

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)

認知症に関与するマイクロバイーム・バイオマーカー解析

令和2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山本 万里

令和3(2021)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

- 認知症に関するマイクロバイーム・バイオマーカー解析
(健常人の健康調査による認知症に関わるバイオマーカー、エピゲノム解
析1) -----1
山本 万里 (国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品
研究部門)

II. 分担研究報告

1. 認知症に関するマイクロバイーム・バイオマーカー解析
(健常人の健康調査による認知症に関わるバイオマーカー、エピゲノム解
析2) -----5
西平 順 (学校法人電子開発学園北海道情報大学)
2. 認知症に関するマイクロバイーム・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) -----11
大島登志男 (早稲田大学 理工学術院)

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----15

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

研究課題名：認知症に関与するマイクロバイオーム・バイオマーカー解析

研究代表者 山本 万里

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
食品研究部門・ヘルスケア創出研究統括監

研究要旨

本研究は、簡便かつ精度の良い認知症や軽度認知障害(MCI)のリスク評価のための血清バイオマーカー開発を目的としている。本年度は、健常者(Healthy)に加え、新たに軽度認知障害(MCI)と認知症患者(AD)の被験者データを追加し、認知症の早期診断法や認知症予防に深く関わるバイオマーカーを発見することを目指した。血中アミロイドβ値は、AD群における蓄積が最も高く、認知症研究の重要なマーカーであることが証明された(分担研究)。また、アミロイドβ蓄積リスクの有無を指標とするApoE4非保有者におけるSNPを見いだした。さらに、Healthy群とAD群のエピジェネティック解析において、認知症との関連が強いと考えられる候補メチル化サイトを複数サイト見出した(分担研究)。これは新たに認知症予防の指導や認知症の早期診断ツールへの可能性を示した。

また、認知症マイクロバイオームを解析することで、高精度な認知症予測の微生物バイオマーカーの開発、認知症発症に関与する腸内微生物種とその産物等の特定、ならびに認知症発症の分子メカニズムの解明を目指し、唾液微生物叢(300検体以上)の解析から認知症、MCI、非認知症を高精度で予測するモデルを機械学習法により構築した。また各種認知症モデルマウスの解析から、脳内Ab蓄積、行動異常、ニューロン新生などに強く相関する腸内微生物群を特定した(分担研究)。

分担研究者

西平順 (学校法人電子開発学園北海道情報大学・医療情報学部・教授)
大島登志男 (早稲田大学・理工学術院教授)

研究協力者

服部正平 (早稲田大学・客員主管研究員)
本田賢也 (慶應義塾大学・医学部・教授)
服部信孝 (学校法人順天堂 順天堂大学・医学部・教授)
赤澤智宏 (学校法人順天堂 順天堂大学・医学部・教授)
中島欽一 (国立大学法人九州大学・大学院医学研究院・教授)
菊水健史 (麻布大学・獣医学部・教授)
須田互 (理化学研究所・副グループリーダー)

A. 研究目的

日本では超高齢化の進行とともに、認知症の患者や認知症予備軍である軽度認知障害の数は増え続けており、認知症の人口に対する割合が他国に比べて大きく、認知症の半分をアルツハイマー型が占める。アルツハイマー型認知症の発症は、アミロイドβ (Abeta) の蓄積が大きく関わっていることが知られており、今まで、バイオマーカーとしては、Abeta-42、単球遊走因子 (Monocyte Chemotactic Protein-1; MCP-1)、ミクログリア機能調節因子 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2 ; sTREM2)、心臓由来脂肪酸結蛋白 (Heart-type Fatty Acid-Binding Protein ; H-FABP)、シナプスタンパク質ニューログラニン (synaptic protein neurogranin)、ニューロフィラメント軽鎖 (neurofilament light chain; NFL)、キチナーゼ様タンパク質YKL-40などが報告されている。脳内に蓄積するAbetaに関して感度の高い検査としては、PIBトレーサを用いたPET画像検査や脳脊髄液 (髄液) での測定等があるが、高額、侵襲性が高いことが問題だった。しかし、近年、血清Abetaの測定法が確立し、PET画像との相関も高いことが報告されるようになった。

そこで、健常者 (未病者を含む) の認知症に関わるバイオマーカー、エピジェネティックデータ、腸内・口腔内マイクロバイーム等を解析し、認知症発症と深く関わる新たなバイオマーカーの発見、さらには食品・食事との関係を明らかにする。これらの情報をデータベースへ集約すると共に、早期診断法、認知症予防のための機能性食品開発に生かし、認知症発症者数の減少に資することを目的とする。

B. 研究方法

1. 対象者

本研究への参加を希望された21歳から80歳までの未病を含む健康な被験者474名である。

2. 測定項目

参加した被験者から採血を行い血中アミロイドβ (以下、Abeta) の測定に使用した。Abetaは、 $A\beta_{1-42}$ 及び前駆体である APP₆₆₉₋₇₁₁ が良好な診断バイオマーカーであることが知られている。そこで、被験者の血漿に、抗アミロイドβモノクローナル抗体を結合した磁気ビーズを処理した後、免疫沈降 (IP) を行い、アミロイドβを磁気ビーズから溶出した後、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分

析法 (MALDI-TOF MS) により $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 及びそれらの前駆体である APP₆₆₉₋₇₁₁ の3種のペプチドを測定し、APP₆₆₉₋₇₁₁/ $A\beta_{1-42}$ 及び $A\beta_{1-40}$ / $A\beta_{1-42}$ 2種のバイオマーカー値を算出した。それぞれの値を z-score 化 (データセットの値を平均値=0、標準偏差=1になるよう変換した値) して大きくスケールの異なる値をスケールした後、平均化した値を Composite Biomarker (CM) 値として算出した。測定は、島津テクニカルリサーチにおいて行なった。CM値は値が大きければアルツハイマー型認知症のリスクが高くなることが知られている。

被験者から血液を採取して、常法に従い、DNAを抽出・増幅し、DNAを「ジャポニカアレイ®」 (遺伝子多型解析用アレイ、東北大学 東北メディカル・メガバンク機構製) にかけて、各対象者の遺伝子多型を検出した。なお、この「ジャポニカアレイ®」は、日本人の大規模ゲノム解析の成果に基づいて作製された、約66万個の一塩基多型 (SNP) が搭載された遺伝子多型解析用アレイである。

各統計解析は、R パッケージツールを使用し解析を行なった。

C. 研究結果

「ジャポニカアレイ®」遺伝子多型解析用アレイを用いて検出した約66万個のSNPマーカーについて品質管理を実施し、クオリティコントロールとして、ジェノタイプピングの成功率が0.99未満のSNPs、歪んだハーディー・ワインベルク平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium) の p 値 (HWE: $p < 1.0 \times 10^{-6}$) を有するSNPs、および0.01未満のマイナーアレル頻度 (MAF) の15308個のSNPsを除外後、関連解析に使用した。クオリティコントロールを通過した合計643,607個のSNPsとCM値の関連について PLINK1.9¹⁾を用いGWAS解析を行った。GWAS解析の結果、ヒト染色体領域に存在する計4個のSNPsが有意なゲノムワイド水準 ($p < 1.0 \times 10^{-5}$) を満たし、Abeta (CM値) との有意な関連を示した。4個のSNPsはアルツハイマー型認知症やAbeta蓄積との関連は今まで報告されていなかった。

GWAS解析に用いた前述の474名の被験者から、50歳以下の187名を選び、さらに、Abeta蓄積量に影響を与えることが報告されているApoE4を保有していない142名を選び、前述の4個のSNPサイトにおいてCM値と遺伝子型分布についてのオッズ比を計算するとともに、Pearsonのカイ2乗検定を行った。なお、CM値

1.0以上 (Case)、CM値1.0未満 (Control) の2グループとして比較した。その結果、50歳以下かつApoE4非保有集団においては、4個の内の1つであるヒト染色体領域8q24.3上のSNPについて、CM値1.0以上かつAAの対立遺伝子を持つ被験者では、Odds ratio = 9.62 95%CI (1.25, 74.06)、Pearson χ^2 乗検定 p=0.001であった。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言を遵守して実施した。北海道情報大学生命倫理委員会にて倫理的及び科学的妥当性について審査、承認を得た。試験参加は被験者候補本人の自由意思による同意を文書にて取得。同意撤回した場合でも不利な扱いを受けることはないことを十分説明し行った。

D. 考察

認知症の最多割合を占める病型であるアルツハイマー型認知症では、脳内でのアミロイド β 蓄積が顕著に認められる。アミロイド β 蓄積は、臨床的な認知症が出現する約20年前から始まることが知られており、蓄積の初期段階での予防が望まれる。

一般的に、アルツハイマー型認知症の発症やアミロイド β 蓄積には先天的要因である遺伝要因と後天的要因である環境要因の両方が関与する。

アルツハイマー型認知症の感受性遺伝子としては、最も広く知られているのはアポリポプロテインE遺伝子タイプ4 (ApoE4)であり、日本では、全集団の10%程度がApoE4を保有する。ApoE4遺伝子を保有する群では、保有しない群と比較して60代以降アミロイド β 蓄積量に明確な差異が生じ、認知症発症リスクが高まることが知られている²⁾。

一方、ApoE4遺伝子以外の遺伝要因についても報告がなされている。

アルツハイマー型認知症発症への強い影響を持つApoE4遺伝子を持たない健常者かつ50歳以下の集団において、ヒト染色体領域8q24.3上のSNPにより、アミロイド β 蓄積の起こりやすさを判定することができた。本研究では健常者のみを対象としており、また、本研究実施後のアルツハイマー型認知症発症有無について追跡していない。よって、本研究の対象者には、将来的にアルツハイマー型認知症を発症する者、つまり研究時点でアルツハイマー型認知症

発症前早期段階の者と、将来的にアルツハイマー型認知症発症に至らない者が混在していることが予想される。このような集団であっても、統計学的にアミロイド β 蓄積リスクが高まると結論づけることができるSNPを検出できたことから、産業的にも、対象を限定せずに利用できるSNPであると言える。また、前記SNPは、これまで遺伝要因からの予防について見地が得られにくかったApoE非保有集団において利用可能なSNPであることから、産業的利用価値も大きいと言える。

E. 結論

これらの遺伝子型を考慮した個別化健康指導や栄養指導などの実現を示唆するとともに、ヘルスケア分野の市場拡大による経済効果が期待できると考えられる。

1) <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>

2) Jansen WJ et al. Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a meta-analysis. JAMA 313, 1924-1938, (2015). [PubMed: 25988462]

G. 研究発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

①「アミロイド β と関連する疾患又は状態の指標とする方法、並びに該方法に用いるための組成物及びキット」特願2020-153255 (2020年9月11日出願)

②「アミロイド β 蓄積リスクの有無の指標とする方法、一塩基多型 (SNP) の存在又は非存在を検出する方法、組成物、及びキット」特願2021-053424 (2021年3月26日出願)

2. 実用新案登録 なし

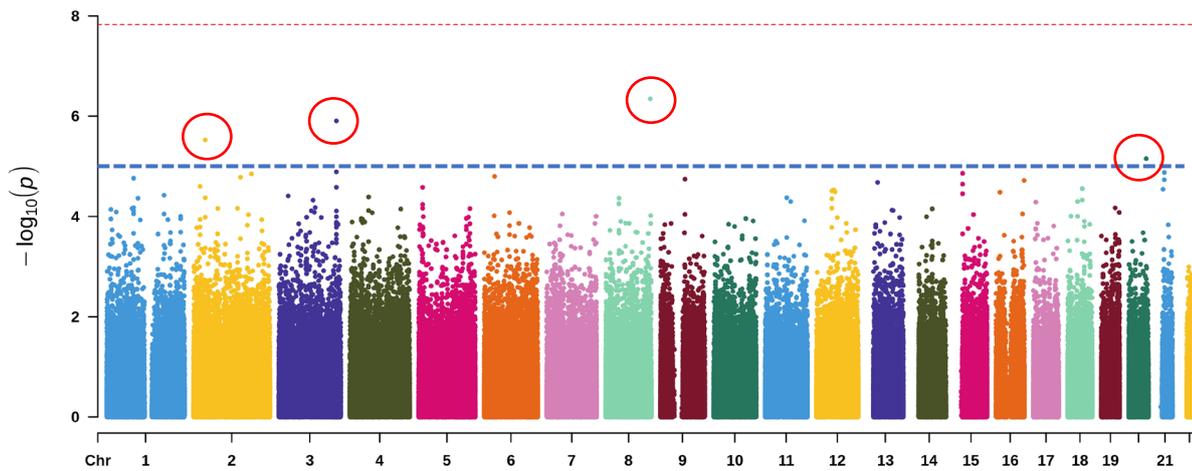


図 1. 全集団における Abeta と関連のある SNPs の選択 (マンハッタンプロット)
 青線を超える p 値 (縦軸) を示す 4 サイト (赤丸囲) が Abeta と関連あると判定された。

Odds ratio = **9.62**
 95%CI (1.25, 74.06)
 Pearson X²乗検定 p=0.01

| | GG | GA and AA | Total |
|----------------|-----|-----------|-------|
| Case | 2 | 2 | 4 |
| Control | 125 | 13 | 138 |
| Total | 127 | 15 | 142 |

図 2. ヒト染色体領域 8q24.3SNP サイトにおけるリスクアレル非保有/保有集団別 case/control 数 (case;CM 値 1.0 以上、control;CM 値 1.0 未満の被験者数)

別紙4

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

認知症に関するマイクロバイーム・バイオマーカー解析 (健常人の健康調査による認知症に関わるバイオマーカー、エピゲノム解析 2)

研究分担者 西平 順
学校法人電子開発学園北海道情報大学・医療情報学部・教授

研究要旨

本年度は、健常人(Healthy)に加え、新たに軽度認知障害(MCI)と認知症患者(AD)の被験者データを追加し、認知症の早期診断法や認知症予防に深く関わるバイオマーカーを発見することを目指した。血中アミロイドβ値は、AD群における蓄積が最も高く、認知症研究の重要なマーカーであることが証明された。また、Healthy群とAD群のエピジェネティック解析において、認知症との関連が強いと考えられる候補メチル化サイトを複数サイト見出した。これは、先に報告しているアミロイドβ蓄積リスクの有無を指標とするSNPとともに、新たに認知症予防の指導や認知症の早期診断ツールへの可能性を示した。

A. 研究目的

認知症の国内患者総数は、人口の高齢化とともに著増しつつある。また、近年高齢化が進むに伴い「軽度認知障害」などの、潜在的な認知症予備軍の数も増大していると予想される。そこで本研究は、認知症の重要なバイオマーカーとして知られている血中アミロイドβを用いて、未病者を含む健常人と軽度認知障害、認知症患者の3集団を比較。さらにゲノムデータ、エピジェネティックデータを取得し、認知症発症と深く関わる新たなバイオマ

ーカーの探索と開発を目指した。

また、これらの情報をデータベースへ集約し、食品・食事との関係を明らかにする事、さらには早期診断法、認知症予防のための機能性食品開発に生かし、認知症発症者数の減少に資することを目的とする。

B. 研究方法

1. 対象者

本事業への参加を希望された21歳から80歳までの未病を含む健康な被験者(以下、Healthy群)734名(2019年

度474名、2020年度260名)と60歳以上かつMMSE (Mini-Mental State Examination) 28点以下の軽度認知障害(以下、MCI群)の被験者78名、さらに北海道脳神経外科病院において認知症と診断された被験者(以下、AD群)70名。

2. 測定項目

参加した被験者から採血を行い血中アミロイドβ(以下、Abeta)の測定に使用した。測定は、島津テクニカルリサーチにおいて質量分析により行なった。

被験者の認知機能の検査は、Healthy群とMCI群の2群に対しMini-Cog®とQESD (Questionnaires for Earlier Stage of Dementia)の2種類の認知機能検査を行い、Mini-Cog検査において0点である場合は、解析除外とした。

糞便メタゲノム解析は、MCI群(77名)とAD群(32名)の2群において糞便を採取し、DNA抽出を行った。次世代シーケンスライブラリ調整は、ThruPLEX試薬を使用。シーケンスは、NovaSeq6000 (Illumina社)を用いリードデータを取得したのち、解析に供した。

エピジェネティックデータは、Healthy・MCI・ADの3群全てのデータを取得した。被験者血液から抽出したDNAを用い、約85万個のヒトCpGサイトを搭載しているIllumina EPIC array®を使用し、遺伝子修飾(メチル化)の測定を行なった。上記のHealthy群、MCI群、AD群の3群についての比較を行い、認知症発症と深く関わる新たなCpGサイトの検出、さらにバイオマーカーの探索を行なった。

各統計解析は、Rパッケージツールを使用し解析を行なった。

C. 研究結果

図1に、60歳以上のHealthy群(平均年齢 66.2 ± 4.0 歳)、MCI群(平均年齢 69.9 ± 4.4 歳)、AD群(平均年齢 77.6 ± 7.9 歳)の血中アミロイドβ(Composite Biomarker 値)のグラフを示した。ここでは、AD群>MCI群>Healthy群の順に、Abetaの蓄積が見られた。それぞれのAbetaの平均値±SDは、AD群 0.70 ± 0.88 、MCI群 -0.130 ± 0.62 、Healthy群 -0.30 ± 0.58 であり、統計的に有意な差が見られた($p < 0.001$)。

Mini-Cog®とQESDの2種類を用い認知機能の検査を行った結果、Mini-Cogの回答には2群間で有意な差は見られなかった。しかしながら、QESDの16設問の中で『記憶に関する設問』に関して、Healthy群とMCI群の間に大きな差が見られた(図2)。

次にMCI群77名、AD群32名から糞便を採取しDNA抽出を行い、糞便メタゲノム解析を行った。図3[A]に示した個人毎の腸内菌叢の系統分類結果では、MCI群と比較してAD群で、被験者の個人間差が大きく見られた。また2群間比較の系統分類結果、特にclass Actinobacteria、class Bacilli や class Clostridia の頻度に有意な違いが見られた(図3[B])。さらに、KEGG Orthologyデータベースを用いて遺伝子機能解析を行なった。図3[C]に示した階層的クラスタリング解析では、クラスター-Aは、MCI>AD、クラスター-Bは、AD>MCIの傾向があり、MCI群とAD群の腸内細菌叢の遺伝子機能に差が示された。

最後に軽度認知障害と関連のあるメチル化探索のため、Healthy(60歳以上)群、MCI群とAD群の3群を用いてエピゲノム解析を行った。EPICアレイ約85万サイトの内、サンプル全体の出現率が低いサイトや性染色体上のサイ

トを除き、約64万メチル化サイトを解析に使用した。Healthy群とMCI群の比較では、有意差($p < 0.05$)が見られた271252サイトのうちlogFC値 ± 0.1 以上は、92サイト(図4[A])。Healthy(60歳以上)群とAD群の比較では、有意差($p < 0.05$)が見られた290375サイトのうち、logFC値 ± 0.1 以上は、320サイト(図4[B])であった。さらに、Healthy(60歳以上)群 $>$ AD群を示す305サイトについて、遺伝子上の分布頻度を図5にまとめた。Bodyに存在するCpGサイトが最も多く、その他転写領域(TSS200, TSS1500)についても15%程度存在した。次に、CpGに関連する遺伝子の機能や局在を知るため Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)を行いGene ontology別に結果をまとめた(表1)。今回のメチル化サイトにはBP(biological process)に関わる遺伝子群が多く含まれていることが示された。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言を遵守して実施した。本学生命倫理委員会にて倫理的及び科学的妥当性について審査、承認を得た。試験参加は被験者候補本人の自由意思による同意を文書にて取得。同意撤回した場合でも不利な扱いを受けることはないことを十分説明し行った。

D. 考察

認知症は、アミロイド β が線維化し老人斑となり蓄積することが特徴の一つとされ、アミロイド β は、認知症発症に強く関わるタンパク質の一つである。今回、健康な被験者(Healthy群)・軽度認知障害(MCI群)・認知症患者(AD群)の3群間比較の結果、AD群の血中アミロイド β の蓄積が最も高

く、認知症研究の重要なマーカーであることが証明された。また、Mini-Cog[®]とQESDを使用した認知機能検査の結果は、Mini-Cog[®]ではMCI群とAD群に統計的な有意差は認められなかったが、QESD検査の『記憶に関する設問』において、MCI群とHealthy群に有意な差が見られ、プレクリニカル期にも有用であることが示された。これは、急速な高齢化に伴い認知症の早期発見・早期予防が重要である今日、MMSEやMini-Cog[®]の検査のみでは検出が難しい特に「超早期認知症患者」の症状において、従来の認知検査と合わせて複合的にQESDの設問を用いることにより、早期発見が可能であることが示唆された。

糞便メタゲノム解析は、MCI群とAD群の2群間で、特にclass Actinobacteria、class Bacilli やclass Clostridiaの頻度に違いが見られた。また、菌叢の遺伝子機能解析においても、この2群間で異なるクラスターが存在することが示された。排便障害が大きな問題となる認知症患者において腸内細菌叢の遺伝子機能解析をさらに進めることは、認知症予防や生活習慣・食事習慣の個別化指導への発展に繋がる可能性があると考えられ、これらのクラスタグループに対し詳細な解析を進めている。

さらに認知症に関わるバイオマーカー(メチル化サイト)の検出を目的として、健康な被験者(Healthy群)・軽度認知障害(MCI群)・認知症患者(AD群)の3群を用いて、エピゲノム解析を行った。特にHealthy群とAD群では、305サイトについて統計的に有意な差が認められた。この約60%のサイトが転写領域と遺伝子本体に含まれている事を考えると、認知症に関連のある

重要なメチル化サイトであることが示唆された。現在、軽度認知障害検出アレイの開発を視野に、抽出した305メチル化サイトの中から認知症・軽度認知障害と関連の強いメチル化サイトの選択を進めている。さらには、先に特許申請(特願2021-053424)にて報告した個々人の遺伝子背景(SNPs)結果とエピゲノム(本メチル化サイトの)検出を複合的に用いる事で、より精度の高い新たな認知症予防や生活習慣の個別化指導などへの展開を行うことが可能であると考えている。

E. 結論

これらの遺伝子型を考慮した個別化健康指導や栄養指導などの実現を示唆するとともに、ヘルスケア分野の市場拡大による経済効果が期待できると考えられる。

G. 研究発表

西平順, 佐藤浩二, プレシジョン栄養学におけるゲノム情報の活用—食・生活習慣と健康情報及び遺伝的背景の関係性解明, 臨床栄養 2020; 137(3): 311-319.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願2020-153255「アミロイドβと関連する疾患又は状態の指標とする方法、並びに該方法に用いるための組成物及びキット」

特願2021-053424「アミロイドβ蓄積リスクの有無の指標とする方法、一塩基多型(SNP)の存在又は非存在を検出する方法、組成物、及びキット」

2. 実用新案登録 なし

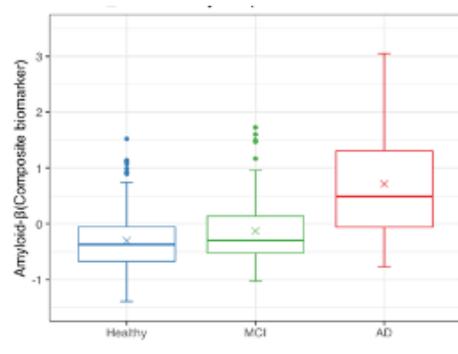


図1 アミロイドβ値3群間の比較

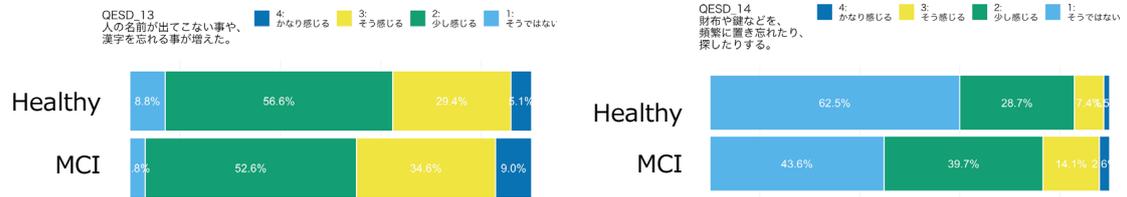
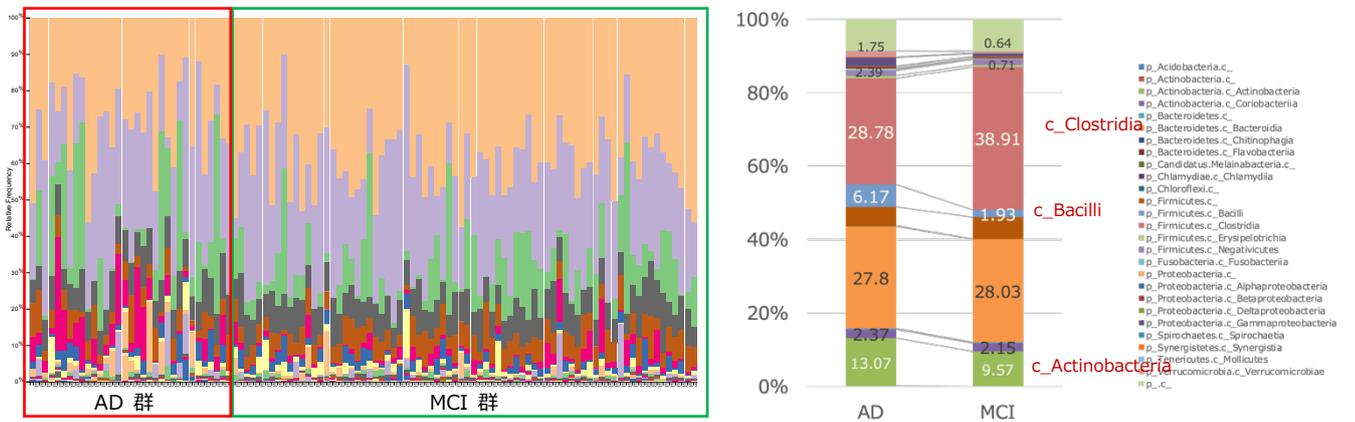


図2 認知機能検査 (QESD、60歳以上)



[A] 腸内菌叢系統分類解析 (個人、各 Class 頻度)
 [B] 腸内菌叢系統分類解析 (群間比較、各 Class 頻度平均)

A

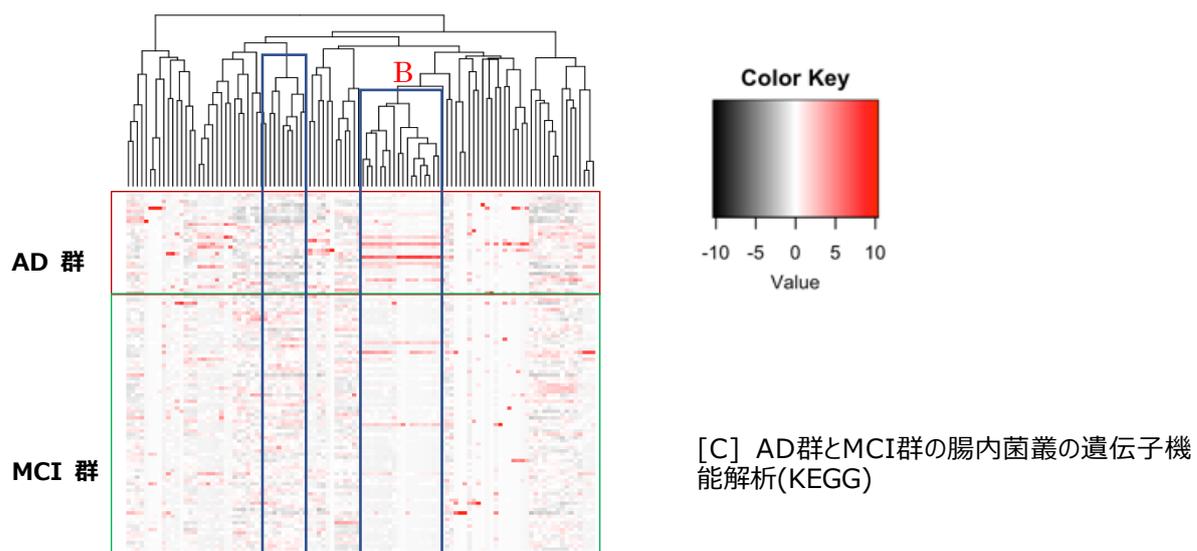


図3 階層的クラスタリング解析

別紙4

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

認知症に関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 大島登志男 早稲田大学・理工学術院・教授

研究要旨

本研究は認知症マイクロバイオーームを解析することで、高精度な認知症予測の微生物バイオマーカーの開発、認知症発症に関与する腸内微生物種とその産物等の特定、ならびに認知症発症の分子メカニズムの解明を目指す。本年度では、唾液微生物叢(300検体以上)の解析から認知症、MCI、非認知症を高精度で予測するモデルを機械学習法により構築した。また各種認知症モデルマウスの解析から、脳内Ab蓄積、行動異常、ニューロン新生などに強く相関する腸内微生物群を特定した。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)を主とする認知症は近年の超高齢化に伴って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。そこで本研究では、認知症に関与するヒト及びADモデルマウスの口腔あるいは腸内マイクロバイオーーム研究を推進し、高精度な認知症予測の微生物バイオマーカーの開発、認知症発症に関与する腸内微生物種とその産物等の特定、ならびに認知症発症の分子メカニズムの解明を目指す。

B. 研究方法

AD及び軽度認知障害(MCI)を含む認知症患者、並びに非認知症被験者(計300名以上)の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菌叢の16S rRNA遺伝子を取得した。またADモデル・ノトバイオームマウスの行動認知試験、脳内Ab蓄積、ニューロン新生能等のデータと腸内菌叢データを収集し、これらの相関解析から認知症に関与する微生物種の特定を行った。

(倫理面への配慮)

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、検体採取を行った。また、個人情報 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た。

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って行った。

C. 研究結果

・AD、AD以外の認知症、MCI、非認知症患者の唾液菌叢の解析から、健常群—認知症群間で α 多様性の有意な違いが観察された。また、健常群—認知症群間及びMCI群—認知症群間で β 多様性の有意な違いが観察された(図1)。さらに、門レベル、属レベル、種レベルにおいて、認知症あるいはMCIにおいて有意に増減する菌種を特定した。さらに、上記の菌叢データを元に機械学習ランダムフォレストを用いて高精度な認知症予測モデル(AUC>0.7)の構築に成功した(図2)。

・App<NL-G-F>ノックインマウス(ADモデルマウス)を用いて、各マウス個体における病態進行と腸内細菌叢との関連性を検討した結果、マウス個体における脳内Abの沈着量/沈着と腸内細菌叢の関連性の存在が示唆された。

・ADモデルマウスの無菌化に成功した。現在、その匹数を増やしており、今後、Ab沈着や行動異常の解析、同マウスのAD患者の糞便を定着させたノトバイオートモデルマウスの作製等を計画している。

・抗生物質投与をした通常飼育下のSPFマウスの脳の解剖解析と腸内細菌叢解析を行った。その結果、マウス個体ごとの海馬歯状回における新生ニューロンマーカー(Dcx)と関連する4種類の菌種を同定した(図3)。このことから、ニューロン新生に腸内細菌叢が影響を及ぼす可能性が示された。

・AD患者由来の糞便細菌叢をもつノトバイオートマウス(C57BL/6J)に異なった抗生剤処理を行い、その行動異常のレベルと腸内細菌叢の変動を時系列で解析した。その結果、行動異常を促進する菌がアンピシリン耐性—メタロニダゾール非耐性、行動異常を抑制する菌がアンピシリン非耐性—メタロニダゾール耐性であることが示唆された。

D. 考察

本年度の研究から、AD群とMCI群の唾液マイクロバイームは非認知症群との比較において統計有意に変容していることが示唆された。また、この変容に関与する微生物種も同定でき、さらに機械学習法による高精度な認知症予測モデルが構築できた。これらのデータは唾液マイクロバイームを用いた認知症診断のバイオマーカーの開発が期待される。さらに、唾液の採取は非侵襲的で簡便なため、様々な認知症進行の緩和手法の科学的な評価システムの開発につながる。

マウスを用いた解析からは、脳内Ab蓄積、ニューロン新生、行動・認知異常に関与する腸内菌種の存在が強く示唆された。この結果は、今後これら腸内細菌の認知症発症への作用機序の解明につながる。特に無菌化ADモ

デルマウスは世界初であり、本研究を遂行する強力な材料となる。

E. 結論

唾液マイクロバイオーームが認知症、MCI、非認知症を高精度に予測する新規マーカーとして有用であることが明らかとなった。マウス実験から、認知症の様々な表現型に腸内細菌が関与することが強く示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka R, Yamashiro K, Ogawa T, Oyama G, Nishioka K, Umemura A, Shimo Y, Hattori N. The absence of orthostatic heart rate increase is associated with cognitive impairment in Parkinson's disease. *PLoS One*. 2020 Oct 15;15(10):e0240491.
- 2) Yahara K, Suzuki M, Hirabayashi A, Suda W, Hattori M, Suzuki Y, Okazaki Y: Long-read metagenomics using PromethION uncovers oral bacteriophages and their interaction with host bacteria. *Nat Commun*. 2021 Jan 4;12(1):27.
- 3) Li W, Goshima Y, and Ohshima T. Loss of collapsin mediator response protein 4 attenuates 6-hydroxydopamine-induced impairments in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurochem Res* 45, 2286-2301.

2. 学会発表

- 1) 服部正平：ヘルスケア分野におけ

るヒト腸内菌叢研究の進展と利用。
食品開発展2020, 東京, 2020年11月17日.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特許出願「胆汁酸を生成するための組成物」PCT/JP2021/01434 (2021. 1. 18). 出願者 慶應義塾, JSR (株)、発明者 本田賢也、広瀬信義、新幸二、佐藤優子、成島聖子、新井康通、竹下 梢、笹島悟史

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

検体情報

| | 健常 (n=98) | MCI (n=46) | 認知症 (n=90) | AD (n=33) |
|---------|-----------|------------|------------|-----------|
| 年齢 | 72.5±0.93 | 76.3±1.09 | 78.1±0.79 | 86.1±1.11 |
| Males % | 27.6 | 60.9 | 40.0 | 24.2 |

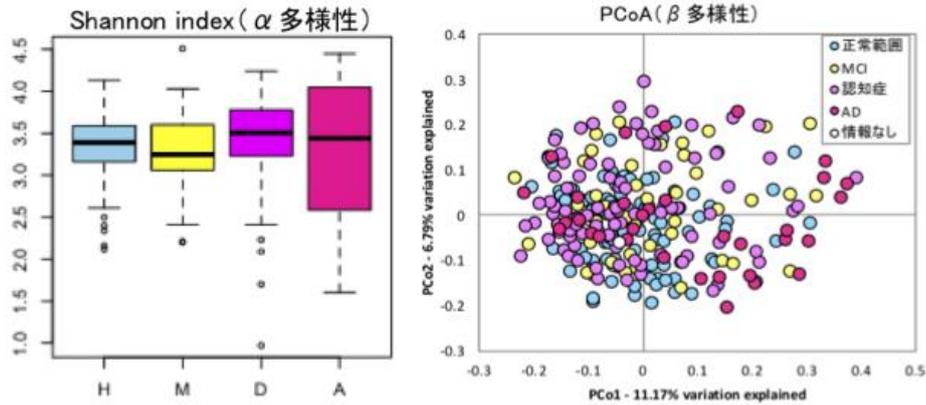


図1. 16Sデータに基づいた認知症患者を含む被験者群間の唾液細菌叢の比較

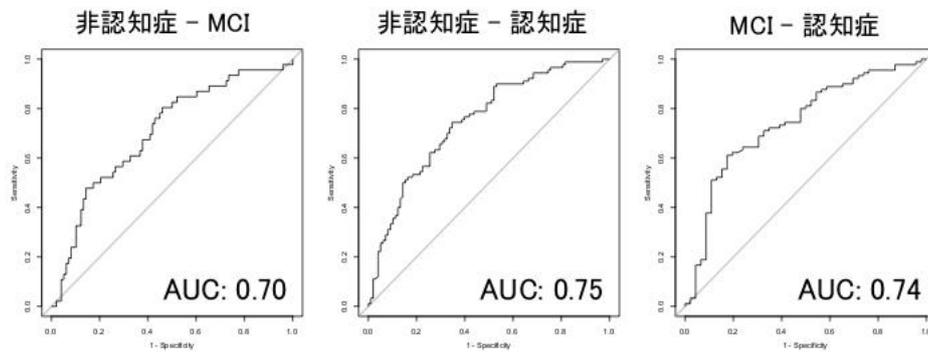


図2. 機械学習(random forest法)による認知症予測モデル(唾液菌・種レベル)のROC曲線

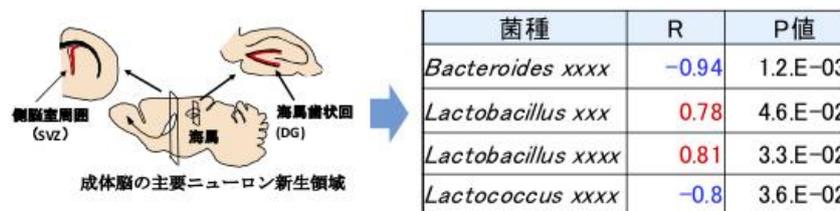


図3. マウス成体脳のニューロン新生能(DCXレベル)と相関する腸内細菌種

別紙5

研究成果の刊行に関する一覧表

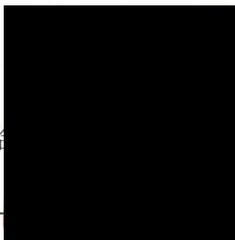
雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|----------------------|--------|-----------|------|
| 1) 西平順, 佐藤浩 二 | プレシジョン栄養学におけるゲノム情報の活用ー食・生活習慣と健康情報及び遺伝的背景の関係性解明 | 臨床栄養 | 137(3) | 311-319 | 2020 |
| 2) Tanaka R, Yamashiro K, Ogawa T, Oyama G, Nishioka K, Umemura A, Shimo Y, <u>Hattori N.</u> | The absence of orthostatic heart rate increase is associated with cognitive impairment in Parkinson's disease | <i>PLoS One.</i> | 15(10) | E0240491 | 2020 |
| 3) Yahara K, Suzuki M, Hirabayashi A, Suda W, <u>Hattori M.</u> , Suzuki Y, Okazaki Y | Long-read metagenomics using PromethION uncovers oral bacteriophages and their interaction with host bacteria | <i>Nat Commun.</i> | 12(1) | 27 | 2021 |
| 4) Li W, Goshima Y, and <u>Ohshima T.</u> | Loss of collapsin mediator response protein 4 attenuates 6-hydroxydopamine-induced impairments in a mouse model of Parkinson's disease. | <i>Neurochem Res</i> | 45 | 2286-2301 | 2021 |



厚生労働大臣
—(国立医薬品食品衛生研究所長)—殿
—(国立保健医療科学院長)—

機関名 国立研究開発法人
農業・食品産業技術総合研究機構
所属研究機関長 職名 理事長
氏名 久間 和生



次の職員の令和 2 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 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）
- 2. 研究課題名 認知症に關与するマイクロバイオーム・バイオマーカー解析
- 3. 研究者名 （所属部局・職名）食品研究部門・主席研究員
（氏名・フリガナ）山本万里（ヤマモトマリ）

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 | | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------|--------------------------|
| | 有 | 無 | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | 北海道情報大 | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3) | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | 北海道情報大、農研機構 | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:) |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和3年4月28日

厚生労働大臣
—(国立医薬品食品衛生研究所長)—殿
—(国立保健医療科学院長)—

機関名 学校法人電子開発学園北海道情報大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 西平 順

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相関については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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）
2. 研究課題名 認知症に関与するマイクロバイーム・バイオマーカー解析
3. 研究者名 （所属部局・職名）医療情報学部 教授
（氏名・フリガナ）西平 順 （ニシヒラ ジュン）

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 | | 左記で該当がある場合のみ記入（※1） | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------|--------------------------|
| | 有 | 無 | 審査済み | 審査した機関 | 未審査（※2） |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | 北海道情報大学 | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3） | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | 北海道情報大学 | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称： ） | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （無の場合はその理由：北海道情報大学生命倫理委員会規定に準ずる） |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関：生命倫理委員会にて審査） |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由：） |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （有の場合はその内容：） |

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和3年4月30日

厚生労働大臣 殿

機関名 早稲田大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 田中 愛治

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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）

2. 研究課題名 認知症に關与するマイクロバイオーム・バイオマーカー解析

3. 研究者名 （所属部局・職名）早稲田大学 理工学術院・教授

（氏名・フリガナ）大島 登志男・オオシマ トシオ

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 | | 左記で該当がある場合のみ記入（※1） | | |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|
| | 有 | 無 | 審査済み | 審査した機関 | 未審査（※2） |
| ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3） | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称：) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由：) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関：) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由：) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （有の場合はその内容：) |

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。