

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）
総括研究報告書

生活習慣病やアレルギー疾患の新しい予防法確立に資する
健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌データベースの構築に関する疫学研究

研究代表者 宮地元彦
研究分担者 國澤純、水口賢司
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所
研究分担者 窪田哲也
国立研究開発法人 理化学研究所

研究要旨

<目的> 食事・栄養状況や身体活動・運動などの生活習慣と免疫疾患・生活習慣病との関係に関するコホート研究から得られたヒト試料を対象に、生活習慣病やアレルギー疾患の新しい予防法確立に資する健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌データベースを構築し、そのデータを横断的に分析することにより、生活習慣、腸内細菌叢、腸管免疫、疾患発症との相互関係を明らかにすることを目的とする。

<方法> 国立健康・栄養研究所がすでに確立し運営している大規模介入研究の参加者を対象とし、20～80歳までの男女を研究対象者とした（宮地）。また、腸内細菌叢に関連する糞便・排便状況調査票を確立するための文献研究を実施した（宮地）。医薬基盤研究所ならびに理化学研究所の腸内細菌や免疫に関する解析技術を用いて糞便や血液サンプルを分析する（國澤、窪田）。それらのデータをバイオインフォマティクス手法を用いてデータベース化し解析する（水口）。

<結果> 糞便・排便状況調査票、採便法および便輸送方法を確立した。2016年2月11日現在において、90名の研究参加同意が得られ、生活習慣調査、血液、糞便サンプルリングを完了した。3月末までに140名の被験者に対し測定を実施する予定である。また、糞便の一部について腸内細菌叢の解析が終了した。血液による短鎖脂肪酸の解析については、予備検討が終了した（窪田）。さらに、本研究で得られたデータをどのようにバイオインフォマティクスの手法を用いて解析するかを検討を行った（水口）。

<まとめ> 本年度の計画であった250名のうち年度末までに140名の参加予定であり、進捗は60%程度であるが、採便・運搬、分析、解析の方法が確立した。

A. 研究目的

近年、腸内細菌叢と健康や疾患との関わりに関する多くの報告がなされている（Chatelier et al. Nature 2013, Clemente et al. Cell 2012）。また、我々が摂取する食事によっても腸内細菌叢は大きく影響を受けている（Davide et al. Nature 2014）。しかしながら、これらの研究成果は欧米人を対象としたものであり、食事・栄養摂取状況や身体活動が異なるわが国では異なった知見が得られる可能性がある。また、先行研究では、参加者の生活習慣の違いは全く考慮されていない。さらに、腸内細菌叢は食事内容に加えて腸管免疫の違いにより変化するが、その個人差についても検討されていない。

本研究では、食事・栄養状況や身体活動・運動などの生活習慣と免疫疾患・生活

習慣病との関係に関するコホート研究から得られたヒト試料を対象に、生活習慣病やアレルギー疾患の新しい予防法確立に資する健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌データベースを構築し、そのデータを横断的に分析することにより、生活習慣、腸内細菌叢、腸管免疫、疾患発症との相互関係を明らかにすることを目的とする。

本年度の具体的な研究目的は以下のとおりであった。

参加同意者の確保

糞便・排便状況調査票の確立

採便・運搬法と腸管免疫と腸内細菌叢の分析法の確立

脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析の確立

データベースの構築法の検討

B. 研究方法

参加同意者の確保

国立健康・栄養研究所がすでに確立し運営している大規模介入研究(NEXISコホート)の参加者を対象とし、20~80歳までの男女、合計600名(本年度の目標250名)から糞便サンプルの提供を依頼する。サンプリングにあたっては腸内細菌叢の分析の妥当性や再現性を確保することに加えて、参加者に負担がなく、より多くの参加者の参加同意を得るための最良の方法を検討する必要がある。これらを勘案し、従来の凍結保存・運搬法でなく、常温での保存・運搬が可能な方法を用いることとした。

また、現在進行しているNEXISコホートで行われている項目についても測定を行った。身体組成(身長、体重、腹囲、体脂肪率等)、生活習慣病リスクファクター(血糖、血中脂質、血圧等)、動脈硬化度、体力(筋力、持久力、柔軟性等)、現病歴・既往歴、日常身体活動量(3次元加速度計による)、栄養摂取状況(BDHQによる)等について測定・調査を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所研究倫理審査委員会の承認を得て行われた(受付番号:健栄3)。

糞便・排便状況調査票の確立

PubMedおよびCiNii等により、健康な人の糞便状態や排便状況について報告している論文および、それらと健康との関わりについて検討している論文を検索し、糞便の状態や排便の状況に関する質問項目を決定した。その後、国立健康・栄養研究所がすでに確立し運営している大規模介入研究(NEXISコホート)の参加者を対象において、「生活習慣病やアレルギー疾患の新しい予防法確立に資する健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌データベース構築を目指した疫学研究」への参加を依頼し、同意が得られた被験者に対し、新たに作成した調査票を用いて、糞便状態・排便状況の調査を行った。

採便・運搬法と腸管免疫と腸内細菌叢の分析法の確立

採便および便の輸送方法を確立するために、採取したヒト便からすぐにDNA抽出した場合と保存液に浸した状態で2日間室温に放置した便から抽出したDNAを用いた場合で腸内細菌叢の解析を行い、結果を比較した。また、本事業では扱う検体数が多いことから、自動抽出器によるDNA抽出の最適化を行った。腸管免疫因子としてIgA抗体を定量的に検出するためのサンドイッチELISA法を確立し、冷凍や冷蔵などの保存方法の違いによる影響を検討した。

脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析の確

立

脂肪酸の測定:Folch法で全脂質を抽出し、カラムを用いて脂質クラスを分離する。分離した脂質に内部標準を加えて、誘導化試薬を用いてメチル化を行う。中和、洗浄を行った後、窒素気流下で乾燥して、ヘキサンに再溶解してGC-MSで脂肪酸組成を測定する。

胆汁酸の測定:サンプルを凍結乾燥し、緩衝液に再溶解する。溶解液に酵素を加えて脱抱合後し、イオン交換カラムを用いて遊離の胆汁酸分画を調整する。さらに水酸基・カルボン酸基を非極性化するために、ジアゾメタンを用いてカルボン酸基をメチル化、続いてジメチルエチルシリルイミダゾールを用いてジメチルエチルシリルエーテル化を行う。シリカゲルカラムにかけて誘導体化された胆汁酸を調整、乾固後ヘキサン50 μ Lで再溶解しGC-MSで測定する。

データベースの構築法の検討

食事・栄養摂取状況、身体活動・運動などの生活習慣のデータおよび腸内細菌叢のデータをデータベース化し、別途構築した遺伝子、タンパク質、疾患、化合物、パスウェイ情報等を統合したデータベースとともに、多変量解析や機械学習等を用いることによって、分子メカニズムや各種測定量の関係を解析する。

C. 研究結果

参加同意者の確保

本研究は、採択時期が遅れたため、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所研究倫理審査委員会の承認も平成27年9月7日となった(受付番号:健栄3)。承認後、2015年10月より既存のNEXISコホートの参加者(登録者数1,077名)に研究参加の依頼を順次行った。2016年2月11日現在において、90名の同意が得られ、生化学的・生理学的指標の測定が行われた。

糞便・排便状況調査票の確立

文献検索の結果を基に、糞便の形状・固さ、糞便の色、糞便の量などを聞き取る調査票を作成した。また、本研究へ同意が得られた者において、それら調査票を用いて調査を行った。80名の健常者を対象に糞便状態・排便状況の調査を行った。その結果、1週間当たりの排便回数は、週当たり7回以上と答えた人が最も多かった(63.7%)。また、1回あたりの排便量は便モデル(2cm \times 10cm)換算で、2本分と答えた人が最も多かった(57.5%)。さらに便の形状はバナナ状と答えた者が最も多く(80.0%)、色は黄土色(40.0%)と茶色(40.0%)と答えた者が最も多かった。

採便・運搬法と腸管免疫と腸内細菌叢の分析法の確立

採便後すぐにDNA抽出した場合に比べて保存液を用いることでFirmicutes/Bacteroides

比(F/B比)が減少する傾向にあった。また、市販のキットを用いてDNA抽出した場合に比べて自動抽出したDNAではF/B比が増加する傾向にあった。同様に属レベルでの菌叢解析においてもFirmicutes門やBacteroides門に属する菌の割合の変化が認められた。採便方法やDNA抽出方法が腸内細菌叢の解析結果にある程度影響することが明らかとなった。今後、このようなサンプリングなどの解析方法による違いがサンプル間の比較解析に与える影響について検体数を増やして検討していく予定である。しかし、保存液を用いることで便を室温で保存・輸送しても腸内細菌叢を解析できたことから、初年度は保存液を用いた腸内細菌叢解析のデータ収集をすでに開始している。また、ヒト便を一晩冷凍、冷蔵保存したサンプルにおいて、採便後すぐに処理したサンプルと同程度にIgA抗体を検出できた。

脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析の確立

血漿中の代謝産物を精度と再現性良く測定するために、血漿からの各種代謝マーカーの抽出方法や測定方法を確立した。また健康者のサンプルであるため、適切な標準化物質を探索し、腸内細菌との関連性が深いと考えられるパルミチン酸、ステアリン酸といった飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸、さらにコール酸、デオキシコール酸といった1次胆汁酸や2次胆汁酸などを定量的に測定できた。

データベースの構築法の検討

遺伝子、パスウェイ情報等を鍵とした独自のデータウェアハウス技術を拡張し、化合物や疾患などの、より多様なデータを統一的に解析できる枠組みを構築した。また、腸内細菌叢のデータを米国国立生物工学情報センター(NCBI)の提供する生物種IDとともにデータベース化する予定である。さらに、食事・栄養摂取状況、身体活動・運動などの生活習慣のデータを入手し、予備的な多変量解析と相関解析を行った。その結果、赤血球数と最大酸素摂取量や腹囲と動物性脂肪摂取量などに既知の相関がみられることを確認した。

D. まとめ

本年度の計画として、資料収集を250名予定していたが、現時点で140名の予定であることから、達成度としては60%である。今後、目標のサンプル数に到達すべく被験者のリクルートを行い、順次解析を行っていく。

糞便状態および排便状況を聞き取るための調査票を開発し、80名の健康者を対象に糞便状態・排便状況の調査を行った。

常温による採便・運搬法が確立したが、腸管免疫指標の分析のための冷凍保存・運搬法についても検討を加えることとした。脂肪酸と胆汁酸を定量的に測定することができたが、サンプル数も多いことから、前処理の簡略化を検討する。

少数のデータを予備的に解析し、それぞれのデータの性質を理解した上で、データをどのように格納するか設計を行った。この設計に基づいてデータベースを構築し、来年度以降データの格納を行い、異なる種類のデータ間の横断的な解析ができる環境を整える予定である。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Kikuchi N, Miyamoto-Mikami E, Murakami H, Nakamura T, Min SK, Mizuno M, Naito H, Miyachi M, Nakazato K, Fukunaga N: ACTN3 R577X genotype and athletic performance in a large cohort of Japanese athletes. *Eur J Sport Sci* 2015; Epub ahead of print

Gando Y, Murakami H, Kawakami R, Yamamoto K, Kawano H, Tanaka N, Sawada S, Miyatake N, Miyachi M: Cardiorespiratory fitness suppresses age-related arterial stiffening in healthy adults: A 2-year longitudinal observational study. *J Clin Hypertens* 2016; Epub ahead of print

Kunisawa J, Sugiura Y, Wake T, Nagatake T, Suzuki H, Nagasawa R, Shikata S, Honda K, Hashimoto E, Suzuki Y, Setou M, Suematsu M, Kiyono H: Mode of bioenergetic metabolism during B cell differentiation in the intestine determines the distinct requirement for vitamin B1. *Cell Rep* 2015; 13:122-131

Suzuki H, Kunisawa J: Vitamin-mediated immune regulation in the development of inflammatory diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2015; 15:212-215

Yi-An Chen, Lokesh P. Tripathi, Kenji Mizuguchi: An integrative data analysis platform for gene set knowledge discovery in a data warehouse framework. *Database* (in press).

2. 学会発表

國澤純, 栄養を介した免疫制御と創薬・機能性食品開発への展開, 日本薬学会第136年会, 横浜(パシフィコ横浜), 2016年3月28日

國澤純, 腸内環境を介した免疫制御の基礎的解明と創薬・機能性食品開発への

展開, 第97回日本栄養・食糧学会関東支部会大会シンポジウム, 東京(東京大学), 2016年3月12日

Jun Kunisawa, Diet-Commensal Crosstalk for the control of gut immunity, Environment controlling normal and diseased hematopoietic and immune systems, Yokohama, RIKEN, 2 March, 2016

國澤純, 栄養 腸内フローラネットワークを介した免疫制御と疾患, BMFHシンポジウム2016, 東京(東京大学), 2015年2月13日

國澤純, 腸から眺めるヘルスサイエンス, 第3回先進イメージング医学研究会・学術集会, 神戸(有馬温泉ホテル), 2015年2月12日

國澤純, 免疫制御における腸内環境の影響と免疫創薬、機能性食品、ワクチンへの展開, 第6回学際的脂質創生研究部会講演会, 徳島(徳島大学), 2015年1月22日

國澤純, 医薬・健康・栄養の複合的観点から見たヘルスサイエンス, 彩都産学官連携フォーラム2016, 大阪(千里ライフサイエンスセンター), 2016年1月20日

國澤純, 腸内環境を介した免疫制御とアジュバント開発への展開, 第9回次世代アジュバント研究会, 大阪(千里ライフサイエンスセンター), 2016年1月19日

國澤純, 食と腸管免疫を起点とした機能性食品、創薬に向けた新たな展開, HIHA第5回ワークショップ, 広島(広島大学), 2015年11月27日

水口賢司, データウェアハウスによる創薬関連データ統合と解析の実際, 第361回CBI学会研究講演会, 大阪, 2015.4.24

(招待講演)

水口賢司, 健康な日本人の生活習慣と腸管免疫・腸内細菌データベースの構築: バイオインフォマティクスの視点から, シリーズ「薬づくりの新しいR&Dモデルを探る」第11回「薬づくりと健康食品開発を結ぶ」, 東京, 2016.1.15 (招待講演)

陳怡安, ロケシュ テリパチ, 水口賢司, 創薬の初期研究における統合データウェアハウスTargetMine, トーゴの日シンポジウム2015, 東京, 2015.10.5 (ポスター)

長尾知生子, 五十嵐芳暢, 森田瑞樹, 陳怡安, 深川明子, 坂手龍一, 水口賢司, 創薬・疾患研究のためのデータベース検索システム Sagace & Toxygates, トーゴの日シンポジウム2015, 東京, 2015.10.6 (ポスター)

Chen Y.A., Tripathi L.P., Mizuguchi K., The integration of biological data and its application to drug discovery, CBI学会2015年大会, 東京, 2015.10.27 (ポスター)

水口賢司, 坂手龍一, 深川明子, 五十嵐芳暢, 陳怡安, 長尾知生子, 医薬基盤・健康・栄養研究所の創薬支援データベースとツール, 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本分子生化学会大会 合同大会, 神戸, 2015.12.1 (ポスター)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし