

厚生労働科学研究費補助金（政策科学総合研究事業）

（臨床研究等 ICT 基盤構築・人工知能実装研究事業）

総括研究報告書

糖尿病個別化予防を加速するマイクロバイオーム解析 AI の開発

研究代表者： 米田悦啓（国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 理事長）

現在、腸内細菌を中心にマイクロバイオームをテーマとした研究が世界中で進められている。本研究グループは、国内の各研究機関で収集されている有疾患者のデータを最大限に活用するため、種々のデータベースと突合・参照可能な日本人健常者のデータベースの構築を進めている。さらに糖尿病に関しては、同一プロトコルでの解析を進め、疾患と 관련된腸内細菌や糖尿病を改善出来る脂質代謝物の同定にも成功している。

一方で、これら同定した腸内細菌や代謝物では糖尿病の発症制御を説明できない事例も存在することから、現在の手法では同定出来ていない因子が存在すると予想される。そこで本研究では、複数の研究に参加した健常者 2,183 名と糖尿病患者 235 名、その他の者や縦断検体（883 検体）を対象に、腸内細菌叢の代謝機能を推定できる高機能なメタゲノム解析を実施し、健常者と糖尿病患者の腸内細菌叢の特徴をデータベースで解析出来るようにした。さらに未同定の実効分子を同定するための最先端メタボローム解析システムを立ち上げた。これにより、糖尿病の個別化予防やヘルスケア・機能性食品開発等のためのデータベースならびに人工知能（AI）の機能強化を図ることが可能になった。

参画研究者： 國澤 純（国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所ワクチン・アジュバント研究センター、センター長）、宮地元彦（国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所身体活動研究部、部長）、水口賢司（国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 AI 健康・医薬研究センター、センター長）、窪田直人（東京大学医学部付属病院、准教授）

ている有疾患者のデータを最大限に活用するため、種々のデータベースと突合・参照可能な日本人健常者のデータベースの構築が急務であると考え、平成 27 年度より健常人を対象にしたデータベースの構築・公開活用を目指した取り組みを行っている。これまでの研究から、健常者マイクロバイオームデータベースを 1,200 名規模で構築している（平成 30 年度末時点）。

本データベースには、腸内細菌叢を中心とするマイクロバイオームデータだけではなく、GWAS などのゲノム情報、食事状況や身体活動などの生活習慣、健康診断情報、動脈硬化度や筋力などの生理・体力指標、免疫因子や代謝物など生活習慣や生体内因子等の豊富なメタデータが登録されている。また一部の参加者においては経時的な変化

A. 研究目的

欧米等では、マイクロバイオームをテーマとした大型プロジェクトが国家規模で進められているところ、日本では、各研究機関が個々に有疾患者を主対象とした研究を個別に行っているのが現状である。本研究グループは、国内の各研究機関で収集され

を解析するための縦断データが含まれている。さらに現在、共同研究として多くのグループに解析プロトコルを提供し、同一プロトコルで収集した様々な疾患患者のデータ統合を進めている。特に糖尿病に関しては、疾患と相関する腸内細菌や糖尿病を改善出来る脂質代謝物の同定に成功している。

一方で、これら同定した腸内細菌や代謝物では糖尿病の発症制御を説明できない事例も存在しており、現在の手法では同定出来ない因子が存在すると予想される。すなわち本システムの課題として、微生物の機能やそれに連動し産生される代謝物に関わる情報が十分には得られていないことが挙げられる。そこで本研究では、これまでに構築した研究基盤を活用し、健常者1,200名と300名の糖尿病患者のサンプルを対象に、腸内細菌叢の代謝機能を推定できる高機能なメタゲノム解析を実施し、健常者と糖尿病患者の腸内細菌叢の特徴をデータベースで解析が可能になるようにする。さらに未同定の実効分子を同定するための最先端メタボローム解析システムを立ち上げ、測定を開始する。これにより、糖尿病の個別化予防やヘルスケア・機能性食品開発等のためのデータベースならびに人工知能(AI)の機能強化を図る。

B. 研究方法

サンプリング、遺伝子抽出、16S rRNA 解析、ショットガンメタゲノム解析

グアニジン塩を含む保存液を用いて採取した便サンプルから、ビーズ破砕法によりDNAを抽出した。糞便DNAから16S rRNA遺伝子のV3-V4領域をPCR法で増幅し、MiSeqを用いて塩基配列を解読し、Qiimeパイプラインを用いて菌種を同定した。

同じ糞便DNAを物理的に断片化、アダプ

ターを付加し、NovaSeq6000を用いて塩基配列を解読した。Bowtie2を用いてヒトゲノム由来の配列を除去し、マイクロバイオームのメタゲノム情報を取得した。

データベースへの格納とシステム拡張

約3000検体のショットガンメタゲノム情報を格納し、解析するためにサーバーに約100TBのディスクを増設した。また、系統組成解析と遺伝子機能解析を実施するために、それぞれKaijuとFMAPをサーバーにインストールした。

(倫理面への配慮)

本研究は、医薬基盤・健康・栄養研究所ならびに東京大学において倫理審査、承認を得た後、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に従って遂行した。

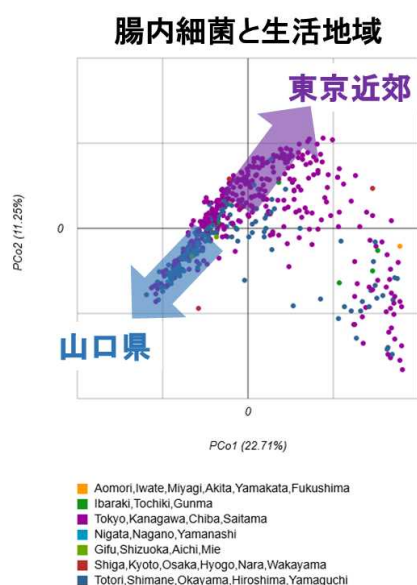
C. 研究結果

新規サンプルの収集と16S rRNA解析

医薬基盤・健康・栄養研究所において、大阪府や山口県、新潟県などの地域コホートから新たに約600名のサンプルを収集し、糞便の16S rRNA解析を実施した。統合解析プラットフォーム(MANTA)を用いた解析例として、腸内細菌と生活地域との関連を可視化した主座標分析結果を示す。東京近郊(約400名)と山口県在住(約300名)の参加者において腸内細菌の違いが認められた(次頁図1)。

また東京大学においては、新規ならびに既存の計280サンプル(健常人193名、糖尿病患者97名)のライブラリ調整を行ったが、DNA量が不十分なためライブラリの収量が不足したものなどあり、最終的に計271サンプル(健常人184名、糖尿病患者87名)を機能的メタゲノム解析に供した。

図1 医薬基盤・健康・栄養研究所コホート参加者の腸内細菌と生活地域の関連



ショットガン解析による機能的メタゲノム解析

医薬基盤・健康・栄養研究所で収集した健常者（1,990名）—糖尿病患者（138名）、その他の者ならびに縦断検体（883検体）の合計3,011検体のショットガン解析を、タカラバイオ株式会社に委託し実施した。3,011名のfastqファイルが2020年3月19日に納品された。平均リード数4,814万リード、最少リード数771万、最多リード数13,130万リードであった。うち1名のサンプルでヒト由来DNAが大部分を占めていたことにより、不適合となり、最終的に3,010検体のショットガンメタゲノムデータを取得した。

研究協力者の特徴として、糖尿病患者のBMI (24.9 kg/m²) は健常者 (22.0 kg/m²) より有意に高かった。また、糖尿病患者の血糖値 (91 vs 127 mg/dl)、HbA1c (5.5 vs 7.1 %) も健常者より有意に高値を示した。その他、医薬健栄研の独自コホートに参加された

1,616名のメタデータを図2に示す。

図2 医薬基盤・健康・栄養研究所コホート参加者のメタデータ

医薬健栄研 1616名			
年齢	男性	女性	計
20歳代	103	54	157
30歳代	144	105	249
40歳代	179	141	320
50歳代	133	139	272
60歳代	236	138	374
70歳代	133	103	236
80歳代	3	5	8
計	931	685	1616
糖尿病			
	男性	女性	計
I型	16	15	31
II型	69	57	126
小計	85	72	157
非糖尿病	846	613	1459
健常・非健常			
	男性	女性	計
非健常	159	164	328
健常	526	767	1293

データベースへの格納と機能拡張の状況

3,010検体のショットガンメタゲノムデータをサーバーに格納した。また、系統組成解析と遺伝子機能解析を実施するために、それぞれ Kaiju と FMAP をサーバーにインストールし、解析の環境を整備した。

超臨界質量分析システムのデザイン、セットアップ

最先端のメタボローム解析システムとして、超臨界流体抽出装置、超臨界流体カラムクロマトグラフィー質量分析計（シングルMS）、液体クロマトグラフィー質量分析計（三連四重極型MS）が連動したシステムを導入し、解析を開始した。

D. 考察

共同研究先機関の協力を得ることができ、当初予定していた1,200名から大幅に増え

3,000 名を超えるサンプルの解析を達成することができ、メタデータの付随した世界最大規模のデータベース構築となった。その中で、医薬基盤・健康・栄養研究所コホートは健常者を中心にサンプリングを行っていたため、糖尿病患者の腸内細菌叢ショットガンメタゲノムデータは 138 名と、健常者の 1,990 名と比較して不十分ではあった。また東大コホートのサンプルについては、一部、DNA 量が不十分のためライブラリの収量が悪いものなどあり、当初予定していたサンプル数を下回ってしまった。しかしながら、測定できたサンプルのいずれも取得した 2,000 万リード以上（医薬基盤・健康・栄養研究所、7Gbp 以上（東京大学）の精度の高いデータが得られており、今後の解析に十分耐えられると考えられた。今後、これら医薬基盤・健康・栄養研究所と東京大学で得られたクオリティの高いデータを並行して比較、解析していくことで、糖尿病と関係する腸内細菌と関連する代謝機能の探索を効果的に進める予定である。

また有用代謝物の同定のために今回導入した超臨界流体抽出装置においては、二酸化炭素の超臨界流体を抽出溶媒として用いており、従来の前処理法では抽出できなかった物質が抽出されることが期待できる。未知物質を含めたピーク分子の生理活性を見るための分取システムも整えており、これについては超臨界流体カラムクロマトグラフィー質量分析計（シングル MS）を用いて実行可能である。さらに、超臨界流体抽出物を液体クロマトグラフィー質量分析計（三連四重極型 MS）に供することで脂質メディエーター、胆汁酸、短鎖脂肪酸、一次代謝物の定量解析を行うことのできる解析ソフトウェアの準備も整っている。これら最先端のメタボローム解析システムを駆使

することで、新たな実効分子が同定されることが期待できる。

E. 結論

本研究において、精度の高いマイクロバイオームメタゲノム解析による腸内細菌の機能解析と高機能メタボローム解析によるポストバイオティクス（有用微生物が産生する有用代謝物）分析を実施し、これまで未測定であった糖尿病予防に繋がる実効因子の同定が可能になる。またこれらのデータを搭載したデータベースは、国内あるいは諸外国と比較しても類をみない多項目（400 項目）の背景情報を有する健常者（3,000 名）－糖尿病患者（300 名）の世界最大規模のマイクロバイオームデータベースとなる。これらビッグデータを独自に開発している統合解析プラットフォーム（MANTA）を用いて解析することにより、糖尿病の個別化予防や機能性食品開発等のための人工知能（AI）開発へ発展させると共に、民間と連携し糖尿病予防に関連する機能性食品・ヘルスケア関連産業の開発・投資につながると期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 長竹貴広、國澤純 必須脂肪酸代謝物による免疫制御の実態解明 **FOOD Style 21** 24(3): 31-34, 2020
2. 雑賀あずさ、國澤純 食事性脂質の摂取と腸内細菌叢との相互作用を介したアレルギー疾患制御の可能性 **ILSI Japan 141**: 12-21, 2020
3. 長竹貴広、國澤純 オメガ 3、オメガ 6、

- オメガ 9 脂肪酸の代謝による新たな免疫・アレルギー・炎症の制御機構～食用油を使い分けてより健康に～ **化学と生物** 58(2): 97-103, 2020
4. 松永安由、國澤純 食と腸内細菌叢から考える健康社会の近未来 **食文化研究** 15: 62-66, 2020
 5. 長竹貴広、國澤純 プロバイオティクス、プレバイオティクス、シンバイオティクスとは **糖尿病ケア** 17(1): 16-18, 2020
 6. 細見晃司、國澤純 善玉菌・悪玉菌とは **糖尿病ケア** 17(1): 14-15, 2020
2. 学会発表
 1. 國澤純、食と腸内細菌が作り出す脂質環境の理解と疾患予防戦略への展開 **日本薬学会第 140 年会** 京都（国立京都国際会館）（2020 年 3 月 28 日）＊新型コロナのため web 要旨のみでの発表
 2. 國澤純、細胞内共生細菌を介した免疫制御と炎症 **日本薬学会第 140 年会** 京都（国立京都国際会館）（2020 年 3 月 27 日）＊新型コロナのため web 要旨のみでの発表
 3. 國澤純、腸内細菌から考える食の未来と健康科学 **食品ニューテクノロジー研究会** 東京（食情報館）（2020 年 2 月 20 日）
 4. 國澤純、腸内環境から考える個別化栄養指導の近未来像 **第 65 回食品新素材研究会** 東京（東京大学 弥生講堂 アネックス）（2020 年 2 月 7 日）
 5. 國澤純、腸から眺める健康科学の将来展望 **彩都産学官フォーラム 2020** 大阪（千里ライフサイエンスセンター）（2020 年 1 月 22 日）
 6. 國澤純、健常人ビッグデータ解析とマイクロバイオームを対象とした社会実装研究 **第 1 回 口腸連関研究会** 東京（東京工業大学キャンパス・イノベーションセンター）（2019 年 12 月 7 日）
 7. Jun Kunisawa, Diets and Commensal Bacteria Create Gut Environment for the Immunological Health and Diseases **ICoFF 2019 International Convention Center, Kobe, Japan** (3rd December, 2019)
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
該当事項なし
 2. 実用新案登録
該当事項なし
 3. その他
特記事項なし