

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)
分担研究報告書

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

研究分担者 水口 賢司
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
バイオインフォマティクスプロジェクト プロジェクトリーダー
研究協力者 夏目 やよい
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
バイオインフォマティクスプロジェクト・研究員
研究協力者 朴 鐘旭、陳 怡安、Attayeb Mohsen、川島 和
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
バイオインフォマティクスプロジェクト・特任研究員

<目的> 食事・栄養摂取状況や身体活動・運動など詳細な生活習慣情報の得られた被験者を対象に腸内細菌叢を解析し、腸内細菌叢、腸管免疫、生活習慣データおよび公共のデータベースからの情報を統合した基盤データベースを設計する。それらのデータについてバイオインフォマティクス技術を用いて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> 首都圏コホート(NEXIS)の参加者、山口県周南市の市職員、新潟県南魚沼市の住民ならびに市職員、大阪市の認定特定非営利活動法人の活動参加者の計 722 人の便から DNA を抽出し、16S リボソーム RNA 遺伝子配列を取得した。これらの配列データから腸内細菌叢を解析し、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とともにデータベース化した。

<結果> 成人日本人722名の腸内細菌叢を解析した結果、*Firmicutes*門、*Bacteroidetes*門が全体の約9割を占めていた。Enterotype解析の結果、クラスター分けには*Bacteroides*属、*Prevotella*属、*Faecalibacterium*属が主に影響していることが明らかとなり、それぞれのクラスターの割合は約4:1:5であった。細菌群集構造、多様性には性別、年齢、地域による偏りがあり、*Lachnospiraceae*科、*Ruminococcaceae*科の細菌が α 多様性と正の相関を示した。腸内細菌叢のデータに加え身体データや食事・栄養摂取状況、身体活動・運動などの生活習慣、さらに腸管免疫に関わる因子のデータをデータベース化した。さらに、作成したデータベースを用いて、腸内細菌叢と様々な身体データや生活習慣、腸管免疫に関わる因子との関連を対話的に解析できるソフトウェアを開発した。このソフトウェアを用いることによって、それぞれの菌種と相関の高い生活習慣等を容易に抽出することができるようになった。

<まとめ> 本研究では、詳細な生活習慣情報と腸内細菌叢や腸管免疫データについてバイオインフォマティクス技術を用いて横断的に分析することによって、分子機序の推定や各種測定量間の相関予測モデルを構築することを目指している。今年度は、722名の腸内細菌叢の解析を完了し、生活習慣のデータとともにデータベース化した。昨年度までに作成した腸内細菌叢と生活習慣等の関連を図示化して解析するソフトウェアにヒートマップや主座標分析の結果を表示する機能を追加し、このソフトウェアを用いて各データ間の関連を解析した。

A. 研究目的

最近の研究によって、腸内細菌叢が食事や肥満、代謝性疾患などと関連することが明らかとなり、生活・食事・疾病などの変化による腸内細菌叢の変化、腸内細菌叢の変化による代謝・免疫などの身体への影響に関する多様な研究が行われている。しかしながら、ヒトの腸内細菌叢は

個人差が大きいいため、このような関連を確度高く解明するのは困難である。

本研究では、食事・栄養摂取状況や身体活動・運動など詳細な生活習慣情報の得られた被験者を対象に腸内細菌叢を解析し、腸内細菌叢、腸管免疫、生活習慣データおよび公共のデータベースからの情報を統合した基盤データベース

を設計する。腸内細菌叢のデータを得る際に、サンプリングから解析まで統一された手法を用いることにより、異なる手法による影響を排除した。得られたデータを解析することで、一般的な日本人の腸内細菌叢の特徴を明らかとする。また、腸内細菌叢のデータと多様なメタデータについてパイオインフォマティクス技術を用いて横断的に分析するためのデータベースの構築を目的とする。

B. 研究方法

便サンプル由来のDNAから次世代シーケンサーを用いて16SリボソームRNA遺伝子のv3-v4領域の配列を取得した。配列データは解析ソフトウェアQiimeとリボソームRNAデータベースSILVAを用いて解析し、97%の類似度を持つ配列をOTU (Operational Taxonomic Unit)単位で分類した上で各OTUの由来する細菌を同定した。また、サンプルごとのリード数を10,000リードで統一した上で、サンプル内の多様性を示す α 多様性、サンプル間の多様性を示す β 多様性の解析を行った。

腸内細菌叢のデータに加え、食事・栄養摂取状況、身体活動・運動などの生活習慣、腸管免疫因子、メタボロームのデータをPostgreSQLデータベースに格納した。

データ解析は、統計解析ソフトウェアRを用いて行った。

(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)。

C. 研究結果

(1)腸内細菌叢のデータ解析

20~80歳までの日本人男女の腸内細菌は、門レベルでは、*Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria*、*Actinobacteria*、*Fusobacteria*、*Verrucomicrobia*が多くを占めていることが認められ(図1)、その内、*Firmicutes*門(45.3%)、*Bacteroidetes*門(43.7%)が全体の約9割を占めた。*Firmicutes*門は*Faecalibacterium*属と*Blautia*属がそれぞれ26%と8%で他の属の菌に比べて多く存在していたのに加え、*Lachnospiraceae*科と*Ruminococcaceae*科に属している菌が多様に存在していた。*Bacteroidetes*門は*Bacteroides*属(71%)および*Prevotella*属(11%)、*Actinobacteria*門は*Bifidobacterium*属(61%)および*Collinsella*属(22%)が大半を占めた。 α 多様性解析の結果、各参加者において確認されたOTU数は10,000リード中、244 OTUから2048 OTUまでとなり、個人差が大きかった。また、 α 多様性指数として広く

使われているShannon指数、Simpson指数を用いて多様性指を評価した結果、約3~4倍の変動が認められた。

腸内細菌叢は個人ごとに大きく異なることが知られている。Arumugamらはヒトの腸内細菌叢パターンを*Bacteroides*、*Prevotella*、*Ruminococcus*の割合によって大きく3つに分類し、Enterotypeと命名した(Arumugam et al., Nature 2011)。本研究においても日本人に多く認められるEnterotypeを探索するため、属レベルとOTUレベルで各細菌の存在比から個人間における腸内細菌叢の類似度(以後、サンプル間の距離として定義)を計算し、その距離をもとにクラスタリングを行った。また、各細菌の存在比を定量的に考慮して計算されるBray-Curtis距離、および系統学的情報と多様性情報をもとに計算する非加重UniFrac距離を用いてサンプル間の距離を計算し、主座標分析法を用いてサンプル間の類似度を可視化した(図2)。クラスタリングにはArumugamらと同様にPAM Clustering法を用いた。その結果、どの定義による距離においても、最適とされるクラスターは3つとなった。また、統計ソフトウェアRパッケージveganのenvfit関数を用いて、腸内細菌群集構造とTaxonomyの関係性を矢印で示した結果、どの定義による距離においてもクラスター分けには*Bacteroides*属、*Prevotella*属、*Faecalibacterium*属が主に影響していることが明らかとなった。*Faecalibacterium*属の優占に特徴付けられるEnterotypeはOTUレベルBray-Curtisで46%、非加重UniFracで49%を占めており、最も多いEnterotypeとなった。*Bacteroides*属の優占に特徴付けられるEnterotypeはOTUレベルBray-Curtisで37%、非加重UniFracで43%を占めた。*Prevotella*属の優占に特徴付けられるEnterotypeはOTUレベルBray-Curtisで14%、非加重UniFracで11%を占め、比較的割合が小さかった。

性別、年齢層、地域の違いによる腸内細菌叢への影響を評価するため、各項目で分類して得られたサブグループにおいてOTUレベルBray-Curtis距離に基づく主座標分析や細菌群集構成と多様性の比較をおこなった(図3)。その結果、性別、年齢、地域によって腸内細菌叢に偏りがあることが明らかとなった。男性は女性と比べ、*Faecalibacterium*の割合が少なく、*Prevotella*の割合が多い傾向が認められた。また、年齢を重ねるごとに*Bacteroides*の割合が減っていくことが確認された。さらに、首都圏コホート(NEXIS)は他地域と比べ、*Bacteroides*が少なく、*Faecalibacterium*が多く存在した。特に、*Faecalibacterium*は地域差が大きいことが示され

た（2倍以上）。 α 多様性も性別、年齢層、地域の影響を受けており、特に地域による影響が大きかった。

一サンプル内でどれだけ多様な細菌が検出されたかを評価する指標である α 多様性は、その細菌叢が構成するシステムの頑健性を反映していると考えられており、多様な細菌が存在するほど健康であると言われている（Mosca et al., Frot Microbiol 2016）。そこで、OTU レベル Bray-Curtis 主座標分析の座標に Shannon α 多様性指数をマッピングし、その結果をグラデーションで示した（図4）。その結果、*Firmicutes* 門の *Lachnospiraceae* 科、*Ruminococcaceae* 科、*Faecalibacterium* 属などが多く存在するほど多様性が増加する結果となった。また、確認された OTU 数、Shannon 指数、Simpson 指数を用いて門レベルから属レベルまでの Taxonomy の割合との相関係数を求めた結果、*Lachnospiraceae* 科、*Ruminococcaceae* 科の細菌が α 多様性と正の相関を示した。一方、*Bacteroidetes* 門、*Prevotella* 属の細菌は多様性と負に相関していた。

(2)腸内細菌叢データベースの構築

腸内細菌叢と身体データや食事・栄養摂取状況、身体活動・運動などの生活習慣、さらに腸管免疫に関わる因子との関連を解析するために、これらのデータを格納するためのデータベースを構築した。生活習慣等のデータ項目が多項目にわたることから、項目の追加・変更を柔軟に行えるようにするために、サンプルごとに各項目の値を格納する代わりに、サンプル・項目・値の組み合わせ（トリプル）でデータを格納するようデータベースを設計した。このデータベースに、首都圏コホート(NEXIS)の参加者436名、山口県周南市の市職員86名、新潟県南魚沼市の住民および市職員100名、大阪市の認定特定非営利活動法人の活動参加者100名、計722人の腸内細菌叢データと身体データや生活習慣等のデータを格納した。

(3)腸内細菌叢と生活習慣等の関連を図示化するソフトウェアの開発

昨年度までに作成したオンラインソフトウェアに、いくつかの機能を追加した。腸内細菌のデータは門レベルから属レベルまで、棒グラフおよびヒートマップによって可視化が可能となっただけでなく、その関連を4種類の距離（OTUレベル Bray-Curtis、属レベル Bray-Curtis、非加重 UniFrac、加重 UniFrac）に基づいて階層的クラスタリングをおこない、Dendrogramを出力すること

ができる。さらに、オンラインシステム上で主座標分析を用い、その結果を描画することもできる。また、結果の表示だけでなく、腸内細菌と様々なPhenotypeとの関係、Phenotype間での関係を相関係数で示すことが可能となった（Pearson, Spearman）（図5）。

C. 考察

腸内細菌叢に関する研究は、ここ数年の間に非常に多く行われるようになった。これは次世代シーケンサーの普及により、細菌を培養することなく網羅的に解析できるようになったことが大きい。このような技術発展に伴い、腸内細菌と健康および疾患の関係や食事などによる腸内細菌への影響といった様々な報告がされている（Chatelier et al., Nature 2013; Clemente et al., Cell 2012; Davide et al., Nature 2014）。しかしながら、腸内細菌叢は個人差が大きく、特定のPhenotypeとの関連を示すことはそれほど容易なことではない。このような問題を克服するため、大規模なコホート研究による腸内細菌データの収集に寄せられる期待は大きい。健康人を対象とした従来の腸内細菌研究の大半は、できるだけ多くの個体から得られたデータを利用するためにサンプル調製手法、DNA抽出方法、16SリボソームRNA遺伝子の領域、シーケンシング方法などに違いがあるデータを統合し、解析を行っている。従って、このようにして得られた腸内細菌叢の知見は、実験やデータ解析の手法の違いに起因する可能性がある。

本研究では、すべてのサンプルに対してサンプリングから解析までプロトコルを統一することで手法の違いによる影響をできるだけ排除した。そのため、より信憑性のある解析ができたと考えられる。

本研究により、性別、年齢、地域のいずれも腸内細菌叢に影響を及ぼすことが明らかとなった（図3）。性別に関しては、女性が男性より、多様性が高く、*Faecalibacterium*の割合が多かった。*Faecalibacterium*属*Faecalibacterium prausnitzii*は健康な成人の腸内環境に多く存在し、約5%以上を示していると報告されている（Miquel et al., Curr Opin Microbiol 2013）。本研究では、男性で8.7%を示しており、先行研究と比較して多い割合を示し、女性では14%を示し、男性の約2倍であった。また、*Faecalibacterium*は他の地域と比べNEXISコホートでより比率が大きい事が見いだされた。NEXISコホートの参加者は他地域の参加者と比較してより健康意識が高く、定期的な運動や適切な栄養分を摂取している背景から

このような結果に関係した可能性がある。年齢に関しては20歳から39歳の青年層と40歳から64歳の中年層、65歳からの老年層間で*Faecalibacterium*の割合の差が確認されたが、これはNEXISコホートの年齢層の影響を受けているためと考えられる。

多様性とTaxonomyとの関連性を評価した結果、Firmicutes 門のLachnospiraceae科、Ruminococcaceae科に属する菌が α 多様性との正の相関を示し、Bacteroidetes門、Prevotella属菌は多様性と負に相関していた。RuminococcaceaeやLachnospiraceaeに属する細菌は食物繊維の分解や酪酸の生産に寄与し、乳酸の蓄積を防いで腸内環境のpH安定化に寄与すると報告されており (Lagier et al., Front Cell Infect Microbiol 2012; Biddle et al., Diversity 2013; Duncan et al., Appl Environ Microbiol 2002)、これらの相互作用によって腸内細菌環境が安定化され多様性が増加したことが考えられる。

これまでに腸内細菌叢に関する多くの研究がなされ、食事や疾患との関連が明らかにされてきている。しかしながら、腸内細菌叢を身体活動や運動との関わりといった観点から解析された例は少ない。さらに、多数のサンプルを同じ手法を用いて解析した腸内細菌叢のデータはほとんどなかった。今回構築したデータベースは実験・データ解析手法による影響を排除した腸内細菌叢のデータおよび食事・栄養状況や身体活動・運動などの生活習慣と免疫疾患・生活習慣病といった多様な情報も含まれている。従って、腸内細菌と様々なPhenotypeとの関連を確認することはもちろん、動物実験の結果をヒトデータと照合、あるいは動物実験の設計・条件検討など様々な形で貢献できる可能性がある。さらに、開発したソフトウェアを用いることによって、データベース上のデータを表示、相関解析が可能のため、バイオインフォマティクスの専門家でなくても、簡単に結果を求めることが可能である。

E. 結論

本研究では、20～80歳までの日本人男女722名の腸内細菌叢データを統一された手法で解析し、その特徴を明らかにした。また、これらの腸内細菌の情報とともに詳細な生活習慣と腸管免疫および疾患発症の情報をデータベース化することにより、それぞれの相互関係の分析を可能にした。

F. 研究発表

1. 論文発表

[1] 水口賢司, 創薬の初期研究におけるデータベース構築とモデリング, 学術の動向, 22(7):62-65, 2017

[2] Hosomi K., Ohno H., Murakami H., Natsume-Kitatani Y., Tanisawa K., Hirata S., Suzuki H., Nagatake T., Nishino T., Mizuguchi K., Miyachi M., and Kunisawa J., Method for preparing DNA from feces in guanidine thiocyanate solution affects 16S rRNA-based profiling of human microbiota diversity, Sci Rep, 7(1):4339, 2017

2. 学会発表

[1] Hosomi K., Murakami H., Natsume-Kitatani Y., Yi-An C., Ohno H., Tanisawa K., Kawashima H., Nishino T., Matsunaga A., Hirata S., Suzuki H., Nagatake T., Mizuguchi K., Miyachi M., Kunisawa J., Optimization of DNA preparation method from feces in guanidine thiocyanate solution for 16S rRNA-based profiling of human microbiota diversity. In Cold Spring Harbor Asia Conference on Microbiota, Metagenomics & Health, Suzhou, China. 2017.9.4-8

[2] 夏目やよい, 健康人における生活習慣・腸内細菌叢とデータベース構築, CBI学会2017年大会フォーカストセッション, 東京, 2017.10.4 (招待講演)

[3] Mohsen A., Park J., Chen Y., Kawashima H., Mizuguchi K., Impact of read trimming on Illumina paired-end-sequencing samples in the microbiome analysis using Qiime, CBI学会2017年大会, 東京, 2017.10.3

[4] 水口賢司, 坂手龍一, 深川明子, 五十嵐芳暢, 陳怡安, 樋口千洋, 長尾知生子, 創薬・健康・栄養研究を支援するNIBIOHNのデータベース, 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 神戸, 2017.12.6

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

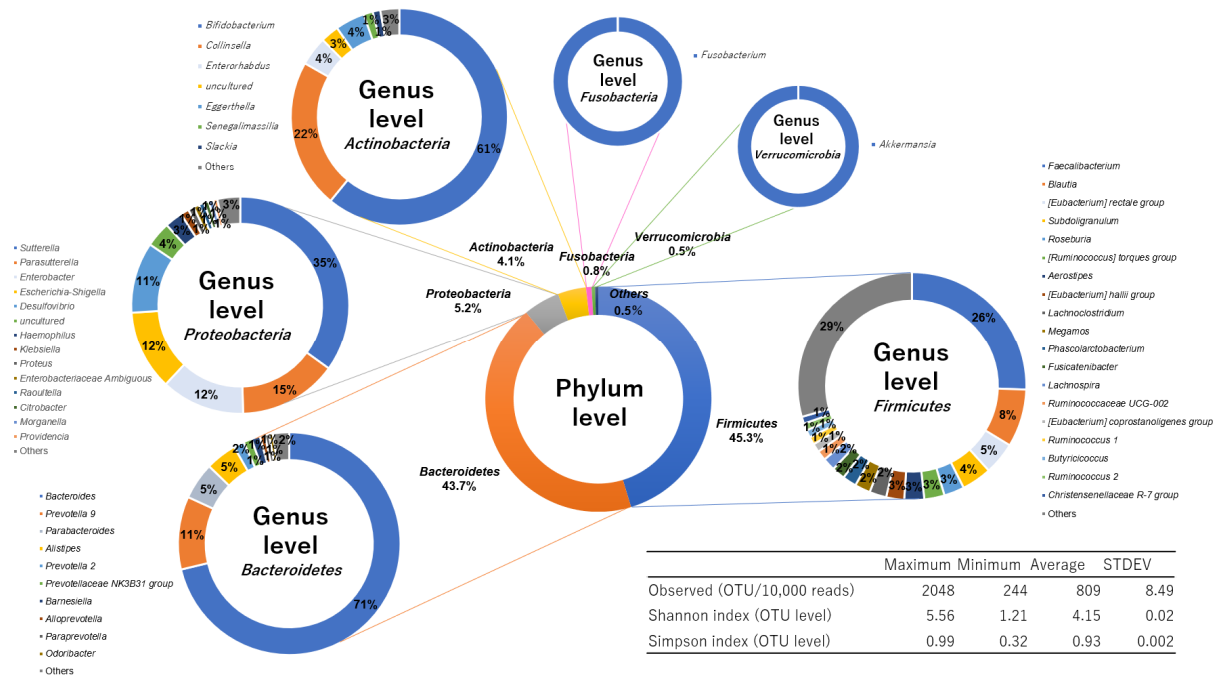


図1. 日本人の腸内細菌叢: 門レベル、属レベル

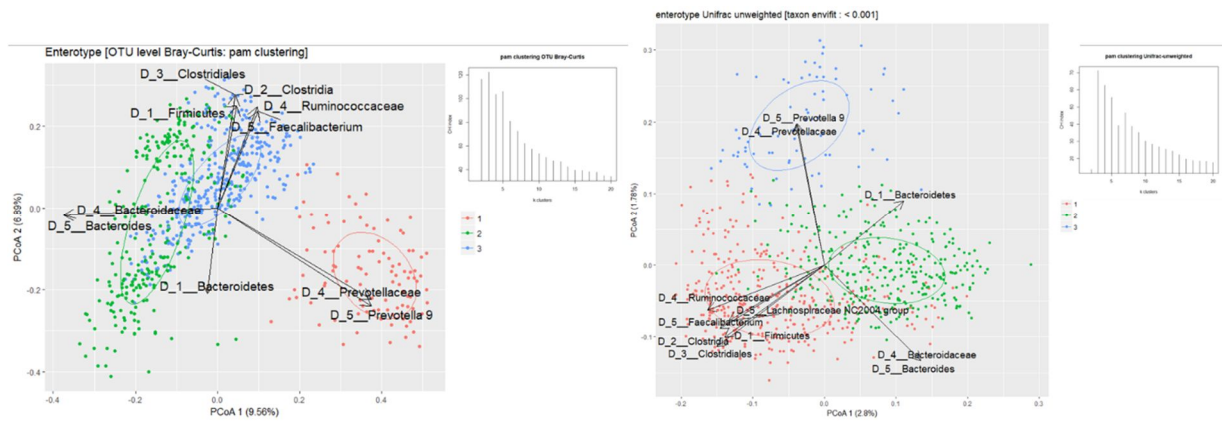


図2. 日本人の腸内細菌叢エンテロタイプ

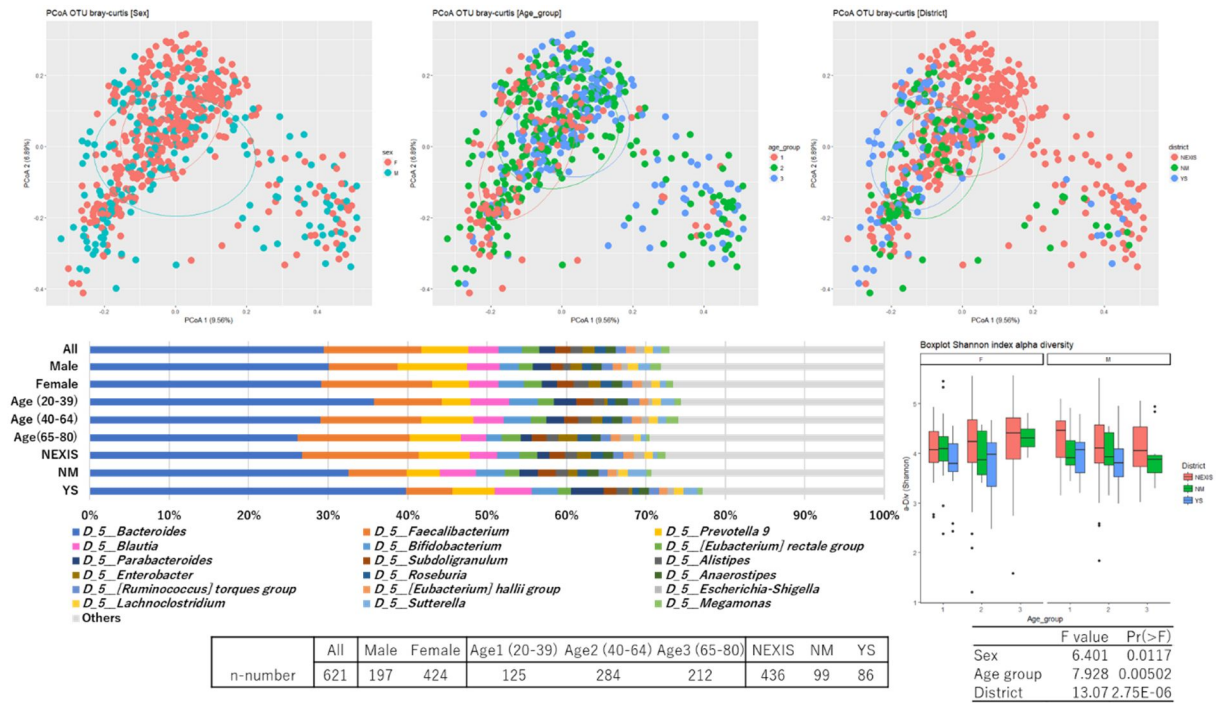


図3. 性別、年齢層、地域に対する腸内細菌叢およびα多様性

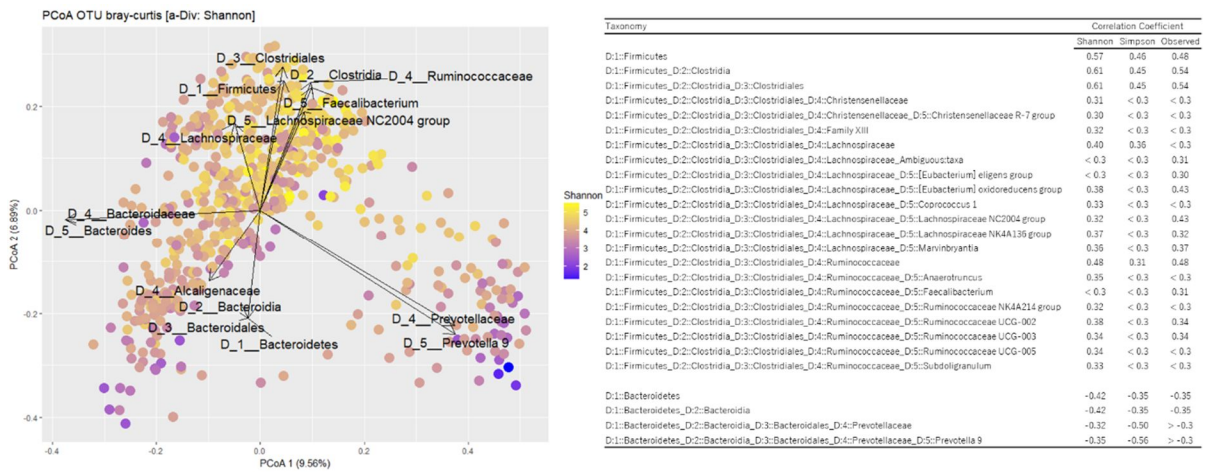


図4. 腸内細菌多様性とTaxonomyの関係

Gut Microbiota v2

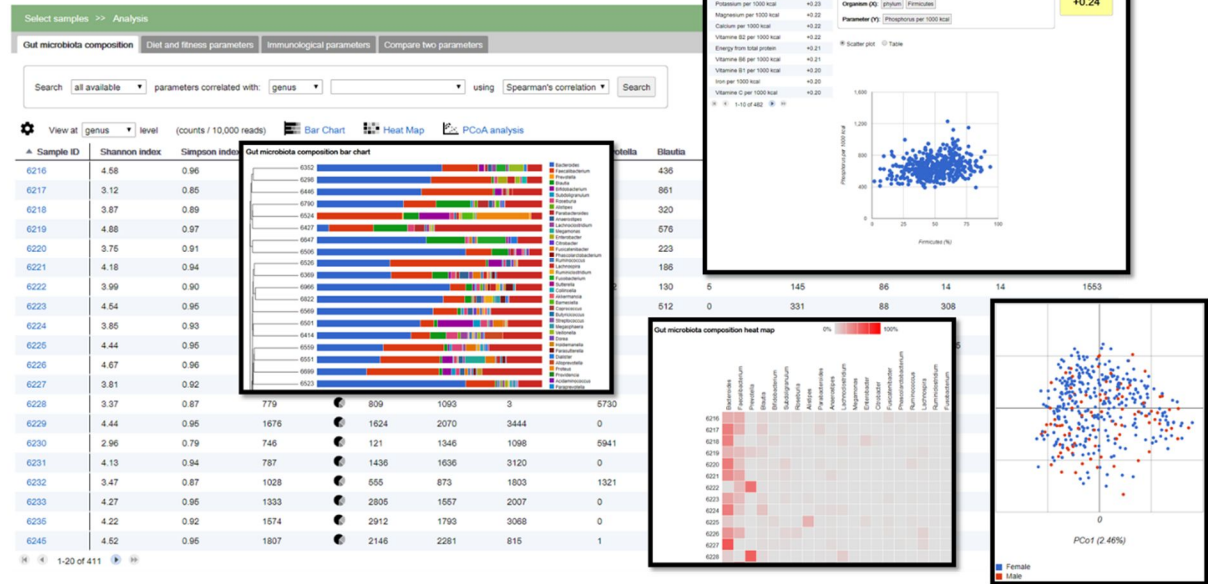


図5. 腸内細菌叢と生活習慣等の関連を図示化するソフトウェア (Gut Microbiota)