。採血の前日に夕食を摂った後、採血日の昼食まで飲食を禁止した。昼食は12時~12時半に摂り、昼食1時間前の11時と昼食1時間後の13時半に採血した。血液はそれぞれの被験者より血液10mLをベノジェクトII真空採血管（テルモ、VP-NA050KN、EDTA-2Na入り）に採取し、すぐに10,000xgで15分間の遠心処理を行った。上静画分を1.5mL エッペンドルフチューブに200uL ずつ分注し、メタボローム解析を行った。

メタボローム解析

第一章で使用したのと同じ方法で分析を行った。

データ解析と統計

第一章と同じく Bioreclamation IVT 社の標準ヒト血漿サンプルで分析された各代謝物の平均に対する相対値として各サンプルの値を相対シグナル強度として算出した。検出下限以下のサンプルの値はその代謝物を検出したサンプルデータの最小値に置き換えて統計解析を行った。すべての値を自然対数に変換し、統計ソフトウェア“R” (<http://cran.r-project.org/>) を用いて解析した。食前/食後間の有意差検定には対応ある t 検定 (Matched Pairs t-test) で計算された p 値で評価し、0.05 未満を有意とした。食事によって有意に変動したパスウェイのエンリッチメント解析には Cytoscape (www.cytoscape.org) を用いた。全体的な変動代謝物の割合から考えて、偶然に起こり得る以上に多くの代謝物が変動しているかどうかを、パスウェイ毎に評価するものである。累積的超幾何分布に従って解析し、計算式には以下を用いた。

- A = 有意に変動した代謝物数 / 検出された代謝物数 (各パスウェイ内代謝物)
- B = 有意に変動した代謝物数 / 検出された代謝物数 (全測定代謝物)
- パスウェイのエンリッチメント値 = A / B

第三節 結果

結果の概要

メタボローム解析の結果、1101 代謝物（構造既知 660、構造未知 441）について食事前後のデータを取得した。図 1b に示すようにデータの主成分分析では大きな個人差が認められる一方、食事により右下方向に変動する傾向が一致しており（点線矢印で表示）、共通の変動因子の存在が示唆された。有意に変動した代謝物の割合を評価するパスウェイエンリッチメント解析では、脂肪酸、胆汁酸、アミノ酸、および TCA 回路中間体の変動が上位を占め、これらパスウェイ上代謝物の多くが食事により変動し易いことが示された（図 1c）。多くはエネルギー利用の脂質分解から糖分解へのシフトなど既報の食後変動であるが、新たな変動分子が見出されており、次項より詳述する。さらに第 2 章と同様に、変動したものの周辺代謝物を含めた詳細な検討により、変動を与えるメカニズムを吟味した。

脂質 β 酸化抑制を示す 3-ヒドロキシル脂肪酸の低下

食事によって脂質分解が抑制されることが先行研究でも報告されており (9)、本研究でもその結果としてグリセロール、長鎖脂肪酸、BHB の低下が観察された（図 2a~c）。また遊離脂肪酸がミトコンドリアに流入する際に消費されるカルニチンは逆に増加した（図 2c）。本研究では食事によって炭素数 8 以上の 3-ヒドロキシル脂肪酸が顕著に減少することが新たに見出された（図 2d）。3-ヒドロキシル脂肪酸の CoA 体は β 酸化の中間体であり、これら 3-ヒドロキシル脂肪酸の減少は β 酸化が抑制された結果を表していると考えられた。炭素数 3 の 3-ヒドロキシルシプロピオン酸は上昇しており、奇数鎖の 3-ヒドロキシル脂肪酸の変動は β 酸化以外の影響が大きいと想定された（次節、考察で詳述）。

糖代謝の亢進を示す代謝物変動

食物由来の炭水化物は消化されてグルコースなどの単糖となり、解糖系と TCA 回路で代謝されてエネルギー産生に使われる。ピルビン酸など解糖系の下流代謝物と TCA 回路中間体の大部分は食後に有意に増加したのに対して、解糖系上流のグルコースと 2,3-グリセロール-2 リン酸の上昇は比較的小さく、吸収されたグルコースは速やかに代謝されたことが推察された（図 3a）。ピルビン酸、クエン酸、およびリンゴ酸などが糖代謝亢進を表す典型的な分子として顕著に増加する一方で、コハク酸は有意に減少した（図 3b）。ジカルボン酸等が酸化されてコハク酸に流入する経路（アナプレロティック反応の一つ）が食事により

抑制されたことがそのメカニズムの一つとして推定された (73)。

タウリン、およびグリシン抱合体に特異的な胆汁酸増加

図 4a に示すように一次胆汁酸と二次胆汁酸がともに食後に顕著に上昇した。胆汁酸の増加は食物由来の脂質を腸管で吸収するために胆管から胆汁酸分泌が増加したことを表す (70)。食事による顕著な増加が認められたのはグリシン抱合体とタウリン抱合体であり、フリー体の多くは増加しなかった (図 4b)。この現象はヒオコール酸を除いて一次胆汁酸と二次胆汁酸の両方で共通に観察された。胆汁酸は、肝臓においてコレステロールがチトクローム p450 によって酸化される反応をスタートとして合成され、小腸へ分泌されるまで胆嚢に蓄えられる。また解毒化および可溶化のためにタウリンやグリシンと抱合した後、胆汁として腸管内に放出され腸内細菌による脱抱合を受ける (74)。食後 1 時間では脱抱合反応を受ける前に胆汁酸が脂質とともに吸収されたために抱合体特異的に胆汁酸が上昇した可能性が考えられた。

食物由来代謝物の増加

食物由来のタンパク質は消化管内で加水分解を受けてアミノ酸となった後、吸収されて循環血中に入る。先行研究では食後に顕著なアミノ酸増加が観察されているが、本研究では増加が認められたアミノ酸は一部に限定された (図 5a)。ヒスチジンも食後にわずかに増加傾向を認めるのみであったが、3-メチルヒスチジンは顕著に増加した (図 5b)。ヒスチジン 3 位のメチル化はアクチンやミオシンタンパク質中のヒスチジンに特異性が高い修飾であることから、肉類や魚類の筋肉タンパク質が加水分解を受けた後に腸管から吸収された結果と考えられる (75, 76)。食肉中に含まれる β アラニンとアンセリンの増加が観察されており (図 5c, 77, 78)。これら修飾アミノ酸は食前の血中レベルが低いことを反映して食後の増加がより明確に表れたものと考えられた。

いくつかの食物由来成分およびその代謝物の増加も観察された。食後に増加した 2-オキシソインドール 3-酢酸および 4-スルフォフェラル酸は、それぞれ米および茶由来代謝物として知られており、日本での試験において特徴的な分子と考えられた (図 5d)。

食事による他の顕著な変化

図 6a に示すように、摂食シグナル脂質であるアナンダミド (*N*-アシルエタノールアミド) が食後に大きく減少した。食後アナンダミド類の減少はこれまでも知られた現象であるが、新たに *N*-アシルタウリンが減少することが見出された (図 6b)。アナンアミドは組織中で貯留されるよりも、むしろ必要に応じて合成され迅速に分解を受ける (79)。*N*-オレイルタウリンは *N*-アシルエタノールアミドが脂肪酸アミド加水分解酵素 (FAAH) の反応を受けた後に合成される (図 6c, 80-82)。よって本研究において認められた食後の *N*-オレイルタウリンは FAAH 反応の影響を受けてアナンダミド類と類似した変動を示したと考えら

れた。

第四節 考察

本試験によって日本人が日本食を摂取した際のメタボローム変化について約 1,000 分子の大量データを取得した。大きな個人差が認められたが、主成分分析によって食前から食後への代謝プロファイルのシフトは共通した方向性を示し、個人差はあっても変動する代謝物は共通していることが示された。先行研究では脂質分解抑制によるアシルカルニチン・遊離脂肪酸の減少、食物由来タンパク質分解によるアミノ酸増加、脂質吸収に伴う胆汁酸増加、摂食欲求に関連するエンドカンナビノイド類の減少が報告されている (9, 47, 70-72)。こうした現象の再現が得られると同時に、新たに脂肪酸 β 酸化中間体である 3-ヒドロキシル脂肪酸の低下を認めた他、抱合体特異的な胆汁酸増加、*N*-アシルタウリンの減少を確認した。

炭素数 4 以上の 3-ヒドロキシル脂肪酸の上昇が認められており、これらの CoA 体が β 酸化の中間代謝物であることから、脂質代謝が抑制された影響と考えられた (図 2a,d)。その一方で炭素数 3 の 3-ヒドロキシルプロピオン酸は増加しており、別の影響を受けてることが考えられた。哺乳類由来の脂肪酸は合成過程も分解過程も 2 個ずつの炭素の増減で反応が進むため、多くの哺乳類脂質は偶数脂肪酸で構成される。一方、奇数脂肪酸は分岐鎖アミノ酸や β -アラニンの分解によって生成する他、食物や腸内細菌など外的な因子に由来する (83)。従って食後の 3-ヒドロキシルプロピオン酸増加は食事中成分の代謝物の影響を強く受けて増加した可能性が考えられる。

食物に含まれるタンパク質の消化産物として血中アミノ酸の増加が予想されたが、本研究では限られたアミノ酸の上昇を認めるに留まった (図 3a)。一方で食肉由来成分の 3-メチルヒスチジン、 β -アラニン、アンセリンの上昇は顕著であった。タンパク質構成アミノ酸は絶食下でも血中濃度が高いことから、食物性タンパク質分解の影響が相対的に小さかったと考えられる。また過去の欧米の試験より増加のレベルが低かった原因として食物成分にタンパク質が比較的少ないこと、日本人の体質 (消化や吸収活性、食前の血中アミノ酸濃度等) によること等が考えられるが、結論を得るには欧米人が今回と同じ日本食を摂取した試験や日本人が欧米食を摂取した試験との比較が必要になる。

食後の胆汁酸上昇はよく知られた現象であるが、本研究で認められたグリシン抱合体、およびタウリン抱合体に特異性があることは報告されていない (図 5b)。肝臓で合成された一次胆汁酸はタウリンやグリシンの抱合を受けて胆汁として一旦胆嚢に貯留された後、摂食反応によって小腸に分泌される (74)。腸管内に分泌された胆汁酸は腸内細菌によって脱抱合を受け、二次胆汁酸、即ちデオキシコール酸やリトコール酸に変換される (84)。それゆえに循環血中の各種胆汁酸濃度は肝臓における生合成や腸管からの吸収、さらには腸内細菌代謝で規定される。食後 1 時間ではフリー体が変動しない理由として胆管から分泌さ

れた胆汁酸の大部分は腸内細菌による脱抱合反応を受けずに吸収されたことが考えられる。

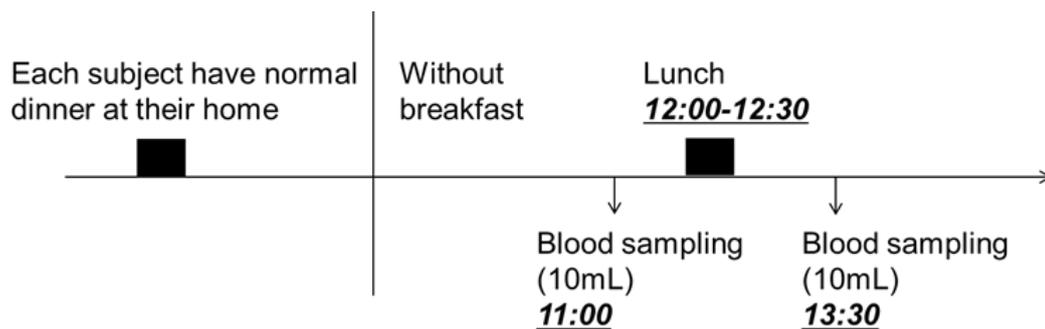
食後のアナンダミドの減少は過去にも報告があり、肥満者では減少程度が小さいことが観察されている (85)。また *N*-オレイルエタノールアミドの投与によってマウスの摂食が抑制される (79)。これらのことからアナンダミドには摂食抑制作用があり、レプチンと同様に感受性があれば速やかに減少するものであり、本研究で共通して減少が認められた点は被験者が健常人であることを反映していると思われる。構造が類似している *N*-アシルタウリンは TRP カルシウムチャンネルを介して浸透圧、機械刺激、温度刺激などに対する応答性を制御する (80)。このため *N*-アシルタウリンは摂食応答とは別の目的で分析される機会が多く、本研究で初めて認められた食後の減少は *N*-アシルタウリン分析時に留意する必要がある。

以上、日本人が日本食を摂取した前後で取得した血漿サンプルのメタボローム解析により、食事による各代謝物の変動プロファイルデータを蓄積した。得られた結果から食事の影響が少ないバイオマーカーの選択に加えて、各代謝物定量におけるサンプリング条件の設定に利用される。変動しなかった類似代謝物情報と合わせて推定された変動メカニズムは生体の摂食応答反応を理解する基盤となる。

第五節 図表

すべての図表は *Journal of Biochemistry*(2018) 163(2), 113-121. doi: 10.1093/jb/mvx066 (論文 2) より転載した。

(a)



(b)

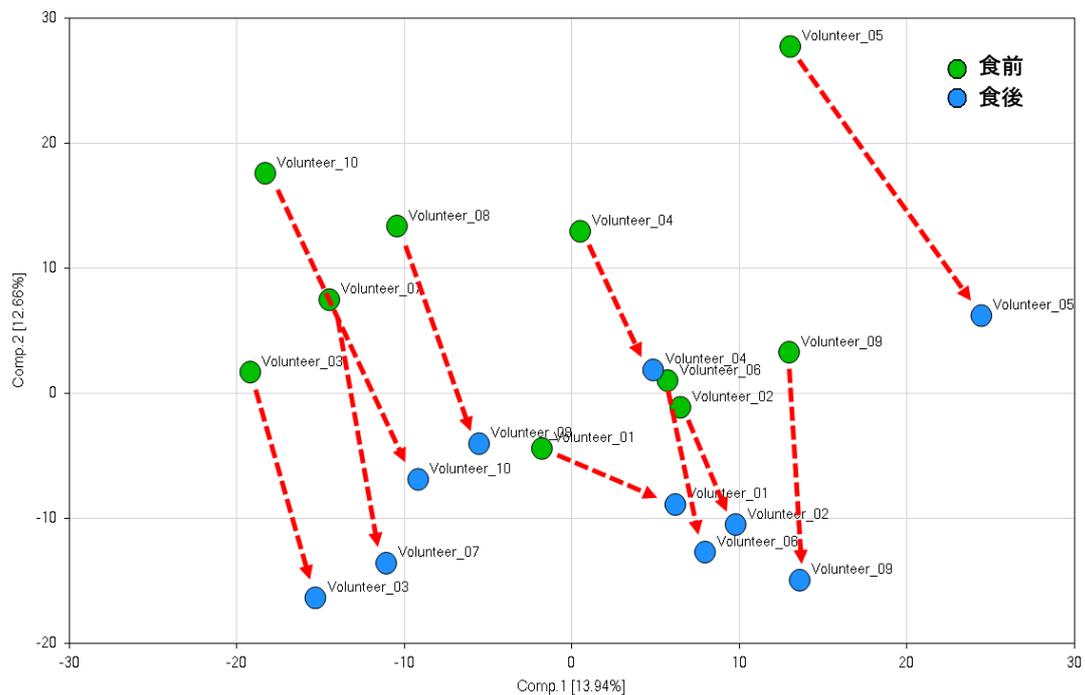


図 1-1 食前食後比較メタボロミクス試験の概要

(a) 血液サンプリングと食事のタイムスケジュール (論文 2, Fig.1a)、(b) 各サンプルの主成分プロット; 緑色ドットと青色ドットはそれぞれ食前食後を、点線は各被験者の繋がりを表す (論文 2, Fig.1b を一部改変)

(c)

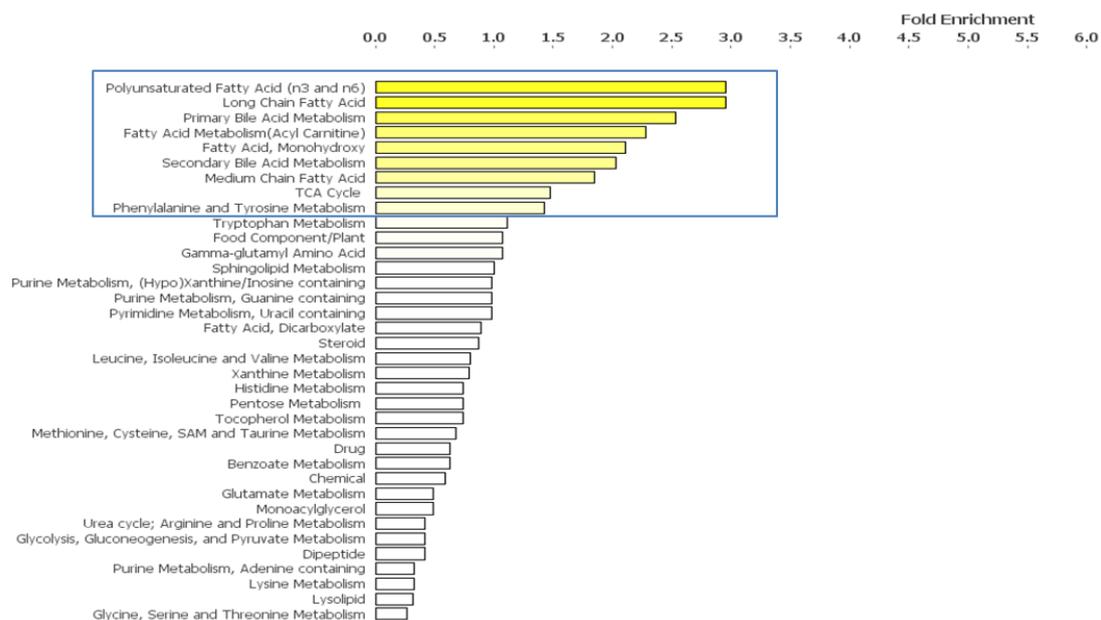


図 1-2 食前食後比較メタボロミクス試験の概要 (続き)

(c) パスウェイエンリッチメント解析 (論文 2, Supplemental Fig.1 を一部改変)

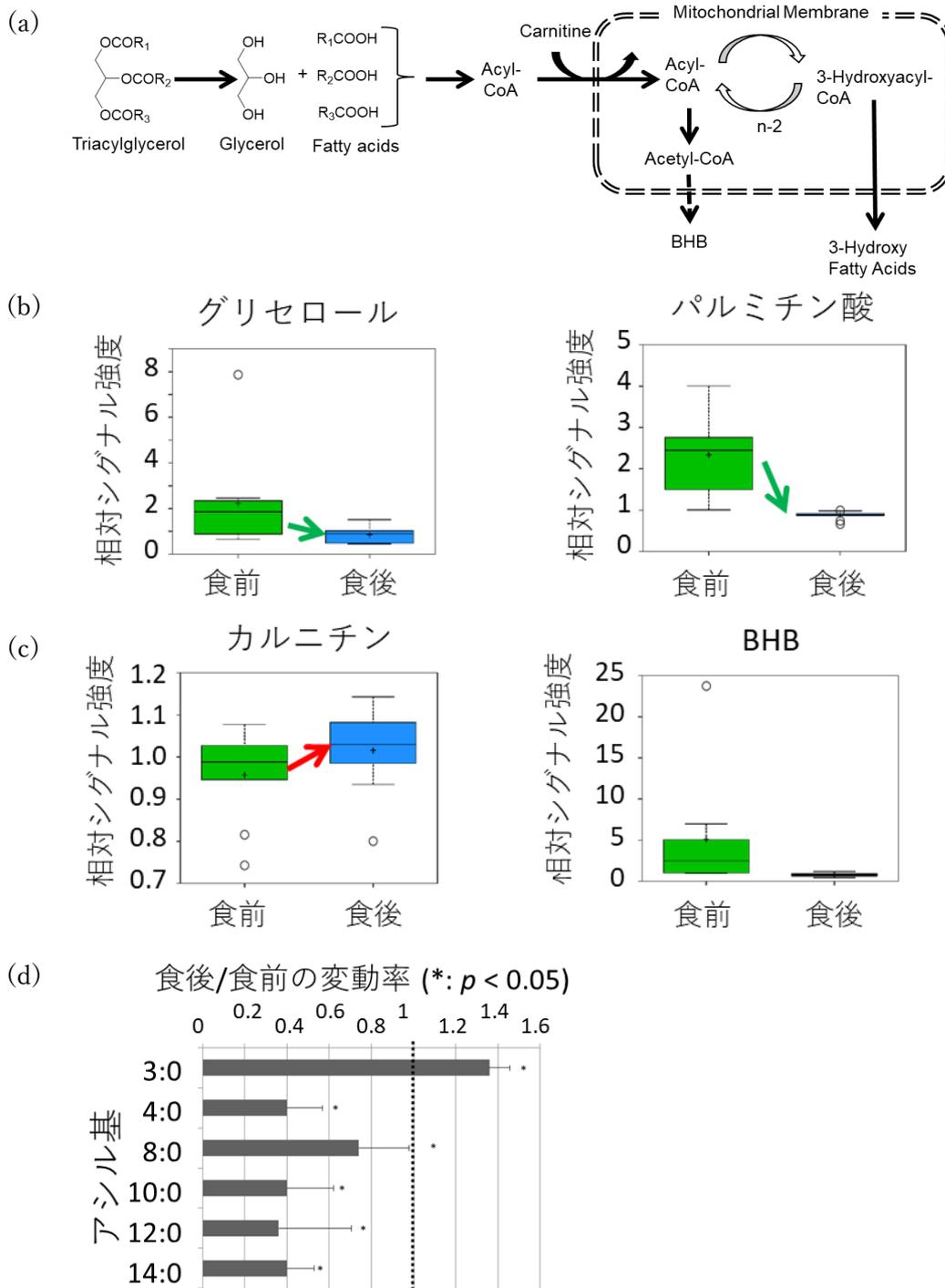
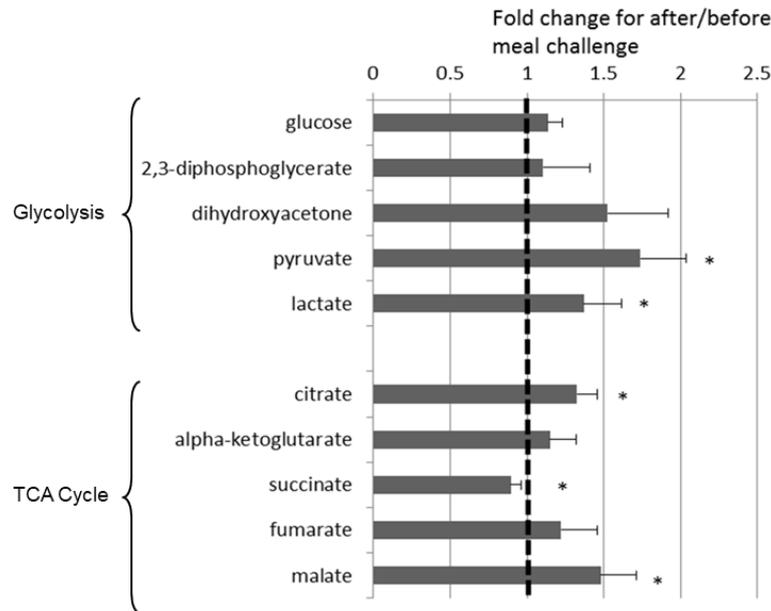


図2 食事による脂質代謝の抑制 1

(a) 脂質分解と酸化の代謝パスウェイ (論文 2, Fig.2d)、(b, c) 代表的な分子の食事による変動 (b; 脂質分解抑制、c; β 酸化抑制); 緑色および青色カラムはそれぞれ食前および食後を表す (論文 2, Fig.2a,b を一部改変)、(d) 3-ヒドロキシ脂肪酸の食事による変動; アスタリスクは有意差を表す ($p < 0.05$) (論文 2, Fig.2c を一部改変)

(a)



(b)

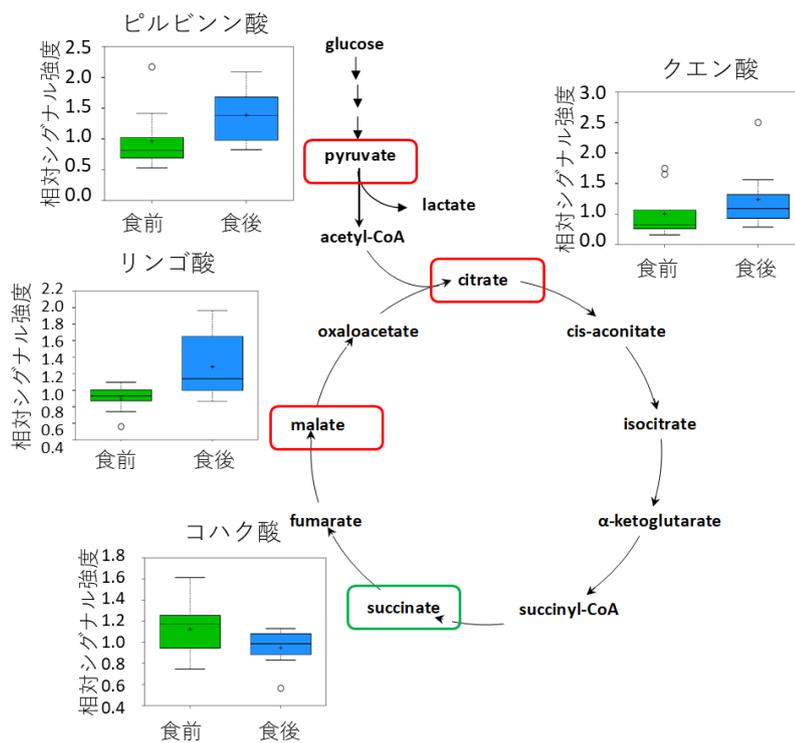
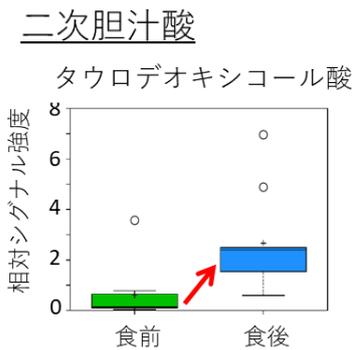
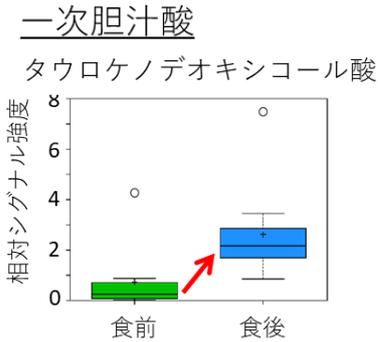


図3 食事による糖代謝の亢進

(a) 各代謝物の食後/食前の比率 (アスタリスクは有意差を表す; $p < 0.05$) (論文 2, Supplemental Fig.3)、(b) TCA 回路と各代謝物の変動 (緑色および青色カラムはそれぞれ食前および食後を表す) (論文 2, Fig.3 を一部改変)

(a)



(b)

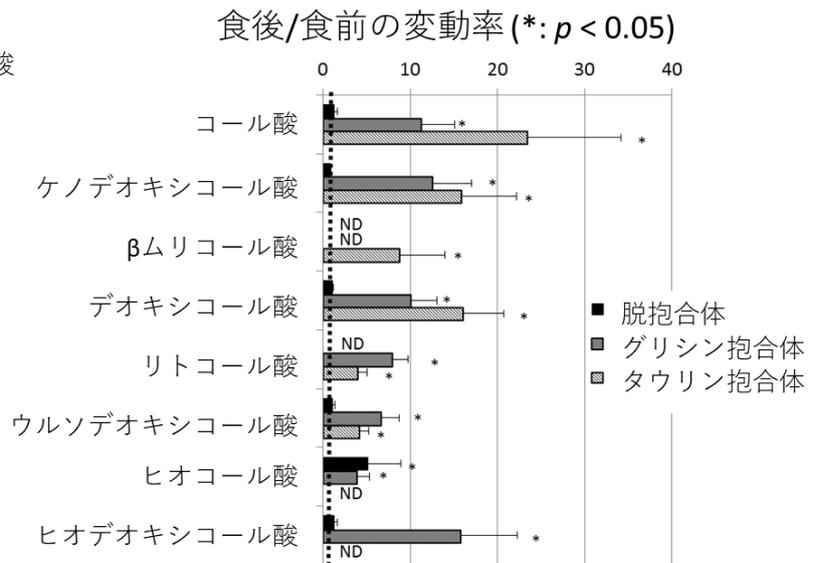


図4 食事による胆汁酸の増加

(a) 1次および二次胆汁酸の顕著な増加（緑色および青色カラムはそれぞれ食前および食後を表す）（論文2, Fig.4aを一部改変）、(b) 抱合型依存的な食後変動の違い（食後/食前の比率）；カラムの色の違いは右に示した抱合型の違いを表す。アスタリスクは有意差を表す（ $p < 0.05$ ）（論文2, Fig.4bを一部改変）

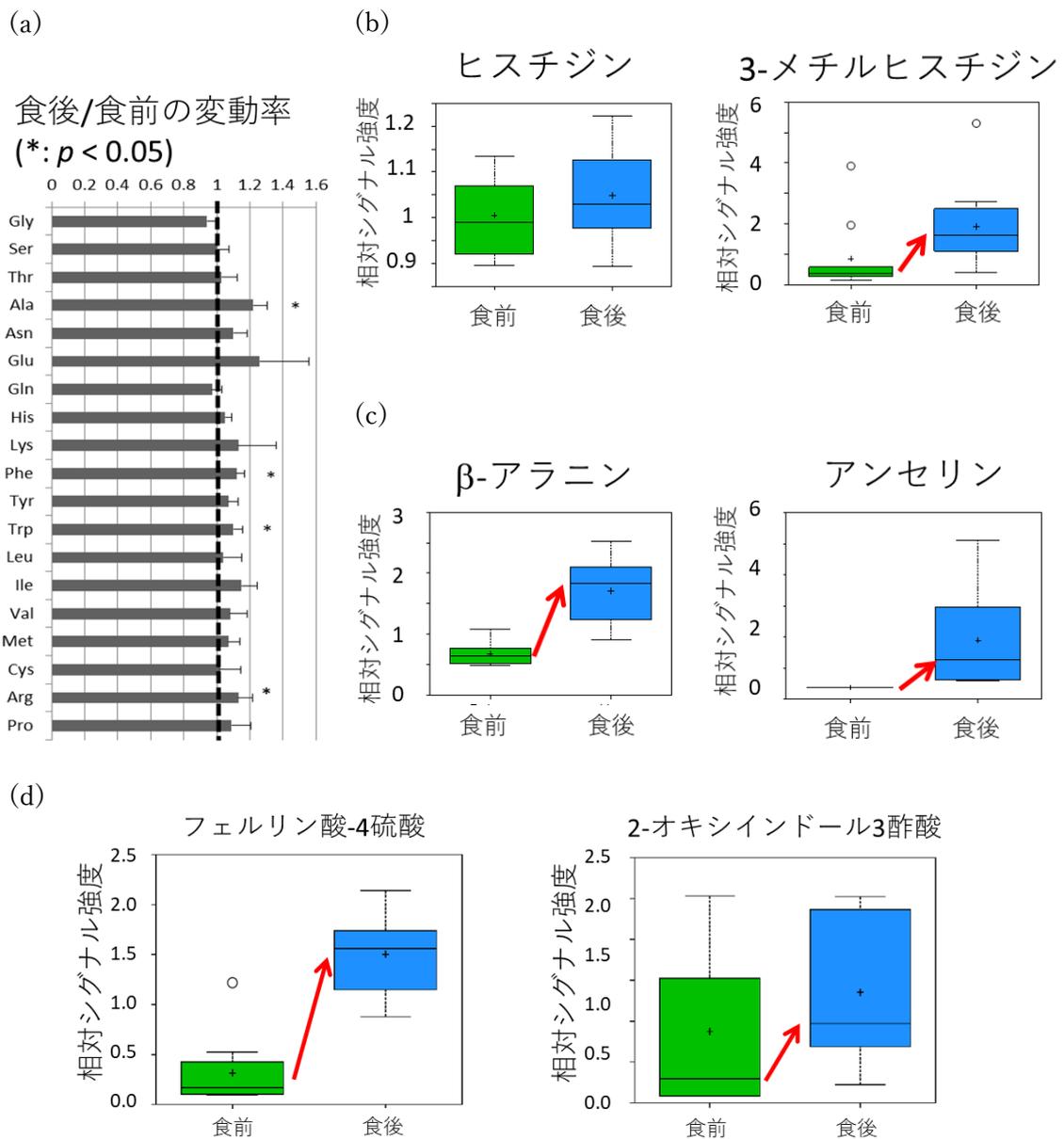


図5 アミノ酸の食事による変動の違いと食物中肉類由来アミノ酸の増加
 (a) タンパク質構成アミノ酸の食後/食前の比率 (アスタリスクは有意差を表す; $p < 0.05$)
 (論文 2, Fig.5a を一部改変)、(b, c) 食肉由来アミノ酸の顕著な増加; (b; 3-メチルヒスチジン、c; β -アラニンおよびアンセリンの変動と生合成経路、緑色および青色カラムはそれぞれ食前および食後を表す) (論文 2, Fig.5b,c を一部改変)、(d) 大豆イソフラボン由来エクオールの個人差 (線の各色は被験者の違いを表す) (論文 2, Supplemental Fig.5a を一部改変)

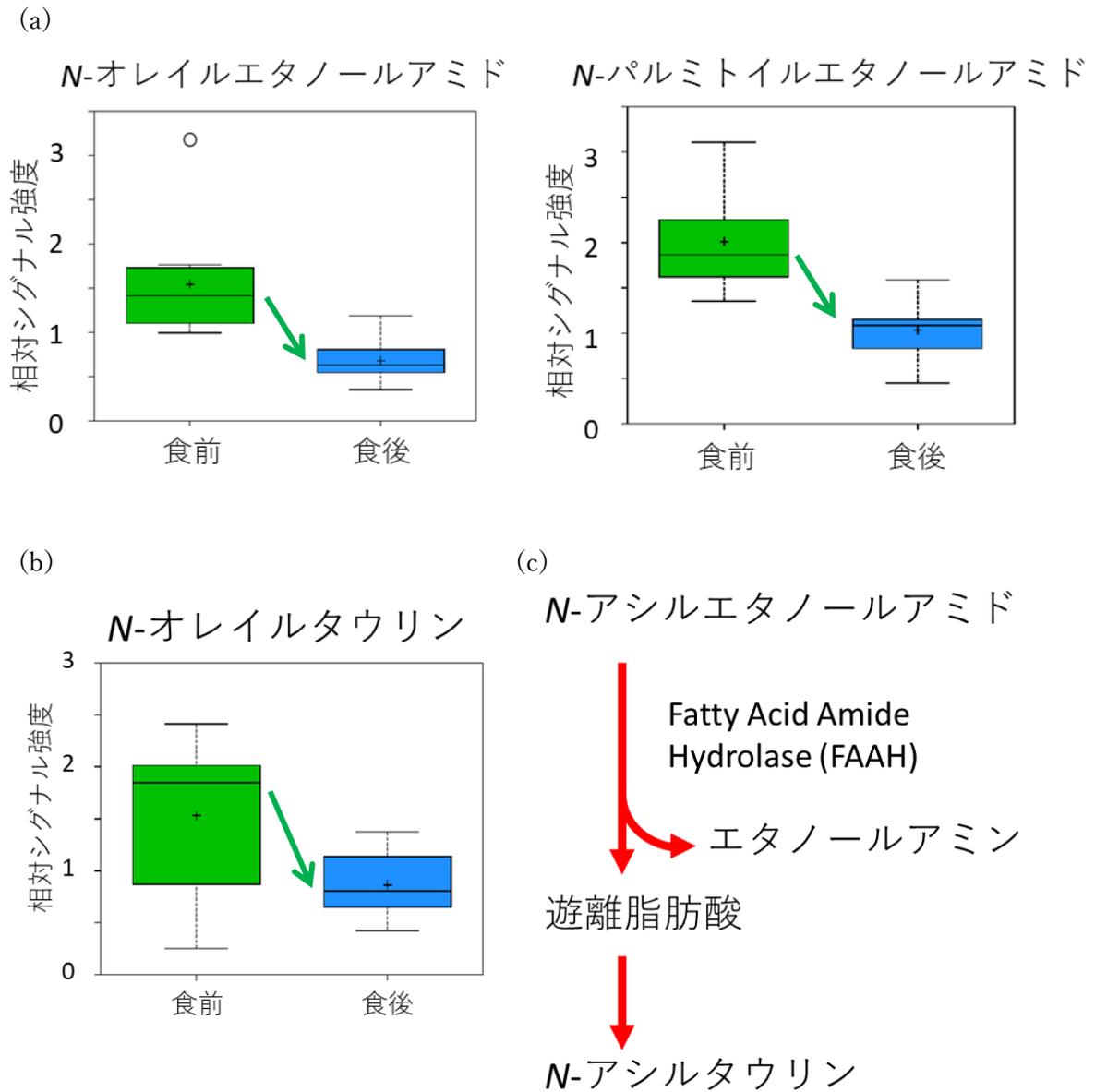


図6 摂食制御脂質の抑制

(a, b) アナンダミド類 (a)、およびアシルタウリン (b) の抑制 (緑色および青色カラムはそれぞれ食前および食後を表す) (論文 2, Fig.6a を一部改変)、(c) *N*-アシルエタノールアミドと *N*-アシルタウリンの推定生合成経路 (論文 2, Fig.6b を一部改変)

第三章

腸内細菌が宿主代謝に及ぼす影響の解析

第一節 序

腸内細菌が合成する代謝物が腸管内だけでなく血液循環を介して全身に輸送され、宿主生理に影響を及ぼすことから、腸内細菌特有の代謝物を含めて解析することはメタボローム研究において必須になりつつある。腸内細菌特異的な代謝物だけでなくタウリンのように宿主と腸内細菌の両方に代謝経路が存在するが、腸内細菌の影響を強く受ける代謝物もある。宿主-常在菌の相互作用解明への期待が大きい現在のメタボローム研究において、このような分子の種類と各臓器における腸内細菌の影響レベルを知ることが強く求められる。こうした背景から、腸内細菌が存在するマウスと存在しないマウスの比較メタボローム解析を実施し、腸内細菌の影響を調べた結果が2008年頃から報告され始めた。

当初は無菌マウス (GF) と通常飼育動物 (SPF) の比較結果が報告された (44, 86)。腸管内容物、尿と各種臓器、あるいは血清を用いて比較解析されているが、NMR や旧タイプの質量分析計を用いているため、いずれも100に満たない検出代謝物数に限られた。変動が認められた代謝物としても腸内細菌の影響が強いことが良く知られた芳香族アミノ酸由来代謝物や二次胆汁酸の一部に留まっている。加えて GF は帝王切開で摘出された後に別系統のマウスに育てられ飼育環境が SPF とは大きく異なることから GF と SPF の比較は腸内細菌の有無以外の変動要因が大きく入る。その後、この点を解決するべく GF に同系統の SPF マウス糞便を経口投与して脱無菌化したマウス (ExGF) を作成し、GF と比較解析することが最も正確と考えられるようになった。松本らは GF と ExGF の血液、盲腸内容物 (46)、脳 (87) のメタボローム解析結果を報告している。CE-MS を用いることによって180程度の水溶性代謝物を分析し、ExGF で有意に増減したものを抽出した。この研究ではアミノ酸を中心として、糖、核酸など多くの水溶性代謝物の変動が報告されており、腸内細菌によって増加する代謝物だけでなく減少する代謝物も検出されている。しかし脂溶性代謝物の情報は無く、また分析した部位に限られるために宿主生理に対する影響を検討するに至っていない。

その後、ヒト乳児糞便を投与したマウスと GF について糞便や尿を用いた比較メタボローム解析が行われた (88)。ドナーによって代謝プロファイルが異なる事から腸内細菌の有無だけでなく、その種類や割合の違いによって宿主全体の代謝プロファイルが変わることが明確に示された。さらに ExGF を作成する過程、即ち SPF 糞便投与後のメタボローム経時変化が解析され (89)、*scyllo*-および *myo*-イノシトール、グルタミン、グリシン、アラニンなどは移植直後に短期的に大きく変動すること、それには宿主の遺伝子発現が関連しており、腸内細菌が生産する代謝物だけでなく細菌が腸内に侵入することで宿主側が反応し、それがメタボロームに影響することが報告された (89)。また2種の菌株のみを投与し、メタボロームの経時変化を追跡した試験においても同様に短期的に大きく変動する代謝物の存在が指摘された (90)。

以上のように腸内細菌の影響が様々な角度から検討されており、それによって宿主-腸内細菌相互作用の一端が浮き彫りにされている。細菌叢の違いがメタボロームに与える影響を調べることによって腸内細菌叢を制御する生理的意義が明らかとなり、病態の原因究明や治療の可能性を検討する上で有用な情報となる。また宿主側の遺伝子発現やタンパク質の変動と合わせて検討することによって宿主側の生理的变化を見出すことに繋がる。

本研究では宿主の様々な部位において腸内細菌のメタボロームへの影響を調べ、部位による違いを検討することにより、宿主機能と腸内細菌の関係性に別の視点が加えられると考えた。まず腸管内容物を4部位（近位小腸、遠位小腸、近位大腸、遠位大腸）に分割し、血漿、肝臓、腎臓、さらには糞便と尿という合計9部位について腸内細菌の有無によるメタボロームの違いを解析した。第1章、第2章と同様に1,000を超える代謝物データを取得した。異なる腸管部位の解析によって各代謝物の生成部位を調べると同時に宿主消化機能への影響を解析した。また血漿や糞、および尿の解析ではそれぞれの代謝物がどのように吸収され排泄に至るかを検討した。さらには組織の解析からそれぞれにおける蓄積のレベルや宿主細胞の代謝機能に与える影響を検討した。

第二節 材料および方法

動物

無菌マウス (GF)、SPF マウス (SPF)、および無菌マウスに同系統 SPF マウスの糞便を投与した脱無菌化マウス (ExGF) を用いた全ての動物試験は三協ラボサービス社にて実施した。8匹の無菌 C57BL/6N を γ 線滅菌 (50Gy) した CMF 給餌で7週齢まで飼育し、4匹ずつ2群に分割した。一方の群は同系統同週齢の SPF 新鮮便の生理食塩水懸濁液を経口投与し、腸内細菌叢定着のためにさらに4週間ビニルアイソレーターで維持した。もう一方の群は新鮮便の代わりに滅菌生理食塩水のみを経口投与し、同様に4週間、別のビニルアイソレーター内で飼育した (図 1a)。解剖の前日に糞便と尿サンプルを取得した後、一晚絶食させた。再給餌開始5時間後にマウスを解剖し、血漿、腸管内容物、肝臓、腎臓を採取した。腸管内容物は小腸前半部 (主に空腸)、小腸後半部 (主に回腸)、大腸前半部 (主に盲腸)、大腸後半部 (主に大腸) の4部位に分割して採取した (図 1b)。血液は腹部下大静脈から取得し、EDTA 添加後に遠心した上清を血漿サンプルとした。すべての動物実験は三協ラボサービス社の動物倫理委員会の承認を受け、同社規定のガイドラインに従った。

16S rRNA ゲノム解析

各腸管内容物および糞便から ISOFEAL DNA Isolation Kit (ニッポンジーン社) を用いて菌体内のゲノム DNA を単離した。16S rRNA の可変領域内の V3-V4 部分を Illumina 社マニュアルに従って以下のプライマーを用いて増幅した。

Fw primer;

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

Rv primer;

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAA
TCC

PCR産物にIllumina社Nextera XT Index Kit v2を用いてインデックス配列を付加した後、すべてのアンプリコンを混合し、次世代シーケンサーMiSeqによってDNA配列を解析した。取得したシーケンスリードはQIIMEソフトウェアを用いて細菌叢解析を実施した(91)。得られたシーケンスリードの不要部分を除いた後、5bp以上のホモポリマー、200bp未満のキメラを除いた。OTUの取得はOpen Reference法を用い、Greengeneデータベースに対して97%以上の相同性を1OTUの基準とした。

メタボローム解析

タンパク質除去のためにメタノールを添加して遠心分離を行った。上清を4画分に分注し、以下の4つの分析プラットフォームに適合した溶媒に溶かしてLC-MS/MS用サンプルとした。LC-MS/MS分析ではWaters社Aquity UPLCとThermo Fischer Scientific社Q-Exactive(プローブ;H-ESI)を使用し、分解能35,000 unitで分析した(56-58)。

① 逆相酸性ポジティブモード(低極性)

カラムにWaters社UPLC BEH C18(2.1×100 mm, 内径1.7µm)を用い、移動相Aとして水を、移動相Bとして0.05%のペンタフルオロペンタノイン酸(PFPA)及び0.1%のギ酸入りメタノールを使ったグラディエントモードで行った。

② 逆相酸性ポジティブモード(高極性)

①と同じカラムを用いて0.05%のPFPA及び0.01%のギ酸入りメタノールを用い、より溶媒濃度が高いグラディエントモードで行った。

③ 逆相塩基性ネガティブモード

カラムにWaters社UPLC BEH C18(2.1×100 mm, 内径1.7µm)を用い、移動相Aとして水を、移動相Bとして6.5mMのNH₄HCO₃入りメタノールを使用したグラディエントモードで行った。

④ HILIC ネガティブモード

カラムにWaters社UPLC BEH Amide(2.1×150 mm, 内径1.7µm)を用い、移動相Aとして水を、移動相Bとして6.5mMのNH₄HCO₃入りアセトニトリルを使用したグラディエントモードで行った。

データ解析と統計

各部位についてすべての個体由来サンプルを同量ずつ集めたプールマトリクスを調製し、実サンプル測定の数本おきに分析した。それぞれの代謝物量（面積値）をプールマトリクスサンプルの平均に対する相対値（相対シグナル強度）に変換した。検出下限以下のサンプル値は測定できたサンプルの最小値で置き換えた。統計解析に際しては、すべての相対値を自然対数に変換し、統計解析ソフトウェア“R” (<http://cran.r-project.org/>) を用いた。GF 群と ExGF 群間の有意差検定には Welch の t 検定の p 値で評価し、 p が 0.05 未満の場合に有意とした。主成分分析には MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/faces/home.html/>) を用いた (92)。

第三節 結果

腸管の各部位への腸内フローラ静着

本研究では腸内細菌の有無が宿主メタボロームへ及ぼす影響を正確に評価するため、ドナーSPF の腸管細菌叢が上流から下流まで ExGF で再現されるかを検討した。糞便の経口投与 4 週間後に動物を解剖し、SPF（ドナー）と ExGF（レシピエント）から 4 部位に分けた腸管内容物を採取し、これらの腸内細菌叢を 16S rRNA アンプリコンシーケンスによって解析した。結果、ExGF の腸管各部位の細菌叢は SPF の対応する部位における細菌叢にほぼ一致した (図 1c)。小腸内容物は近位、遠位ともに *Lactobacillus* で占められる一方、大腸内は多様な細菌叢で構成された。以上の結果から ExGF の腸内細菌叢は通常的环境下で生まれた SPF と同じものが再現されており、腸内細菌が宿主メタボロームに与える影響を評価するのに適切なモデルであることを確認した。

メタボローム解析結果の概要

9 部位の包括的メタボローム解析により計 1716 代謝物のデータを取得し、代謝物プロファイリングを主成分分析によって部位別に比較した (図 2a)。すべてのマトリクスで各サンプルのプロットが GF と ExGF の各群に分かれることから、腸内細菌が存在する腸管内容物や糞便だけではなく、離れた組織でも GF と ExGF は異なる代謝プロファイルを有することが示された。

各部位で検出された代謝物数を図 2b に表し、有意に増加、減少したものの数をそれぞれ黒と灰色でハイライトした。腸管内では変動代謝物数が上部から下部にかけて次第に増加しており、腸内細菌の数および多様性の増加と相関した (図 1c および図 2b)。例えば腸内細菌叢の多様性に富んだ遠位大腸では検出された代謝物のうち 71.7% が有意に増加または減少し、変動した割合が最も大きかった (図 2b, Total)。腸管内容物や糞便と比較して血漿、肝臓、および腎臓での変動代謝物数は比較的少ないながらも全体に占める割合はそれぞれ 29.9、21.5、および 24.9% と明確な違いを認め、また尿中で増加した代謝物数は上記 3 臓

器に比較して著しく多かった (図 2b, Total)。代謝カテゴリー (アミノ酸、炭水化物、脂質、核酸、ビタミン、生体異物) に分類して内訳を調べると、いくつかの特徴が明確に表れた。肝臓ではアミノ酸など水溶性代謝物の変動は比較的少なかったが、脂質に関しては肝臓でも他と同程度の増加代謝物変動を認めた (図 2b, Amino acids および Lipids)。一方でアミノ酸と外来異物に対する腸内細菌の影響は尿中において非常に顕著だった (図 2b, Amino acids)。肝臓で水溶性代謝物より脂質の変動が認められやすいのは肝臓で脂質が蓄積し易いことを反映していると考えられた。また、尿中での変動代謝物数がアミノ酸や外来物質で多かったことから腸内細菌特異的代謝物、中でも特に水溶性代謝物は腎における再吸収を受けずに効率的に排泄されていることが考えられた (図 2b, Amino acids および Xenobiotics)。

腸内細菌による宿主消化活性の促進

4 部位の腸管内容物における 20 種類のタンパク質構成アミノ酸のプロファイルを図 3 に示した。近位小腸ではほとんど影響が無いのに対して (図 3a)、遠位小腸ではこれら 20 のアミノ酸が ExGF で劇的に、また同じ割合で増加した (図 3b)。食物由来のタンパク質が主に小腸で分解されることを考慮すると、構成アミノ酸の共通した増加は ExGF に定着した小腸常在菌による消化促進効果と考えられる。対照的に大腸では構成アミノ酸の多くが ExGF で急激に減少した (図 3 および d)。次項で述べるように、これは大腸常在菌がアミノ酸を効率的に代謝した結果と考えられる。また遠位小腸において 3-メチルヒスチジンや 5-ヒドロキシリジンが腸内細菌移植によってヒスチジンやリジンと同等に増加した (図 4a)。ヒスチジンの 3 位メチル化やリジンの 5 位ヒドロキシル化は食肉中のミオシンやアクチンタンパク質で特異的に起きることから (76, 93)、これらアミノ酸の増加も、腸内細菌が宿主消化を促進したことを示すものと考えられた。

食物由来の脂質には C16 あるいは C18 ベースのアシル基を持つ遊離脂肪酸、例えば C16:0 (パルミトイル)、C18:0 (ステアロイル)、C18:1 (オレイル) 等から構成される脂質エステルを多く含む。そこで腸内細菌の脂質分解に対する効果を C16-および C18-ベースの遊離脂肪酸に絞って検討した (図 3e)。近位および遠位小腸、即ち主に脂質分解が行われる部位では、ステアリン酸以外のすべての分子が ExGF で顕著に増加した。同様の増加傾向は大腸や糞便でも認められ、C18 ベースの遊離脂肪酸でこの傾向がより強かった。以上の結果から腸内細菌が脂質の消化にも寄与していると考えられた。すべての分子は血漿、肝臓、腎臓でも概ね腸内細菌の移植によりこれらの脂肪酸が増加傾向にあり、吸収によって全身に影響を与えていると推定された。

大腸における腸内細菌特異的な代謝物の生産

イミダゾールプロピオン酸、ピペコール酸は哺乳類の代謝経路には存在しない代謝物で、それぞれヒスチジン、リジンから腸内細菌が特異的に生合成するか、あるいは食物として摂

取する代謝物である (94, 95)。これらの代謝物は遠位小腸では GF と ExGF の差が小さいが、遠位大腸では ExGF 特異的に検出された (図 4a および b)。さらに血漿中でも上昇したことから、腸内細菌が産生したものが腸管吸収によって組織レベルにも影響したと考えられた (図 4c,d)。本研究で腸管各部位の比較メタボローム解析を実施したことにより、前項の小腸における消化促進作用と大腸における細菌代謝物の増加という明確な違いが、初めて示された。

Table 1 に本研究で認められた腸内細菌特異的代謝物、および特異的反応をまとめた。イミダゾールプロピオン酸、ピペコール酸と同様に良く知られた芳香族アミノ酸の細菌代謝物や分岐鎖アミノ酸の細菌代謝物、短鎖脂肪酸、二次胆汁酸、ビタミンなどが ExGF で顕著に上昇しており、先行研究を再現した (44, 46, 87-90)。また一次胆汁酸のタウリン脱抱合やグリシン脱抱合の腸内細菌特異性が明確に表れた。Table 1 に示された代謝物には、エクオール (大豆イソフラボン由来代謝物、即ち食品含有物質の腸内細菌代謝産物) も含まれていた (96)。Table 1 には過去に腸内細菌由来であることが示されたもの以外に、新たに腸内細菌によって顕著に増加することが確認された分子が含まれている。コレステロール合成中間体であるメバロン酸、メバロノラクトンが腸管内で顕著に上昇しており、腸内細菌がユビキノン、マナキノン、ドリコールなどを増殖に必要としているためにその生合成中間体合成の増加が表れたものと考えられた。また HODE や DiHODE といった過酸化脂質が腸管内で共通に増加している現象が観察されており、これらは腸内細菌が ROS の発生を促進し、脂質の酸化が亢進したことが可能性として考えられる。ポリアミン合成系の N_1 , N_{12} -ジアセチルスペルミジンも腸内細菌による影響がこれまでに報告されていない代謝物であった。

腸内細菌による肝臓スフィンゴシンの全般的な低下

本研究で新たに見出された宿主組織における腸内細菌の影響として ExGF におけるスフィンゴ脂質の全般的な低下を挙げるができる (図 5)。スフィンゴ脂質の *de novo* 生合成経路はセリンパルミトイルトランスフェラーゼによってセリンとパルミチン酸から 3-ケトスフィンガニンが合成される反応からスタートし、スフィンガニン、ジヒドロセラミド、セラミドといった中間体を経て生体膜を構成するスフィンゴミエリンが生成する (図 5a)。複数の G タンパク質共役型受容体を介して多様な生理作用を発揮するスフィンゴシン-1 リン酸 (S1P) は、セラミドからスフィンゴシンを経て生成する (97)。ExGF の肝臓において 3-ケトスフィンガニンからスフィンゴミエリンに至るすべての生合成中間体が減少し (図 5a)、様々な鎖長のスフィンゴミエリンもすべて減少した。(図 5b)。肝臓はスフィンゴ脂質の *de novo* 合成が活発な臓器であり (98)、本結果は腸内細菌が未知のメカニズムを介して肝臓におけるスフィンゴ脂質合成を抑制した可能性が考えられた。(99 および次節)。

第四節 考察

腸内細菌研究の飛躍的発達に伴って彼らが内在性低分子代謝物、生理活性ペプチドやタンパク質を介して宿主生理に影響を及ぼす現象が多数報告されている。特に低分子代謝物は腸管からの吸収と循環血による運搬を介して、中枢神経系を含む腸管から離れた組織にも影響を及ぼす。腸内細菌が各部位の代謝物に及ぼす影響を調べるために腸内細菌が存在する動物と存在しない動物の比較が過去にも実施されている (44, 46, 87-90)。しかし、これらの研究は部位が限定され、各代謝物の産生、吸収、蓄積、排泄等を網羅した包括的な情報となっておらず、検出代謝物も 200 未満と現代のメタボローム解析としては少ない。また GF に対する比較対象として SPF など腸内細菌以外に GF と異なる影響を受けている動物を用いた研究も含まれる。本研究では腸内細菌の影響を抽出するモデルとして GF に後天的に SPF の腸内細菌叢を移植して ExGF を作成し、GF との比較を行った。また多くの研究は糞便や血漿の解析に留まり、部位による影響の受け方の違いまで調べていないために宿主機能への影響について十分に考察されていない。そこで GF と ExGF それぞれについて異なる 9 部位を取得し、1,000 を超える代謝物データを取得した。

本研究で示された腸内細菌の各代謝物への影響は部位によって異なり、その違いはそれぞれにおける宿主-細菌叢の機能的相互作用や代謝物の物性を反映していた。例えば小腸では腸内細菌の存在によって多くの代謝物の増加が認められたが、それらの多くは食物由来タンパク質や脂質などの消化物であった (図 3)。遠位小腸内容物でも腸内細菌特異的なものが検出されたが、それ以上に宿主消化活性の促進作用が特徴として表れた。腸内細菌による消化促進作用として食物由来繊維質の分解による短鎖脂肪酸の産生について報告されているが (100)、他の食物消化物に関しては報告されていない。本研究では遠位小腸でタンパク質の構成アミノ酸の一つ一つが同等の割合で大きく上昇すること、食物由来遊離脂肪酸が顕著に上昇することが確認され、腸内細菌が宿主消化活性へ全般的に寄与することが明らかになった。こうした消化促進作用が細菌そのものによる食物成分の分解の結果なのか、あるいは宿主膵臓からの消化酵素の分泌誘導や活性化によるものかを結論付けるにはさらなる検討が必要である。クローン病患者の臨床研究の中で *Bacteroides* 属のレベルが便中トリプシン活性と強く相関するという報告があり (101)、腸内細菌が宿主の膵液分泌やトリプシン活性化を誘導している可能性がある。小麦に含まれるグルテンの消化に起因するセリアック病の重篤度と腸内細菌叢の関連性が報告されており (102)、宿主消化機能に腸内細菌が関わるメカニズムの解明は病態理解の上でも注目される。

本研究で検出された腸内細菌由来のアミノ酸代謝物は宿主病態生理との関連が数多く報告されている。フェノール類、インドール類等の芳香族アミノ酸由来代謝物は詳しく研究されているものが多く、既に慢性腎不全治療薬の開発を目指して生合成阻害薬が具体的に検討されている (40)。腸内細菌によってヒスチジンから合成されたイミダゾールプロピオン

酸は Roux-en-Y 胃バイパス手術と垂直スリーブ胃切除術の両方で上昇が認められ、予後が極めて良好な肥満外科手術のベネフィットに関連している可能性がある (103)。リジン代謝物のピペコール酸は喘息との関連が報告されている他 (104)、脳機能との関連性が認められている (105)。本研究で腸内細菌の影響が非常に強いことが見出された過酸化脂質類は慢性・急性に関わらず炎症性疾患との関連が高い (106)。さらにイタリアのコホート研究では長寿と深い関連がある因子として 9-HODE などの過酸化脂質と腸内細菌叢の関連性が指摘されている (107)。その他、腸内細菌由来代謝物と疾患の関連についての報告が増加しており、腸内細菌特異的なものだけでなく、腸内細菌の影響レベルが高い代謝物に関する情報は今後のこの分野の研究に有用に用いられる。

本研究により肝臓のスフィンゴ脂質レベルが腸内細菌によって大きく減少することが明らかにされた。生合成中間体を含めて全般的にスフィンゴ脂質代謝物が低下しており、*de novo* 合成が低下した可能性が考えられる。スフィンゴ脂質は膜構成成分として生体にとって必須の働きをする一方、ストレス誘発性分子としてインスリン分泌、血管機能障害、神経変性疾患、癌化への関連性が報告されている (108)。故に本研究において宿主側でスフィンゴ脂質が劇的に変動した結果は、今後の創薬標的として新たな分子や菌種を考える可能性を示唆する。腸内細菌が腸管から離れた臓器の脂質生合成活性に影響を与えた可能性を示すものとして大変興味深い現象であるが、*de novo* 合成系への影響を確かめるには、安定同位体標識されたセリン (スフィンゴ脂質生合成の初発物質) を GF や ExGF に静脈投与し、肝臓や血液中のラベル化スフィンゴ脂質を追跡することが有効と考えられる。

以上、腸内細菌の有無による代謝物の違いをメタボローム解析することによって、腸内細菌特異的な代謝物や腸内細菌の影響を受けやすい代謝物を明らかにした。また腸内細菌の影響が部位によって異なることから宿主に対する影響を推定した。得られた結果は今後、様々なメタボロームデータを解釈する際に腸内細菌の影響を判断し、機能的役割を推定する上で有用な情報となる。

第五節 図表

すべての図表は *Metabolomics* (2017) 13, 101, DOI 10.1007/s11306-017-1240-9 (論文 3) より転載した。

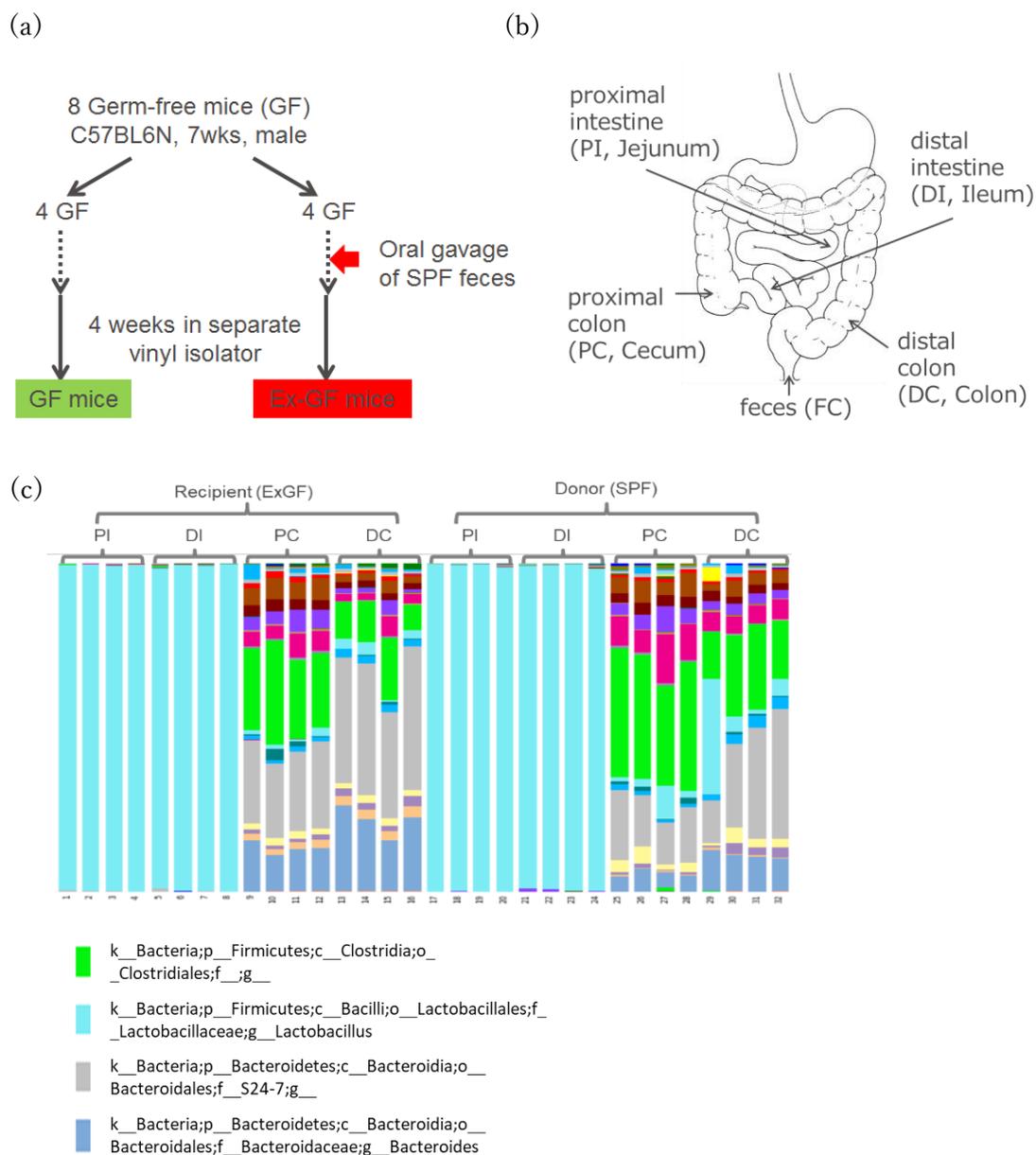


図1 ExGF マウスの樹立と腸管内細菌叢解析

(a) ExGF マウスの樹立法アウトライン (論文 3, Fig.1a を一部改変)、(b) 取得腸管部位と略称 (論文 3, Fig.1b)、(c) SPF マウス (ドナー) と ExGF マウス (レシピエント) の 16SrRNA 解析による菌叢比較 (論文 3, Fig.1c を一部改変)

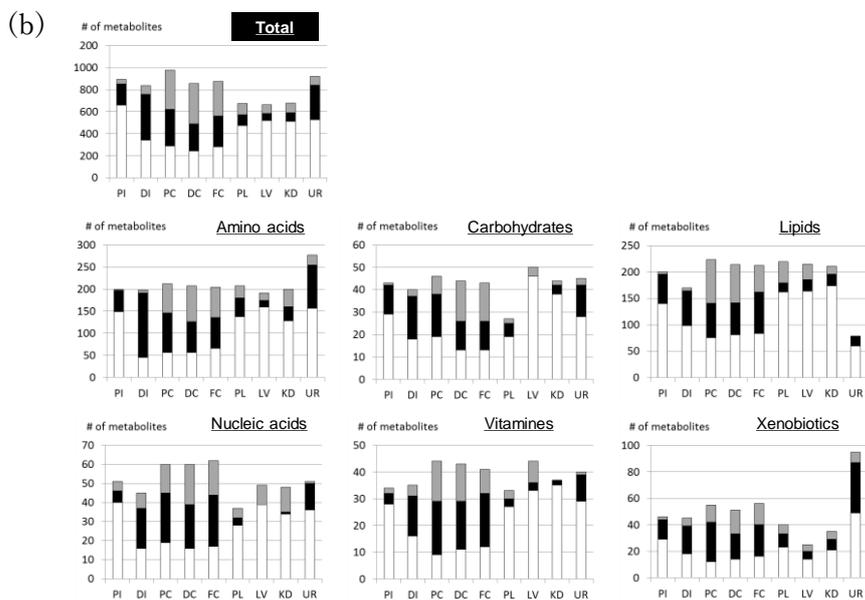
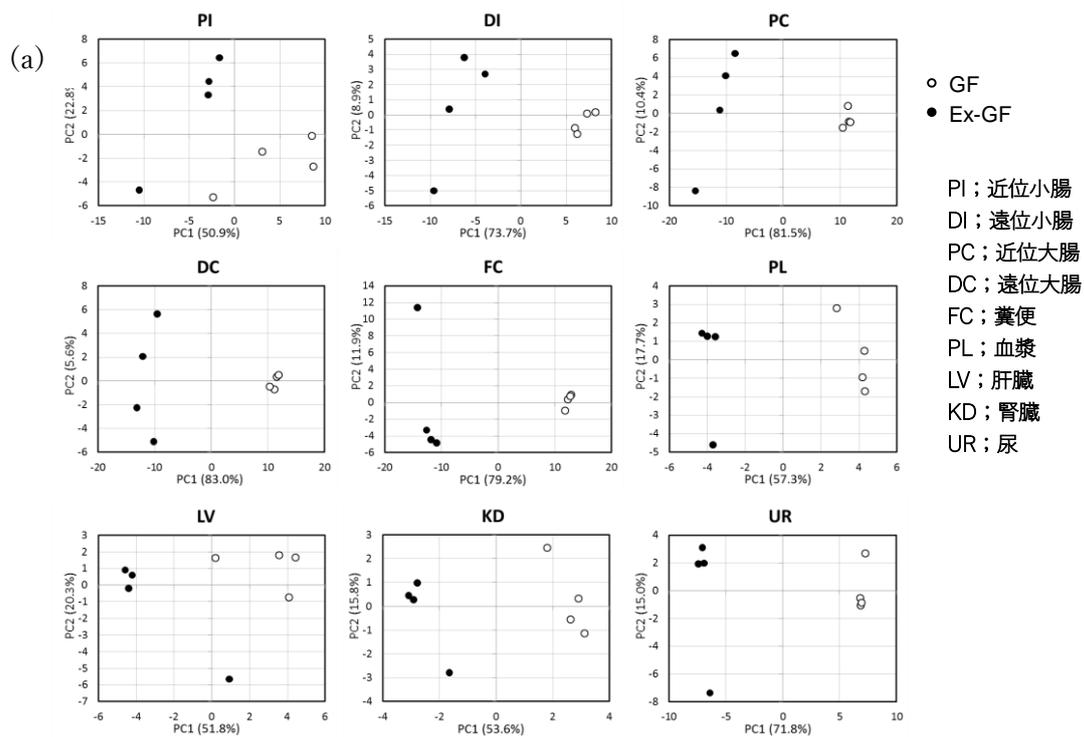


図2 GF と ExGF の代謝プロファイル比較

(a) 各部位における主成分分析 (白ドット; GF、黒ドット; ExGF) (論文 3, Fig.2a を一部可変)、(b) 検出代謝物数と変動代謝物数 (白カラム; 変動が無かった代謝物数、黒カラム; 腸内細菌が移植により増加した代謝物数、灰色カラム; 腸内細菌が移植により減少した代謝物数) (論文 3, Fig.2b および Supplemental Fig.1 を一部改変)

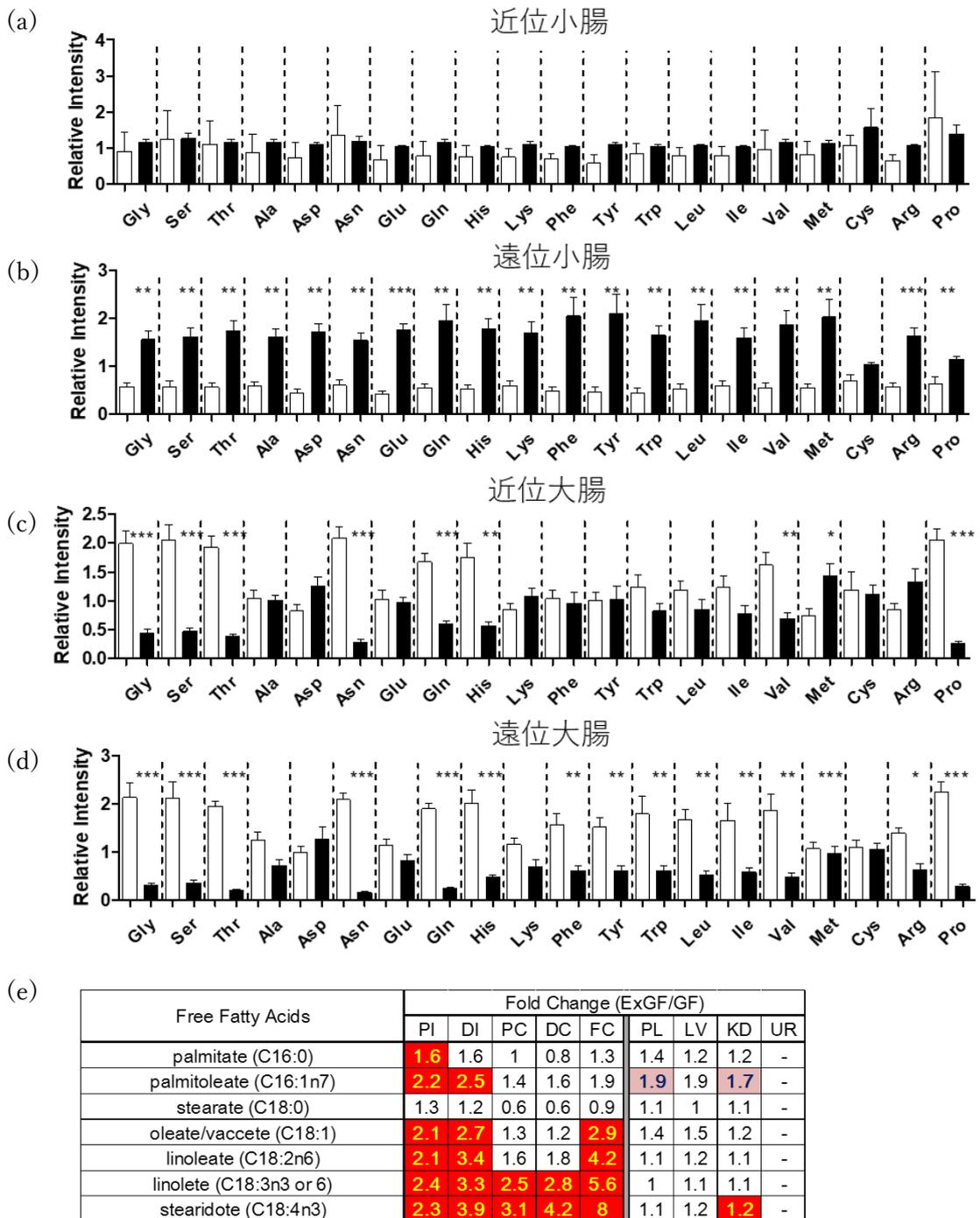


図3 腸内細菌による宿主消化作用の促進

(a-d) 腸管各部位におけるタンパク質構成アミノ酸の変動(白カラム;GF、黒カラム;ExGF、アスタリスクは有意差を表す、* ; $p < 0.05$ 、** ; $p < 0.01$ 、*** ; $p < 0.001$) (論文 3, Fig.3 を一部開園) C₁₆ および C₁₈ ベース遊離脂肪酸の各部位におけるヒートマップ (赤 ; 有意に増加 ($p < 0.05$)、薄赤 ; 増加傾向 ($p < 0.1$)、- ; いずれも未検出) (論文 3, Supplemental Fig.3)

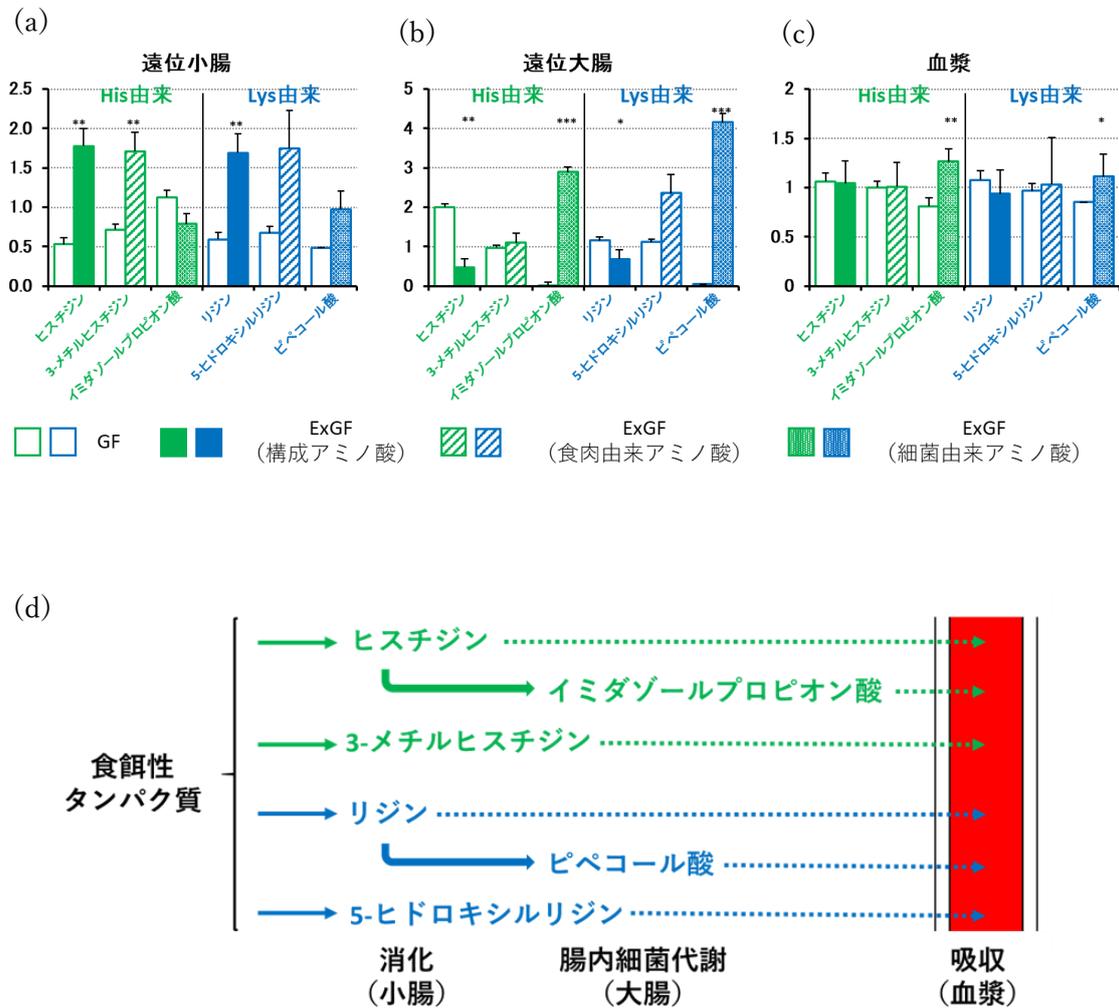


図4 腸内細菌によるヒスチジン、リジン代謝への影響

(a-c) 各部位におけるヒスタミン、リジンおよび関連代謝物の相対比較（白カラム；GF におけるすべての代謝物、黒カラム；ExGF における構成アミノ酸、灰カラム；ExGF における食肉消化物、灰カラム；ExGF における腸内細菌特異的代謝物、アスタリスクは有意差を表す、*； $p < 0.05$ 、**； $p < 0.01$ 、***； $p < 0.001$ ）（論文 3, Fig.4a-c を一部改変）、(d) 各アミノ酸代謝物の産生と吸収（論文 3, Fig.4d を一部改変）

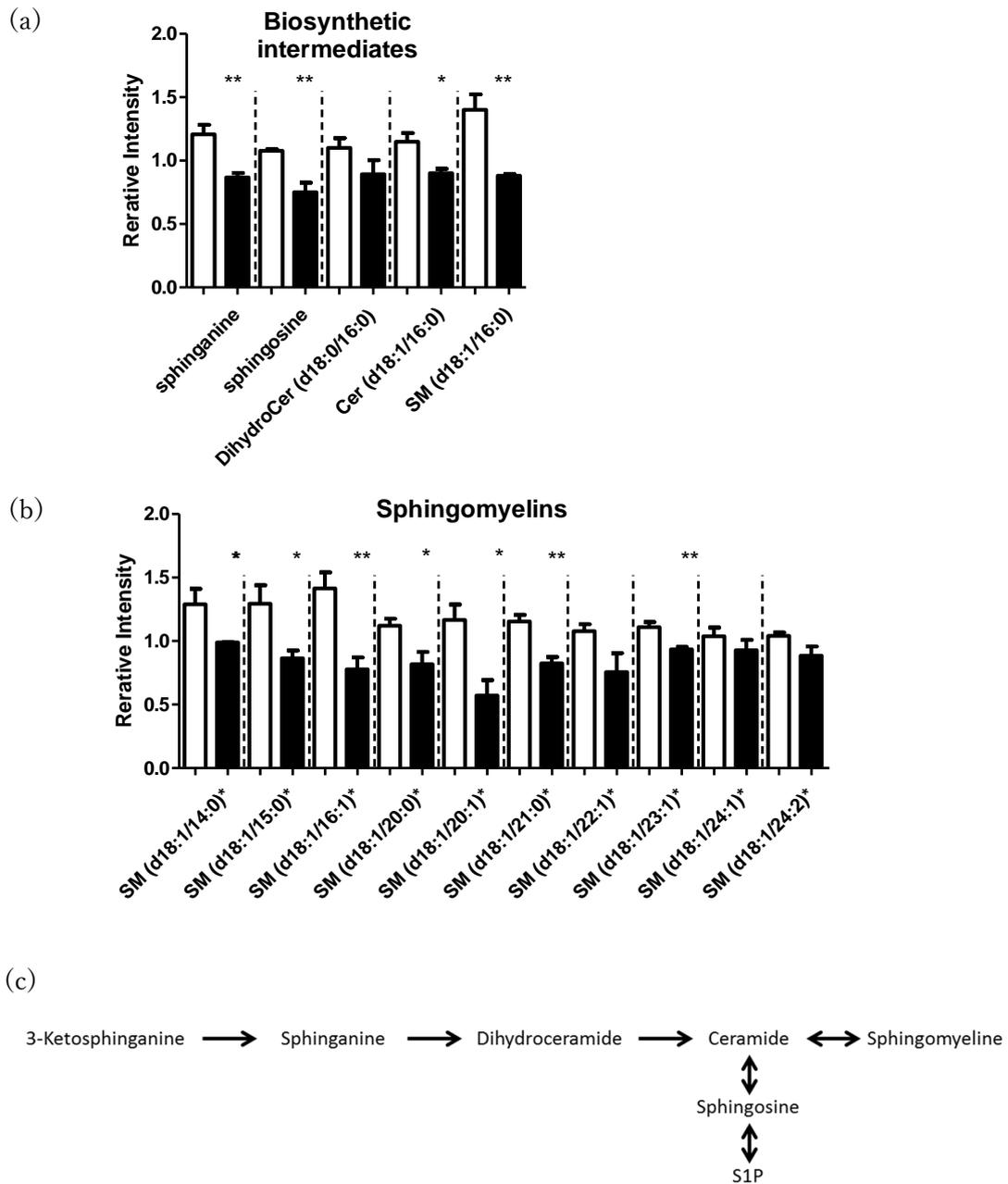


図5 腸内細菌によるスフィンゴ脂質への影響

(a, b) 肝臓における影響 (論文 3, Fig.5a,b) ; (a) *de novo* 生合成中間体、(b) 各種スフィンゴミエリン (白カラム ; GF、黒カラム ; ExGF、アスタリスクは有意差を表す、* ; $p < 0.05$ 、** ; $p < 0.01$)、(c) スフィンゴ脂質生合成経路 (論文 3, Fig.5c)、(d) すべての臓器におけるヒートマップ ; 赤 ; 有意に増加 ($p < 0.05$)、薄赤 ; 増加傾向 ($p < 0.1$)、緑 ; 有意に減少 ($p < 0.05$)、薄緑 ; 減少傾向 ($p < 0.1$)、GF ; GF でのみ検出、ExGF ; ExGF でのみ検出、- ; いずれも未検出 (論文 3, Supplemental Fig.5)

Pathway	Bacterial Biomarkers
Lysine Degradation	Pipecolate, Cadaverine
Polyamine Biosynthesis	<i>N</i>₁, <i>N</i>₁₂-Diacetylspermidine
Histidine Degradation	Imidazole derivatives, Acetylhistamine
Tryptophan	Indole derivatives
Phenylalanine, Tyrosine	Benzoate derivatives, Cinnamate derivatives, Phenol derivatives, Phenylpyruvate derivatives
Creatine Degradation	Saccarosine
Valine Degradation	3-Methyl 2-oxobutyrate, α -Hydroxyisocaproate
Leucine Degradation	3-Methyl-2-oxooxvalerate, 2-Hydroxy-3-nethylvalerate, Ethylmalonate
Isoleucine Degradation	4-Methyl-2-oxopantoneate, α -Hydroxyisocaproate, Methylsycinate
Terpenoid Backbone Biosynthesis	<i>Mevalonate, Mevalonolactone</i>
Bile Acids	Free Foams of Primary Bile Acids, Secondary Bile Acids
Inflammatory and Oxidative Reaction	<i>9- and 13-HODE, 12, 13-, and 9-, 10-DiHODE</i> , Kynurenine derivatives
NAD ⁺ Salvage Pathway	Nicotinate, Nicotinamide, Nicotinamide Ribonucleotids, FMN
Neurotransmitters	Serotonine, Acetyl-CoA
Isoflavonoids	Equol

表 1 本研究で認められた顕著な腸内最近の影響（バクテリアマーカー）、赤字で表した代謝物は本研究で見出されたもの（論文 3, Table 1 を一部改変）

第四章

総括と今後の展望

生体反応を理解するために分析の対象となるのは主にゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームである。このうちメタボロームは最も表現型に近く、メタボロームを解析することによって病態の重篤度を示すバイオマーカーが見出され、創薬ターゲットの発見に繋がることもある。例えば前立腺癌の転移能と内在性代謝物のカルノシン量に正の相関が認められた事実をベースとして、カルノシン合成酵素のノックダウンにより癌細胞の浸潤が抑制されることが見出された (109)。病態と健常の比較メタボローム解析等が病態メカニズムの解明やバイオマーカー発見に利用されている一方で、本研究で取り上げたように食事や腸内細菌などの影響を含むことから、個々の内在性代謝物のそうした外的因子による影響を理解することはデータを解釈する上で必須となる。また比較可能なデータを得るための試験プロトコール作成のために、検体取得タイミングや保存条件による影響も重要な基本情報となる。

世界的に臨床研究の重要性が高まるにつれて、内在性代謝物が個々に有する外的/内的因子の影響を理解する事の重要性が認識され、アメリカでは NIST を中心として標準分析法や標準データの整備が行われている (110)。様々な先鋭的な技術が開発され、疾患サンプルが分析されることによって大変興味深い事実が明らかになるが、分析法やサンプリング方法、保存方法が異なると比較が難しく、再現性が得られないこともある。試験方法を標準化することでこうした問題を解決し、様々な試験バッチ間の比較を行うことも考えられている。また価値あるサンプルを優れた技術で分析し、非競合的に共有するという考え方も議論されている。

日本でも武田薬品、アステラス、第一三共による健常人メタボロームのベースラインデータ取得の共同研究が発表されている (111)。腸内細菌研究についてもマイクロバイオーームコンソーシアムが立ち上がり、メタボロームだけでなく、メタゲノム解析のための次世代シーケンスデータの取得・解析方法や糞便のサンプリング方法の標準化、さらには健常人データの整備が検討されている (112)。日本は医薬品の市場価値が高いこと、市場が拡大している中国へ日本人データ外挿性が期待されていることから、日本人の臨床研究結果は欧米も注目している。また日本人の健康長寿が日本人の体質によるものか、日本食が寄与しているのかなどを解析するために、標準方法を設定して臨床データを早くから取得することは世界的に見ても意義がある。

本研究では保存条件、食事、腸内細菌という3種の外的因子の影響を網羅的に取得した。これ以外にもメタボロームに影響を与える様々な外的/内的因子がある。試験プロトコールに由来するものとしては血球細胞が存在する血液状態での保存安定性や溶血、凍結融解の影響が挙げられる。その他にも明暗周期や睡眠等の日内変動、さらに個人差という点で年齢、性差の他、体形などによる影響を理解することは臨床研究を進めて行く上で重要である。さらに生活習慣や住環境の違いによる影響が挙げられる。これらのうち既に報告されているものもあるが、代謝マップ全体を網羅するには1,000以上の代謝物データが必要であり、そこまで大規模な分析結果はほとんど得られていない。網羅的な基盤データ取得には最新の

分析機器・プラットフォーム技術が必要で、かつ結果の高度な解釈が求められるため、費用もかかる場合が多い。そのため、最近では一団体で実施してデータを独占するよりも複数団体で費用を分担して結果を共有するメリットを優先する傾向にある。コンソーシアム的に基盤データを取得し、それを各代謝物のアノテーションとしてバイオインフォマティクスに活用することも検討され始めている。遺伝子にはアノテーションのデータベースが整備され、バイオインフォマティクスの技術によって様々な解析が行われている。一方で内在性代謝物については KEGG や HMDB など優れたデータベースが存在するが、インフォマティクスで解析するにはアノテーション情報が充分とは言えない。今後、様々な基盤変動データが得られることによってメタボロームのアノテーション情報が充実し、メタボロームデータの価値がより上がっていくことが期待される。さらにゲノムトランスクリプトーム・プロテオームといったオミックスデータと統合して解析する上でもアノテーション情報の充実は必須と考えられる。体系的なコンソーシアムの形成や複数企業、アカデミアの参入による協業体制が増加する中で、メタボロームの基盤データが整備され技術が有効利用されることはライフサイエンスの発展に大きく貢献するに違いない。

引用文献

- (1) Yugi K, Kubota H, Hatano A, Kuroda S. (2016) Trans-omics: how to reconstruct biochemical networks across multiple 'omic' layers. *Trends Biotechnol.* 34(4), 276-90
- (2) Dunn WB, Bailey NJ, Johnson HE. (2005) Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst.* 130(5), 606-25
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15852128>
- (3) Højer-Pedersen J, Smedsgaard J, Nielsen J. (2007) Elucidating the mode-of-action of compounds from metabolite profiling studies. *Prog Drug Res.* 64(103), 105-29
- (4) Cheng J, Lan W, Zheng G, Gao X. (2018) Metabolomics: a high-throughput platform for metabolite profile exploration. *Methods Mol Biol.* 1754, 265-92
- (5) Caldwell GW, Leo GC. (2017) Can untargeted metabolomics be utilized in drug discovery/development? *Curr Top Med Chem.* 17(24), 2716-39
- (6) Jacob M, Lopata AL, Dasouki M, Abdel Rahman AM. (2017) Metabolomics toward personalized medicine. *Mass Spectrom Rev.* doi: 10.1002/mas.21548
- (7) de Git KC, Adan RA. (2015) Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. *Obes Rev.* 16(3), 207-24
- (8) Sarao LK1, Arora M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57(2), 344-71
- (9) Krug S, Kastenmüller G, Stücker F, Rist MJ, Skurk T, Sailer M. (2012) The dynamic range of the human metabolome revealed by challenges. *FASEB J.* 26(6), 2607-19
- (10) Lehmann R. (2015) Preanalytics: what can metabolomics learn from clinical chemistry? *Bioanalysis.* 7(8), 927-30
- (11) Cirulli ET, Guo L, Leon Swisher C, Shah N, Huang L, *et al.* (2019) Profound Perturbation of the Metabolome in Obesity Is Associated with Health Risk. *Cell Metab.* S1550-4131(18), 30630-2.
- (12) Trivedi DK, Hollywood KA, Goodacre R. (2017) Metabolomics for the masses: the future of metabolomics in a personalized world. *New Horiz Transl Med.* 3(6), 294-305.
- (13) Ganna A, Salihovic S, Sundström J, Broeckling CD, Hedman AK, Magnusson PK. (2014) Large-scale metabolomic profiling identifies novel biomarkers for incident coronary heart disease. *PLoS Genet.* 10(12) e1004801. doi: 10.1371/journal.pgen.1004801
- (14) Fliniaux O, Gaillard G, Lion A, Cailleu D, Mesnard F, Betsou F, *et al.* (2011) Influence of common preanalytical variations on the metabolic profile of serum

- samples in biobanks. *J Biomol NMR*. 51, 457-65
- (15) Cicognola C, Chiasserini D, Parnetti L. (2015) Preanalytical confounding factors in the analysis of cerebrospinal fluid biomarkers for alzheimer's disease: the issue of diurnal variation. *Front Neurol*. 6, 143. doi: 10.3389/fneur.2015.00143
 - (16) International Expert Committee. (2009) International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 32, 1327–34
 - (17) van Nood E, Dijkgraaf MG, Keller JJ (2013) Duodenal infusion of feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 368(22), 2145
 - (18) Kelly CP. (2013) Fecal microbiota transplantation--an old therapy comes of age. *N Engl J Med*. 368(5), 474-5
 - (19) Choi HH, Cho YS. (2016) Fecal Microbiota Transplantation: Current Applications, Effectiveness, and Future Perspectives. *Clin Endosc*. 49(3), 257-65
 - (20) Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL *et al.* (2013), Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 341(6150), 1241214. doi: 10.1126/science.1241214
 - (21) Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, *et al.* (2016), Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of parkinson's disease. *Cell*. 167(6), 1469-80
 - (22) De Palma G, Lynch MD, Lu J, Dang VT, Deng Y, Jury J. (2017) Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. *Sci Transl Med*. 9(379). pii: eaaf6397. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf6397
 - (23) Fiebigler U, Bereswill S, Heimesaat MM. (2016) Dissecting the interplay between intestinal microbiota and host immunity in health and disease: lessons learned from germ-free and gnotobiotic animal models. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 6(4), 253-71
 - (24) Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R. (2018) Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*. 359(6371), 91-7.
 - (25) Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets TV. (2018) Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 359(6371), 97-103
 - (26) Ma Y, Liu J, Rhodes C, Nie Y, Zhang F. (2017) Ethical issues in fecal microbiota transplantation in practice. *Am J Bioeth*. 17(5), 34-45
 - (27) Woo TD, Oka K, Takahashi M, Hojo F, Osaki T, Hanawa T, *et al.* (2011) Inhibition of the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* in vitro by *Clostridium butyricum*

- MIYAIRI 588 strain. *J Med Microbiol.* 60(Pt 11), 1617-25
- (28) Narushima S, Sugiura Y, Oshima K, Atarashi K, Hattori M, Suematsu M, *et al.* (2014) Characterization of the 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived Clostridia. *Gut Microbes.* 5(3), 333-9
- (29) Quévrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J. (2016) Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut.* 65(3), 415-25
- (30) Chen Z, Guo L, Zhang Y, Walzem RL, Pendergast JS, Printz RL *et al.* (2014) Incorporation of therapeutically modified bacteria into gut microbiota inhibits obesity. *J Clin Invest.* 124(8), 3391-406
- (31) Taniguchi S, Fujimori M, Sasaki T, Tsutsui H, Shimatani Y, Seki K. (2010) Targeting solid tumors with non-pathogenic obligate anaerobic bacteria. *Cancer Sci.* 101(9), 1925-32
- (32) Kinross J, Li JV, Muirhead LJ, Nicholson J. (2014) Nutritional modulation of the metabome: applications of metabolic phenotyping in translational nutritional research. *Curr Opin Gastroenterol.* 30(2), 196-207
- (33) Chang C, Lin H. (2016) Dysbiosis in gastrointestinal disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 30(1), 3-15
- (34) Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L. (2015) Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell.* 161(2), 264-76
- (35) Barisione C, Ghigliotti G, Canepa M, Balbi M, Brunelli C, Ameri P. (2015) Indoxyl sulfate: a candidate target for the prevention and treatment of cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Curr Drug Targets.* 16(4), 366-72
- (36) Levy M, Thaïss CA, Zeevi D, Dohnalová L, Zilberman-Schapira G, Elinav E. (2015) Microbiota-modulated metabolites shape the intestinal microenvironment by regulating NLRP6 inflammasome signaling. *Cell.* 163(6), 1428-43
- (37) Libbey JE, Sanchez JM, Doty DJ, Sim JT, Cusick MF, Cox JE, *et al.* (2018) Variations in diet cause alterations in microbiota and metabolites that follow changes in disease severity in a multiple sclerosis model. *Benef Microbes.* 9(3), 495-513
- (38) Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T. (2013) Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell.* 155(7), 1451-63
- (39) Yu B, Zheng Y, Nettleton JA, Alexander D, Coresh J, Boerwinkle E. (2015) Serum metabolomic profiling and incident CKD among African Americans. *Clin J Am Soc Nephrol.* 9(8), 1410-7
- (40) Enoki Y, Watanabe H, Arake R, Fujimura R, Ishiodori K, Imafuku T, *et al.* (2017)

- Potential therapeutic interventions for chronic kidney disease-associated sarcopenia via indoxyl sulfate-induced mitochondrial dysfunction. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 8(5), 735-747
- (41) Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Hazen SL *et al.* (2013) Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 368(17), 1575-84
- (42) Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, Levison BS, Zhu W, Org E. (2015) Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis. *Cell*. 163(7), 1585-95
- (43) Yang W, Chen Y, Xi C, Zhang R, Song Y, Zhan Q. (2013) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based plasma metabolomics delineate the effect of metabolites' stability on reliability of potential biomarkers. *Anal Chem*. 85(5), 2606-10
- (44) Claus SP, Tsang TM, Wang Y, Cloarec O, Skordi E, Martin FP. (2008) Systemic multicompartmental effects of the gut microbiome on mouse metabolic phenotypes. *Mol Syst Biol*. 4, 219
- (45) Kamlage B, Maldonado SG, Bethan B, Peter E, Schmitz O, Liebenberg V, *et al.* (2014) Quality markers addressing preanalytical variations of blood and plasma processing identified by broad and targeted metabolite profiling. *Clin Chem*. 60(2), 399-412
- (46) Matsumoto M, Kibe R, Ooga T, Aiba Y, Kurihara S, Benno Y. (2012) Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Sci Rep*. 2, 233 doi: 10.1038/srep00233
- (47) Moazzami AA, Shrestha A, Morrison DA, Poutanen K, Mykkänen H. (2014) Metabolomics reveals differences in postprandial responses to breads and fasting metabolic characteristics associated with postprandial insulin demand in postmenopausal women. *J Nutr*. 144(6), 807-14
- (48) Ghaste M, Mistrik R, Shulaev V. (2016) Applications of Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) and Orbitrap Based High Resolution Mass Spectrometry in Metabolomics and Lipidomics. *Int J Mol Sci*. 17(6). pii: E816
- (49) Blaženović I, Kind T, Ji J, Fiehn O. (2018) Software Tools and Approaches for Compound Identification of LC-MS/MS Data in Metabolomics. *Metabolites*. 8(2). pii: E31
- (50) Agarwal S, Vargas G, Nordstrom C, Tam E, Buffone GJ, Devaraj S. (2015) Effect of interference from hemolysis, icterus and lipemia on routine pediatric clinical chemistry assays. *Clinica Chimica Acta*. 438, 241-5
- (51) Torell F, Bennett K, Rännar S, Lundstedt-Enkel K, Lundstedt T, Trygg J. (2017) The

- effects of thawing on the plasma metabolome: evaluating differences between thawed plasma and multi-organ samples. *Metabolomics*. 13(6), 66
- (52) Yin P, Lehmann R, Xu G. (2015) Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies. *Anal Bioanal Chem*. 407. 4879-92
- (53) Yin P, Peter A, Franken H, Zhao X, Neukamm SS, Rosenbaum L. (2013) Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood. *Clin Chem*. 59(5), 833-45
- (54) Pinto J, Domingues MR, Galhano E, Pita C, Almeida MC, Carreira IM, *et al.* (2014) Human plasma stability during handling and storage: impact on NMR metabolomics. *Analyst*. 139, 1168-77
- (55) Zighetti ML, Chantarangkul V, Lombardi R, Lecchi A, Cattaneo M. (2004) Effects of some pre-analytical conditions on the measurement of homocysteine and cysteine in plasma. *Clin Chem Lab Med*. 42, 204-7
- (56) Kleinman WA, Richie JP Jr. (2000) Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. *Biochem. Pharm.* 60, 19-29
- (57) Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, Ueland PM. (1993) Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability. *Clin Chem*. 39, 263-71
- (58) Ohta T, Masutomi N, Tsutsui N, Sakairi T, Mitchell M, Milburn MV, *et al.* (2009) Untargeted metabolomic profiling as an evaluative tool of fenofibrate-induced toxicology in Fischer 344 male rats. *Toxicol Pathol*. 37, 521-35
- (59) Evans AM, Bridgewater BR, Miller LAD, Mitchell MW, Robinson RJ, Dai H, *et al.* (2014) High resolution mass spectrometry improves data quantity and quality as compared to unit mass resolution mass spectrometry in high-throughput profiling metabolomics. *Metabolomics*. 4, Open access
- (60) Evans AM, DeHaven CD, Barrett T, Mitchell M, Milgram E. (2009) Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Anal Chem*. 81, 6656-67
- (61) Storey JD, Tibshirani R. (2003) Statistical significance for genomewide studies. *PNAS*. 100, 9440-5
- (62) Kate DM, Samie RJ. (2014) The dynamic epitranscriptome: *N*₆-methyladenosine and gene expression control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15, 313–26
- (63) Wu XW, Lee CC, Muzny DM, Caskey CT. (1989) Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications. *PNAS*. 86, 9412–6
- (64) Pastor A, Farre M, Fito M, Fernandez-Aranda F, de la Torre R. (2014) Analysis of

- ECs and related compounds in plasma: artifactual isomerization and ex vivo enzymatic generation of 2-MGs. *J Lipid Res.* 55, 966-77
- (65) Fukuto JM, Ignarro LJ, Nagy P, Wink DA, Kevil CG, Feelisch M. (2018) Biological hydropersulfides and related polysulfides - a new concept and perspective in redox biology. *FEBS Lett.* 592(12), 2140-52
- (66) Hamid HA, Tanaka A, Ida T, Nishimura A, Matsunaga T, Fujii S. (2019) Polysulfide stabilization by tyrosine and hydroxyphenyl-containing derivatives that is important for a reactive sulfur metabolomics analysis. *Redox Biol.* 2019 21, 101096. doi: 10.1016/j.redox.2019.101096
- (67) Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *PNAS.* 78, 6858-62
- (68) Kasukawa T, Sugimoto M, Hida A, Minami Y, Mori M, Honma S *et al.* (2012) Human blood metabolite timetable indicates internal body time. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(37), 15036-41
- (69) Davies SK, Ang JE, Revell VL, Holmes B, Mann A, Robertson FP *et al.* (2014) Effect of sleep deprivation on the human metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(29), 10761-6
- (70) Fiamoncini J, Yiorkas AM, Gedrich K, Rundle M, Alsters SI, *et al.* (2017) Roeselers GDeterminants of postprandial plasma bile acid kinetics in human volunteers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 313(4), G300-12
- (71) Badoud F, Lam KP, Perreault M, Zulyniak MA, Britz-McKibbin P, Mutch DM. (2015) Metabolomics Reveals Metabolically Healthy and Unhealthy Obese Individuals Differ in their Response to a Caloric Challenge. *PLoS One.* 10(8), e0134613
- (72) Karimpour M, Surowiec I, Wu J, Gouveia-Figueira S, Pinto R, Trygg J, *et al.* (2016) Postprandial metabolomics: A pilot mass spectrometry and NMR study of the human plasma metabolome in response to a challenge meal. *Anal Chim Acta.* 908, 121-31
- (73) Mingrone G, Castagneto M. (2006) Medium-chain, even-numbered dicarboxylic acids as novel energy substrates: an update. *Nutr Rev.* 64, 449-56
- (74) Chiang JY. (2009) Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res.* 50(10), 1955-66
- (75) Dragsted LO. (2010) Biomarkers of meat intake and the application of nutrigenomics. *Meat Science.* 84, 301-7
- (76) Sugawara T, Ito Y, Nishizawa N, Suzuki H, Kobayashi H, Nagasawa T. (2009) Measurement of the rate of myofibrillar protein degradation using the arteriovenous difference in plasma 3-methylhistidine concentration of rats. *J. Nutr. Sci Vitaminol*

- (Tokyo). 55(4), 381-4
- (77) Horinishi H, Grillo M, Margolis FL. (1978) Purification and characterization of carnosine synthetase from mouse olfactory bulbs. *J Neurochem.* 31, 909-19
- (78) Ng RH, Marshall FD. (1978) Regional and subcellular distribution of homocarnosine-carnosine synthetase in the central nervous system of rats. *J Neurochem.* 30, 187-90
- (79) Ueda N, Tsuboi K, Uyama T. (2010) Enzymological studies on the biosynthesis of N-acylethanolamines. *Biochim Biophys Acta.* 1801, 1274-85
- (80) Saghatelyan A, McKinney MK, Bandell M, Patapoutian A, Cravatt BF. (2006) A FAAH-regulated class of N-acyltaurines that activates TRP ion channels. *Biochemistry.* 45, 9007-15
- (81) McKinney MK, Cravatt BF. (2006) Structure-based design of a FAAH variant that discriminates between the N-acylethanolamine and taurine families of signaling lipids. *Biochemistry.* 45, 9016-22
- (82) Long JZ, LaCava M, Jin X, Cravatt BF. (2011) An anatomical and temporal portrait of physiological substrates for fatty acid amide hydrolase. *J Lipid Res.* 52, 337-44
- (83) Schlenk H. (1972) Odd numbered and new essential fatty acids. *Fed Proc.* 31(5), 1430-5
- (84) Joyce SA, Shanahan F, Hill C, Gahan CG (2014) Bacterial bile salt hydrolase in host metabolism: Potential for influencing gastrointestinal microbe-host crosstalk. *Gut Microbes.* 5(5), 669-74
- (85) Gatta-Cherifi B, Matias I, Vallée M, Tabarin A, Marsicano G, Piazza PV, *et al.* (2012) Simultaneous postprandial deregulation of the orexigenic endocannabinoid anandamide and the anorexigenic peptide YY in obesity. *Int J Obes (Lond).* 36(6), 880-5
- (86) Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, *et al.* (2009) Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 106(10), 3698-703
- (87) Matsumoto M, Kibe R, Ooga T, Aiba Y, Sawaki E, Koga Y *et al.* (2013) Cerebral low-molecular metabolites influenced by intestinal microbiota: a pilot study. *Front Syst Neurosci.* 7, 9. doi: 10.3389/fnsys.2013.00009
- (88) Marcobal A, Kashyap PC, Nelson TA, Aronov PA, Donia MS, Spormann A, *et al.* (2013) A metabolomic view of how the human gut microbiota impacts the host metabolome using humanized and gnotobiotic mice. *ISME J.* 7(10), 1933-43
- (89) El Aidy S, Derrien M, Merrifield CA, Levenez F, Doré J, Boekschoten MV *et al.* (2013) Gut bacteria–host metabolic interplay during conventionalisation of the mouse germfree colon. *ISME J.* 7(4), 743-55.

- (90) Marcobal A, Yusufaly T, Higginbottom S, Snyder M, Sonnenburg JL, Mias GI. (2015) Metabolome progression during early gut microbial colonization of gnotobiotic mice. *Sci Rep.* 5, 11589. doi: 10.1038/srep11589
- (91) Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 7(5), 335-6
- (92) Xia J, Wishart DS. (2016), Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr Protoc Bioinformatics* 55, 14.10.1–14.10.91.
- (93) Walrand S, Chiotelli E, Noirt F, Mwewa S, Lassel T. (2008) Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma. *J Agric Food Chem.* 56(17), 7790-5
- (94) Antener I, Verwilghen AM, Van Geert C, Mauron J. (1983) Biochemical study of malnutrition. Part VI: Histidine and its metabolites. *Int J Vitam Nutr Res.* 53(2), 199-209
- (95) Fujita T, Hada T, Higashino K. (1999) Origin of D- and L-pipecolic acid in human physiological fluids: a study of the catabolic mechanism to pipecolic acid using the lysine loading test. *Clin Chim Acta.* 287(1-2), 145-56
- (96) Kawada Y, Yokoyama S, Yanase E, Niwa T, Suzuki T. (2016) The production of S-equol from daidzein is associated with a cluster of three genes in *Eggerthella* sp. YY7918. *Biosci Microbiota Food Health.* 35(3), 113-21
- (97) Tsai HC, Han MH (2016) Sphingosine-1-Phosphate (S1P) and S1P Signaling Pathway: Therapeutic Targets in Autoimmunity and Inflammation. *Drugs.* 76(11), 1067-79
- (98) Nikolova-Karakashian M. (2018) Sphingolipids at the Crossroads of NAFLD and Senescence. *Adv Cancer Res.* 140, 155-190
- (99) Chaurasia B, Summers SA. (2015) Ceramides - Lipotoxic inducers of metabolic disorders. *Trends Endocrinol Metab.* 26(10), 538-50
- (100) Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. (2016) From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell.* 165(6), 1332-45
- (101) Midtvedt T, Zabarovsky E, Norin E, Bark J, Gizatullin R, Kashuba V. (2013) Increase of faecal tryptic activity relates to changes in the intestinal microbiome: analysis of Crohn's disease with a multidisciplinary platform. *PLoS One.* 8(6) e66074
- (102) Girbovan A, Sur G, Samasca G, Lupan I. (2017) Dysbiosis: a risk factor for celiac disease. *Med Microbiol Immunol.* doi: 10.1007/s00430-017-0496-z

- (103) Sarosiek K, Pappan KL, Gandhi AV, Saxena S, Kang CY, McMahon H. (2016) Conserved metabolic changes in nondiabetic and type 2 diabetic bariatric surgery patients: global metabolomic pilot study. *J Diabetes Res.* 3467403 doi: 10.1155/2016/3467403
- (104) Reinke SN, Gallart-Ayala H, Gómez C, Checa A, Fauland A, Naz S. *et al.* Metabolomics analysis identifies different metabolotypes of asthma severity. *Eur Respir J.* 49(3) pii: 1601740. doi: 10.1183/13993003.01740
- (105) Posset R, Opp S, Struys EA, Völkl A, Mohr H, Hoffmann GF. *et al.* (2015) Understanding cerebral L-lysine metabolism: the role of L-pipecolate metabolism in Gcdh-deficient mice as a model for glutaric aciduria type I. *J Inherit Metab Dis.* 38(2), 265-72
- (106) Shapiro H, Singer P, Ariel A. (2016) Beyond the classic eicosanoids: Peripherally-acting oxygenated metabolites of polyunsaturated fatty acids mediate pain associated with tissue injury and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 111, 45-61
- (107) Collino S, Montoliu I, Martin FP, Scherer M, Mari D, Salvioli S, *et al.* (2013) Metabolic signatures of extreme longevity in northern Italian centenarians reveal a complex remodeling of lipids, amino acids, and gut microbiota metabolism. *PLoS One.* 8(3):e56564. doi: 10.1371
- (108) Zeidan YH, Hannun YA. (2007) Translational aspects of sphingolipid metabolism. *Trends Mol Med.* 13(8), 327-36
- (109) Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q. (2009) Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 457(7231), 910-4
- (110) Simón-Manso Y, Lowenthal MS, Kilpatrick LE, Sampson ML, Telu KH, Rudnick PA. (2013) Metabolite profiling of a NIST standard reference material for human plasma (SRM 1950)_GC-MS, LC-MS, NMR, and clinical laboratory analyses, libraries, and web-based resources. *Anal Chem.* 2013 85(24), 11725-31
- (111) http://www.pmlive.com/pharma_news/astellas_daiichi_sankyo_and_takeda_to_study_biomarkers_1028616
- (112) <http://www.jmbc.life/profile/index.html>

謝辞

本論文を博士論文としてまとめるにあたって、あたたかいご指導とご高配を賜りました岡山大学大学院 環境生命研究科 田村隆教授、神崎浩教授、村田芳行教授、守屋央朗准教授に心より感謝の意を表します。また、本論文を作成する上で様々な御支援を頂いたアクセリート・ドラッグ・ディスカバリー・パートナーズ株式会社 朝日知所長に感謝申し上げます。本研究を進めるに当たって全体に渡り、多大な御指導と御鞭撻を頂きました、塩野義製薬株式会社 小林博幸部長、塩野義製薬株式会社 里見佳典課長、田辺三菱製薬株式会社 村田俊平様、大塚製薬株式会社 沢田啓室長に心より御礼申し上げます。トランスレーショナルリサーチなどの研究機会を与えて頂いた武田薬品工業株式会社 山本恵司所長、富士フィルムホールディングス株式会社 細谷昌樹様に御礼申し上げます。本研究の腸内細菌叢に関する試験において多くの助言をいただきました武田薬品工業株式会社 小幡高士博士に深く感謝申し上げます。無菌マウス試験に関して多くのサポートをいただいた三共ラボサービス株式会社 浅田義人部長、小林裕文研究員、姉崎まゆみ研究員に厚く御礼申し上げます。

最後にメタボローム解析を初めとして質量分析について多くのことをお教えいただいたアクセリート・ドラッグ・ディスカバリー・パートナーズ株式会社 安藤智弘主席研究員、林浩三主任研究員、土永和英主任研究員、高原ちさと研究員、平山愛研究員、小野薬品工業株式会社 後藤正光様、武田薬品工業株式会社 西垣隆一主任研究員に厚くお礼申し上げます。