



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                           |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Application of NMR Metabolomics to Pathological and Nutritional Fields [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s)           | 小松, 陽介                                                                                                                                    |
| Description         | 担当 : 理学部図書室                                                                                                                               |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                     |
| Degree Name         | 博士(ソフトマター科学)                                                                                                                              |
| Dissertation Number | 甲第14405号                                                                                                                                  |
| Issue Date          | 2021-03-25                                                                                                                                |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/82029">https://hdl.handle.net/2115/82029</a>                                                         |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>                                   |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                           |
| File Information    | Yosuke_Komatsu_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                                                      |



## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（ソフトウェア科学） 氏 名 小松 陽介

### 学 位 論 文 題 名

Application of NMR Metabolomics to Pathological and Nutritional Fields  
(NMR メタボロミクスの病理学・栄養学分野への応用)

メタボロミクスは、代謝物（メタボライト）を網羅的に解析する技術のことで、血液、尿、糞便、母乳などの生体試料に含まれる低分子化合物の解析に用いられてきた。ひとつの生体中に見られるメタボライトの総数は、遺伝子やたんぱく質の数と比較してかなり少ない上に、生物種によって大きく異なる。これまでに報告されている各生物種の代謝物質数は、大腸菌で約 1000 種、ヒトでは約 3000 種である。メタボライトの厳密な定義はないが、内因性および外因性の両方の複合的な要因に由来する、およそその分子量が 1,500kDa 以下のアミノ酸、アミノ酸誘導体、核酸、糖類、脂質、有機酸などの化合物が含まれる。メタボロミクスの分析対象であるメタボライトは、セントラルドグマの最下流に位置するため、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスで得られる情報よりも表現型に近く、生体内の今現在の情報を知るには最適な手法であると考えられる。メタボロミクス解析の優位な点として、メタボライトの変動が、ゲノムの安定性やたんぱく質の量的変動と比較して、速やかかつ劇的に起きることや、メタボライトの生物種による差がほとんどないことが挙げられる。これまでに、メタボロミクス技術は、ターゲット法およびノンターゲット法の使い分けにより、医療や食品科学などの幅広い分野に応用されてきた。特に、医療分野においては、ターゲット法のメタボロミクス解析による疾病に特徴的なバイオマーカー探索研究が行われてきた。バイオマーカーとは、ある特定の疾病や生物学的変化を特徴づける生物学的指標であり、特に体液中の代謝物質レベル変化を把握することは、疾病の診断、治療、予防に有益である。

例えば、医療分野への応用例として、尿メタボロミクス技術を用いて、前立腺がんのバイオマーカーとして、サルコシンがピックアップされている。さらに、冠動脈疾患患者の尿中において、コラーゲン由来ペプチドが増加しており、バイオマーカーとして応用できる可能性が報告されている。このことは動脈硬化の悪化メカニズムにも、生体内コラーゲンが関与することを示唆している。これらの研究は、メタボライトのバイオマーカーが、疾患の予測や診断だけでなく、その発症や増悪に関与している可能性が示されており、非常に意義のある知見である。さらに、メタボロミクスは、食品科学分野における食品や素材の品質および機能性の評価にも応用されてきた。その中でも、客観的な品質評価方法として、メタボロミクスを酒類に応用した研究例がいくつか報告されている。日本酒の多くの銘柄の官能試験とメタボローム解析を組み合わせ、品質評価モデルを構築した研究がある。この研究では、銘柄毎に特徴的なメタボライトの含有パターンを示すこと、さらには、アミノ酸類の含有量が雑味と相関することが示されている。また、ワインにおいては、ノンターゲット法のメタボロミクス解析と主成分分析により、ブドウ品種毎に明確な分離を示すことが報告されている。このようなメタボロミクスの食品への応用は、官能評価などの定性的な品質評価を、メタボライトの濃度やパターンといった定量的な評価に置き換えた点が非常に興味深く、品質の更なる向上にも貢献することができるとも知れない。

以上のように、メタボロミクスを医療分野や食品科学分野などの他の領域へ応用する研究例の報告が増加しており、メタボロミクス研究に掛けられる期待は拡大するばかりである。一方で、生体内で起きたことを“スナップショット”として捉えるメタボロミクスは、その代謝反応の方向性が分からないという限界がある。ある特定の条件で比較対象同士を比べて、メタボライトの濃度の違いが分かっても、実際の代謝の流れは分からない。この問題点の解決のためには、検体採取と分析を経時的に行うことにより時間変化の要素を追加するか、トランスクリプトミクスと

組み合わせることによって、メタボライトの変化に対する説明変数を増やすなど、実験系の工夫によって解決することが必要となるであろう。

本研究の目的は、NMR メタボロミクスを病理学および栄養学分野へ応用し、病態および栄養不足を反映する信頼性の高いバイオマーカー候補となるメタボライトを探索し、これらのメタボライトが変動するメカニズムの解明を行うことである。生体内のメタボライトは疾患や栄養状態を反映して変動するため、病状や栄養不足（もしくは栄養過多）を診断するためのバイオマーカーの開発に応用することが可能である。これらのバイオマーカーを活用することによって、疾患に対する治療法や栄養介入が可能となるだろう。

第2章では、クローン病の自然発症モデルとして SAMP/YitFc マウスを用い、経時的に回腸組織および糞便を採取した。回腸組織については、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、炎症の進行を確認した。糞便については、次世代 DNA シーケンサーを用いた腸内細菌叢解析および NMR メタボロミクス解析を実施した。その結果、クローン病の進行に伴い、糞便中の短鎖脂肪酸やタウリン、コリンなどのメタボライトが劇的に変動すること、さらにはこれらの変動には、部分的に腸内細菌の変動が影響する可能性を示した。糞便中メタボライトは、クローン病の病状進行に伴う、腸管組織所見の増悪に至る前の初期の段階において、すでに変動していた。よって、これらの糞便中メタボライトの特徴的な変動を、病状を予測し得るバイオマーカーとして活用し、早期診断が可能となれば、患者の QOL の改善に貢献できるかも知れない。

第3章では、たんぱく質栄養不足のラットを用いて、尿、血漿、肝臓の NMR メタボロミクス解析および肝臓のトランスクリプトミクス解析を行った。その結果、低たんぱく質栄養状態に早期に応答する尿メタボライトを複数種検出し、これらのメタボライトの中で、血漿および肝臓のメタボライトの変動および肝臓の遺伝子発現変化が支持したものを、信頼性の高い尿中バイオマーカーとしてピックアップした。これら尿中バイオマーカーには、タウリンとトリメチルアミン N オキシドが挙げられた。これらの新規バイオマーカーと既知のバイオマーカーを組み合わせることにより、早期にかつ確実に低たんぱく質栄養状態を検出することにより、高齢者の栄養管理に貢献することが可能となるかも知れない。

第4章では、ヒト臨床試験において、母乳に含まれるメタボライトが、乳児の腸内細菌叢および便に含まれるメタボライトに与える影響を検証した。本研究において、NMR メタボロミクス、腸内細菌叢解析、および数理解析を用いることによって、乳児に取り込まれた母乳中メタボライトが乳児の腸内細菌叢および糞便中のメタボライトと関連する可能性を示唆した。特に、母乳中のオリゴ糖は授乳期を通じて大きく変動しなかったのにも関わらず、乳児便中のオリゴ糖が消失したタイミングで、*Bifidobacterium* 属の *breve* 種と *infantis* 種の交代が起き、それに伴って、乳酸や酢酸や酪酸などの短鎖脂肪酸などのいくつかのメタボライトが上昇した。さらに、これらのメタボライトが乳児の免疫機能の成熟や感染防御などのベネフィットに繋がっている可能性があることを示した。