

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))

分担研究報告書

認知症に關与するマイクロバイオーーム・バイオマーカー解析(認知症領域を対象とした腸内及び口腔内細菌の解析)

研究分担者 服部 正平 早稲田大学・理工学術院・教授(任期付)

研究要旨

本研究は認知症マイクロバイオーーム(常在微生物叢)を解析することで、マイクロバイオーームを利用した非侵襲性で高精度な認知症の新規診断バイオマーカーの開発、認知症発症に關与するヒト腸内微生物種等の特定、ならびに認知症発症の分子メカニズムを解明する。本年度では、age-matchingした認知症、MCI、非認知症の被験者の唾液検体(合計80検体)のマイクロバイオーームの16S遺伝子データの比較解析を行い、認知症群及びMCI群に唾液マイクロバイオーーム構造の有意な変容が觀察された。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)を主とする認知症は患者の記憶を喪失させるのみでなく人格をも崩壊して患者の社会生活機能を喪失させる極めて重要な社会問題である。我が国においては近年の超高齢化に伴って認知症関連患者が急激に増加しており世界の中でも人口に対する認知症の割合が高い。一方で、認知症の発症要因とその機構はほとんど明らかでないため、その解明と、それに基づいた適正な診断、治療、予防法等の開発は世界的な緊急

課題である。早稲田グループは、予備研究においてマイクロバイオーームが認知症に關与するいくつかの証拠を得ている(未発表)。本研究では、認知症の口腔及び腸内マイクロバイオーーム研究を推進し、口腔微生物を利用した非侵襲性で高精度な認知症の新規診断バイオマーカーの開発を目指す。また、腸内マイクロバイオーーム研究の推進では、認知症の発症に關わる腸内微生物種、代謝物、遺伝子、タンパク質、宿主免疫系等をヒト及びマウスデータ(認知症腸内マイクロバイオーーム定着ト

バイオートマウスや認知症モデルマウス)の両面から特定し、その発症機構を包括的に解明する。

B. 研究方法

本研究では、AD及び軽度認知障害(MCI)を含む認知症患者、並びにコントロールとしての非認知症被験者、各300名から唾液及び糞便を採取し、次世代シーケンサーを用いてそれぞれの16S rRNA遺伝子またはメタゲノムデータを取得する。これらのマイクロバイームデータを認知症群と非認知症群間で比較解析し、認知症群で有意に増減している微生物種を情報学・統計学的に絞り込む。認知症に特徴的な口腔微生物種は新規な認知症バイオマーカーの開発に繋げる。一方、認知症に特徴的な腸内微生物種は認知症の発症や抑制に関与する可能性が高い。そのため、これら微生物種を定着させたノバイオマウスや各種ADモデルマウスを用いて、AD関連タンパク質、ニューロン変性・新生、行動認知等の認知症に関係する生体分子・現象におけるこれら微生物種の諸機能を解析する。さらに、AD/認知症患者の糞便を定着させたノバイオマウスの認知行動試験等からも認知症に関与する微生物種の特定に迫る。これらヒト及びマウス研究で得られるデータを統合することで、認知症に関わる腸内微生物種(関係する代謝物、遺伝子、タンパク質、宿主免疫細胞等)を特定し、その発症機構を明らかにする。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト試料(唾液、糞便)を解析するため、本研究の遂行にあたっては、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針及び研究者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守し、被

験者に対して本研究の目的・方法について説明を行い、自由意思のもとで文書による同意を得た後に検体採取を行った。また、個人情報情報は匿名化によって、個人情報管理者のもとで厳密に管理している。

動物実験の遂行にあたっては、動物の愛護及び管理に関する法律、実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準、並びに研究機関等における動物実験等の実施に関する動物実験等取扱規定に従い行った。尚、研究倫理教育に関するeラーニングも受講済みである。

C. 研究結果

本年度では、認知症(n=7)、MCI(n=38)、非認知症(n=35)の被験者(age-matchingした合計80検体、表1)の唾液検体のマイクロバイームの16S rRNA遺伝子データ(約2万リード/検体)の比較解析を行った。その結果、非認知症群 認知症群間でマイクロバイームのOTU数(微生物種の豊富さ)及びShannon index(微生物種の豊富さ+分布均衡性)を指標とする 多様性に有意な違いが観察された(図1)。また、非認知症群 MCI群間では、MCIにおいて 多様性が増加する傾向が観察された。一方、UniFrac解析から非認知症群 認知症群間及びMCI群 認知症群間に菌種組成(多様性)に有意な違いが観察された(図2)。これらの認知症群及びMCI群と非認知症群との唾液菌叢の違いに関与する微生物種を門、属、種レベルで解析した。その結果、1門、5属、23種の微生物種が統計有意に特定された。尚、マウス研究では、使用する各種ADモデルマウス及びノバイオマウスの作製に用いる無菌マウスの入手と飼育環境・条件の整備、糞便採取法の検討等を行っ

た。

D. 考察

マイクロバイオームの16S rRNA遺伝子解析から、今回のMCI群あるいは認知症群の唾液マイクロバイオームは非認知症群との比較において有意に変容していることが示唆された。この変容は過去の研究における認知症患者群と同様な結果が得られており、MCI群及び認知症群の唾液マイクロバイオームの変容は再現性があり、新規な診断唾液バイオマーカーの開発に繋がると期待される。さらに、唾液の採取は極めて簡便なため、様々な認知症進行の緩和手法の科学的な評価システムとしても有用であると考えられる。

今後は目標数の非認知症、MCI、認知症被験者からの唾液と糞便を採取し、それぞれのマイクロバイオーム比較解析を進め、唾液についてはより特異性の高い診断バイオマーカーの開発を進める。腸内マイクロバイオー解析も同様な解析を進め、認知症に關与する微生物種の絞り込みと、マウスを用いた生物実験によりこれら微生物種の機能(AD関連タンパク質、ニューロン変性・新生、免疫分化、行動認知等との関連性)を解析し、認知症へのこれら微生物種の關与を種々のデータ(代謝物、遺伝子、タンパク質)から実証する。

E. 結論

認知症、MCI、非認知症の唾液マイクロバイオームの比較解析から、認知症群、MCI群にマイクロバイオーム構造の有意な変容が観察された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki N, Hyodo M, Hayashi C, Mabuchi Y, Sekimoto K, Onchi C, Sekiguchi K, Akazawa C. Laminin 2, 4, and 5 chains positively regulate migration and survival of oligodendrocyte precursor cells. *Sci Rep* 9(1):19882, 2019.
- 2) Ueno SI, Hatano T, Okuzumi A, Saiki S, Oji Y, Mori A, Koinuma T, Fujimaki M, Takeshige-Amano H, Kondo A, Yoshikawa N, Nojiri T, Kurano M, Yasukawa K, Yatomi Y, Ikeda H, Hattori N. Nonmercaptalbumin as an oxidative stress marker in Parkinson's and PARK2 disease. *Ann Clin Transl Neurol.* (3):307-317, 2020.
- 3) Septyaningtrias DE, Lin CW, Ouchida R, Nakai N, Suda W, Hattori M, Morita H, Honda K, Tamada K, Takumi T. Altered microbiota composition reflects enhanced communication in 15q11-13 CNV mice. *Neurosci Res.* pii: S0168-0102(19)30671-6, 2019.

2. 学会発表

- 1) 緒方勇亮, 須田互, 黒川李奈, 木口悠也, 田野倉真紀, 甲斐田薫, 進藤智絵, 坂本光央, 大熊盛也, 服部正平: 多様なモック菌叢とヒト糞便を用いたヒト糞便DNA抽出法の評価. 2019年日本分子生物学会, 福岡, 2019年12月3日.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録

- なし。
- 3.その他
なし。

	非認知症 (n=35)	MCI(軽度認知障害) (n=38)	認知症 (n=7)
年齢 (Mean±s.e.m)	72.6±0.96	75.4±1.07	74.3±3.79
Males %	22.9	47.4	57.1

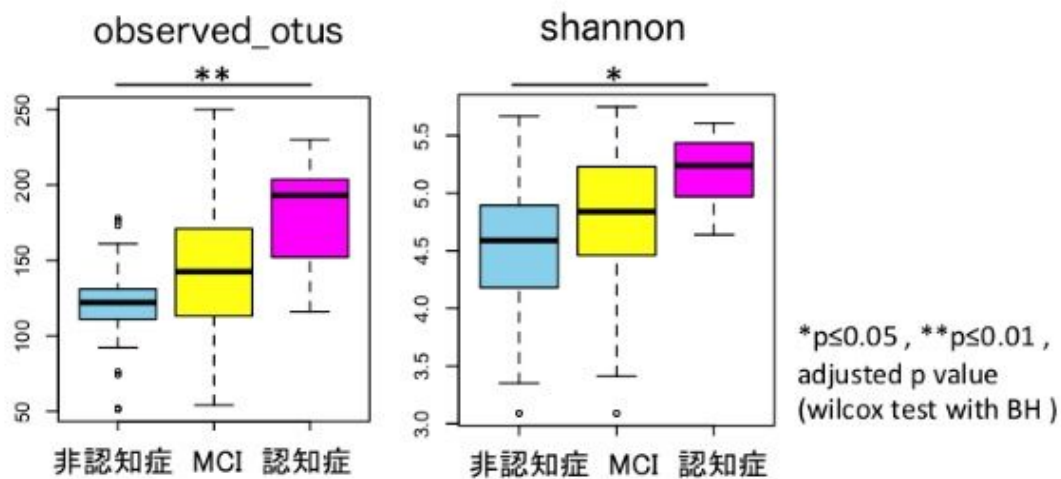


図1. 16Sデータに基づいた3群間の唾液細菌叢の α 多様性比較

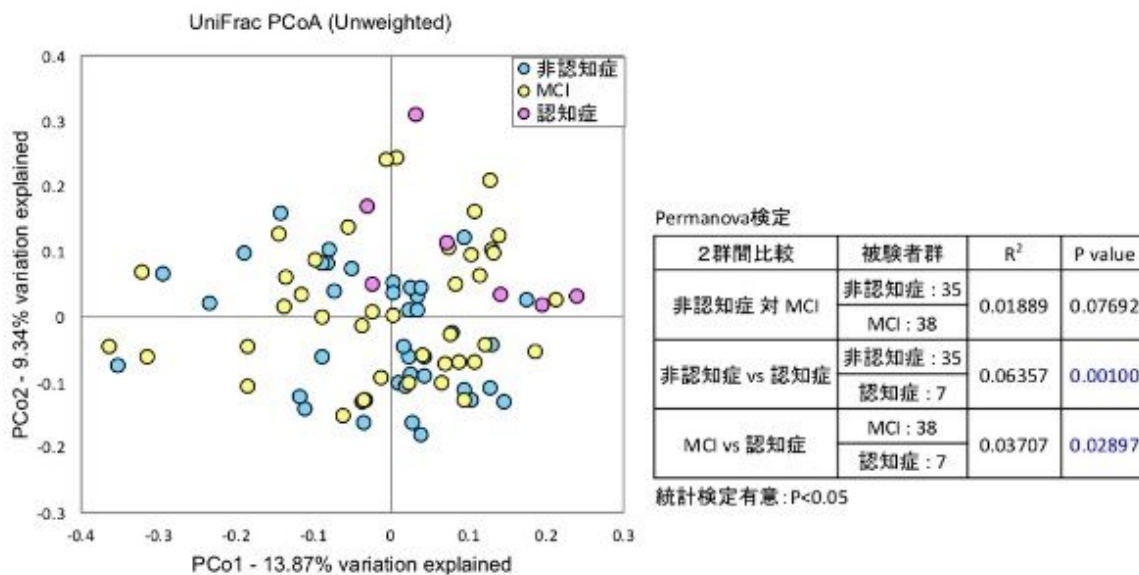


図2. 3群間の唾液菌種組成の全体構造 (β 多様性)のUniFrac解析