

別紙 1

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オーム・バイオマーカー解析

令和3年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山本 万里

令和4(2021)年 5月

別紙2

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) -----6
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 -----14

別紙 1

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3年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山本 万里

令和4(2021)年 5月

別紙2

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) -----6
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 -----14

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・エグゼクティブリサーチャー

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、健常者に加え、新たに軽度認知障害と認知症患者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蓄積量(CM値)は、認知症患者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、年齢の比較的若い世代では、CM値の上昇と生活習慣病リスクの上昇に正の関係のあり、50歳以上では50歳未満とは異なり、食事習慣(内容)がCM値に大きく影響していた。このため、食事内容の改善により、CM値の抑制の効果が期待される。さらに、健常者群と認知症患者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(分担研究)。また、機械学習を用いて唾液菌叢による認知症・MCI・非認知症を高精度に識別する予測モデルを構築した。App<NL-G-F>ノックインマウスの腸内細菌叢とAb沈着の関係には性差による違いがあることを見出した。56名の百寿者の腸内細菌叢解析と特徴的な細菌種を同定し(Nature, 2021に掲載)、腸内細菌叢の存在は脳内のタウリン酸化を抑制することが示唆された。海馬歯状回における新生ニューロンマーカー(Dcx)と負に相関する3種類の菌種を同定し、その分離菌株の無菌マウスへの移植によりDcxが有意に減少することを実証した。種々の抗生剤処理したノトバイオトマウスの行動・物体認知試験による認知症と関連する菌群の絞り込みを行い、場所・認知機能に有意に関与する9菌種を特定した(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・学長)

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 (neuro filament 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) の血清中のアミロイドβ蓄積量等を解析し、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20歳から70歳台の未病を含む健康な被験者587名 (20歳台: 21名、30歳台: 73名、40歳台: 139名、50歳台: 170名、60歳台: 145名、70歳台: 39名、男性172名、女性415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-TOFMS) 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リングした後、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。

睡眠状態は、PGV社睡眠脳波計を使って計測し、血液成分分析、血圧計測は常法によって実施した。食事摂取状態は食事摂取頻度調査 (FFQ) により算出した。認知機能はMinicogテストを実施した。

血液成分値、血圧、睡眠状態は、年齢、性別ごとにRobustZ scoreで標準化した (数値が3以上は3に、-3以下は-3にする)。

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

CM値は、加齢により増加していくが、50歳以上になると個人差が多く見られるようになり、加齢だけではない要因が存在する可能性がある (図1)。そのため、それぞれの解析は、50歳未満と50歳以上にわけて実施した。

血圧、血液成分とCM値の関係を解析したところ、50歳未満で、CM値が高めだと、CM値が低めの被験者に比べて、収縮期血圧、アルカリフォスファターゼ、血糖値、尿酸値が有意に高く、HDLコレステロールは有意に低かった (図2)。50歳以上では明確な差異は認められなかった。

摂取栄養とCM値の関係を解析したところ、50歳以上で、CM値が高めだと、CM値が低めの被験者に比べ、エネルギー摂取、コレステロール摂取効率、短鎖・中鎖脂肪酸摂取効率が有意に少なく、タンニン摂取効率が有意に高かった (図3)。50歳未満では明確な差異は認められなかった。

認知機能テストMinicogとCM値の関係のうち、近時記憶のスコアとCM値、時計描写とCMとの関係をU検定にて解析したところ、50歳未満では、近時記憶の点の低下によりCM値が高くなり、50歳以上では、時計描写テストの点数の低下によりCM値が高くなることが明らかになった (図4)。

(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

アミロイドβの脳内への蓄積程度を示すCM値との関係を、食事、運動、睡眠、ストレス、運動、腸内細菌叢等と比較した。

CM値は年代により異なる関係が見られ、50歳未満でCM値が高めの方は、

- 1 臨床検査値（血圧、肝機能腎機能、脂質など）が高め
- 2 睡眠時間が短め
- 3 腸内細菌の多様性が低い、
さらに
近時記憶のスコアが低い人はCM値高い。

50歳以上でCM値が高い人は

- 1 コレステロールや短鎖、中鎖脂肪酸の接種効率が悪い。
（エネルギー摂取量も低いため、全体的な摂取量が少ない）
- 2 睡眠時間が長め
さらに
時計描写のスコアが低い人はCM値が高いことがわかった。

以上の結果から
CM値への外的要因の影響は、年齢により異なる可能性があり、年齢の比較的若い世代では、CM値の上昇と生活習慣病リスクの上昇に正の関係のあることがみとめられた。そのため、食事習慣を含む生活習慣の改善による生活習慣病リスクの低減は、CM値の抑制にも効果が期待される。一方、50歳以上では50歳未満とは異なり、食事習慣（内容）がCM値に大きく影響していた。このため、食事内容の改善により、CM値の抑制の効果が期待される。

E. 結論

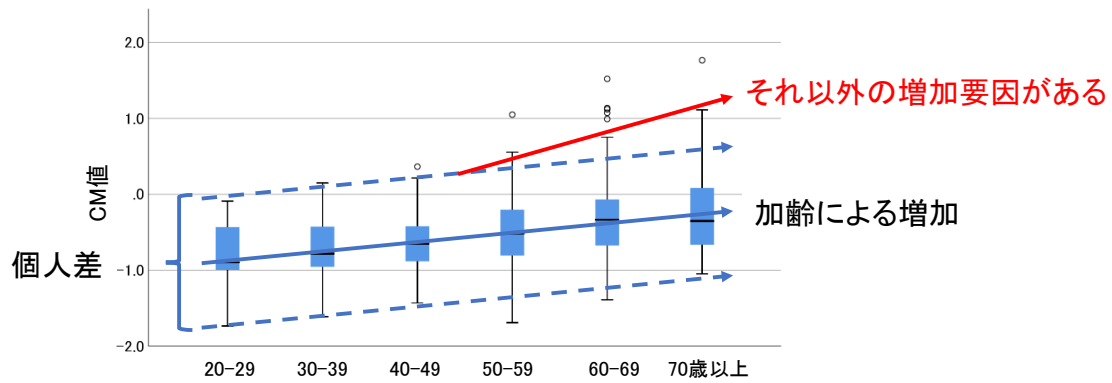
アミロイドβ蓄積量を増加させるリスクの高い血液成分、食生活、睡眠状態などの情報は、個別化健康指導や栄養指導などの実現を示唆するとともに、ヘルスケア分野の市場拡大による経済効果が期待できると考えられる。

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

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 なし
2. 実用新案登録 なし



個人差に関連する要因が、50歳以上では50歳未満とは異っている。
そのため50歳以上は分散が大きく変化する。

図1. アミロイドβ蓄積の加齢による変動

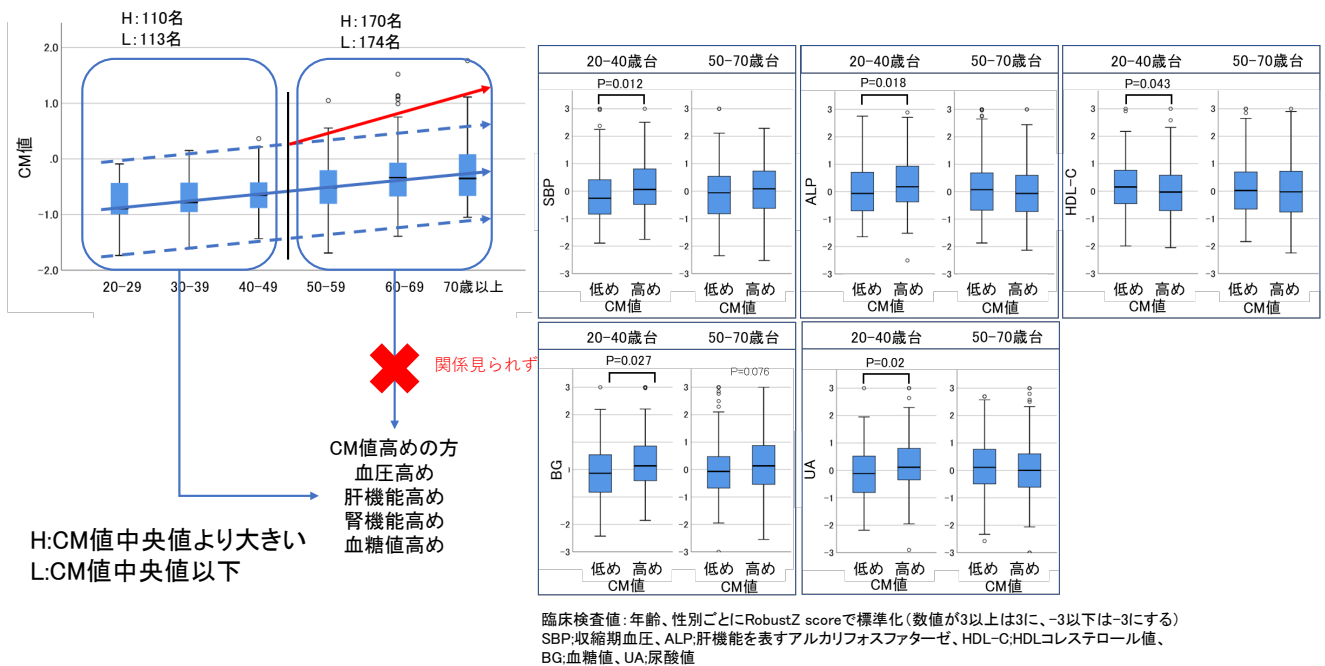


図2. 摂取栄養とCM値の関係

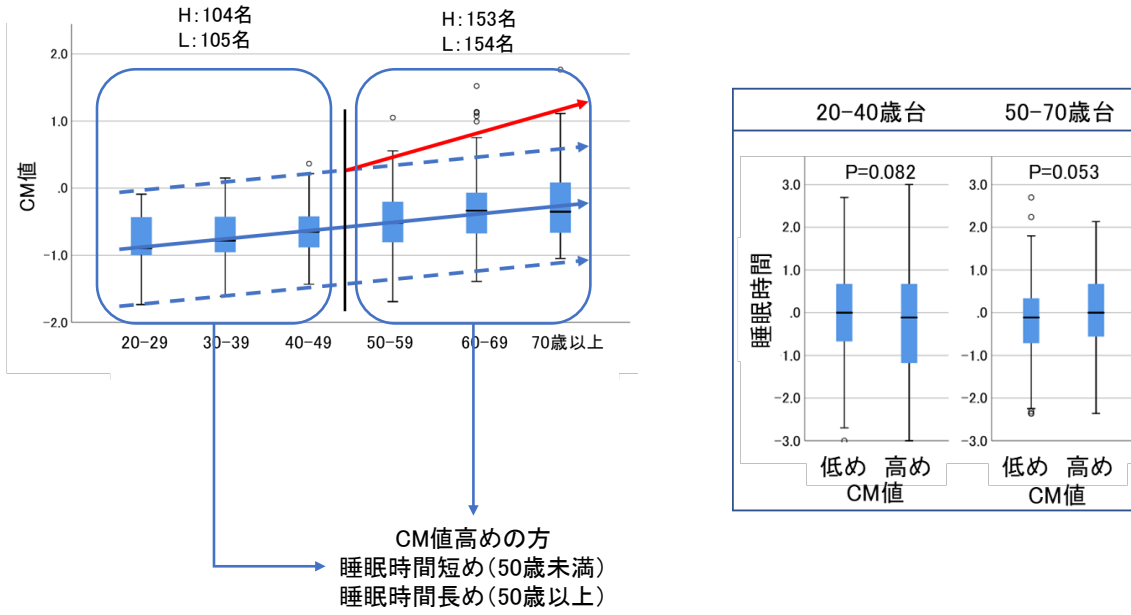


図3. 睡眠時間とCM値の関係

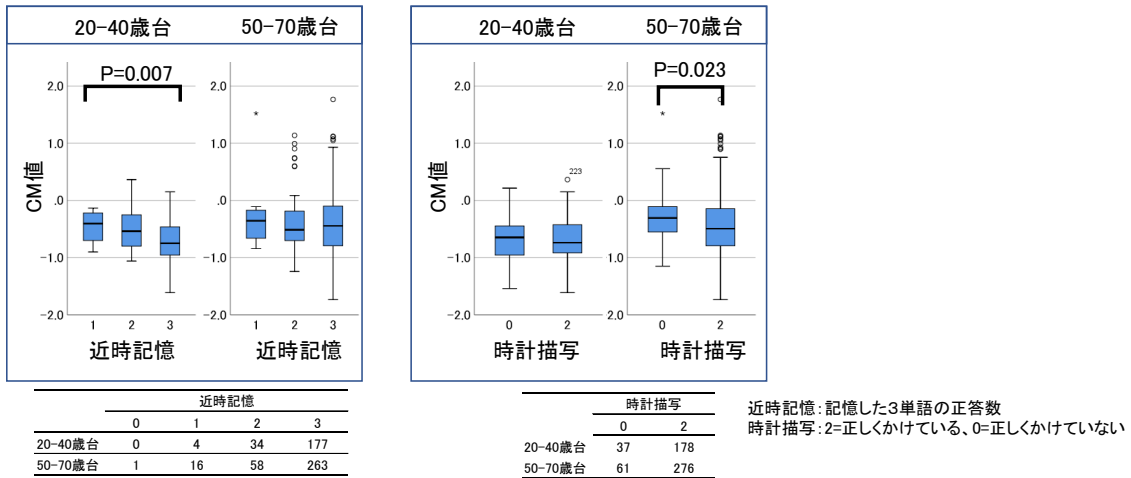


図4. 認知機能テスト Minicog とCM値の関係

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))

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
(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 学長

研究要旨

本年度は、健常人に加え、新たに軽度認知障害と認知症患者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、認知症患者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、健常人群と認知症患者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、未病者を含む健常者と軽度認知障害、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歳までの健康な被験者 (以下、Healthy群) 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、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、HNMH群)。

2. 測定項目

参加した被験者から採血を行い、生化学項目 (亜鉛、アラキドン酸など) の他、血中アミロイドβ (以下、Abeta) の測定に使用した。Abetaの測定は、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。

糞便メタゲノム解析は、Healthy群の中から60歳以上 (以下、ActiveSenior群)、MCI群とHNMH群の3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解析は、Healthy群 (65歳以上)・MCI群・HNMH群の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。

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、血中アミロイドβ (Composite Biomarker 値) のグラフを示した。HNMH群については、病態別に小グループを付与し、比較を行った。3群の比較では、HNMH>MCI>Healthyの順に、Abetaの蓄積が見られた。またHNMH群内の病態別6グループの比較

は、AD群（アルツハイマー群）のAbetaの平均値±SEは、 1.28 ± 0.23 とHNMH群内で最も高く、またPDAD群（パーキンソン病とアルツハイマー病の併発群）が、PD群（パーキンソン病単独群）より有意に高値であった。

次にActiveSenior群、MCI群、HNMH群から糞便を採取しDNA抽出を行い、糞便メタゲノム解析を行った。図2に腸内菌叢の系統分類結果を示した。HNMH群の病態別グループ比較では、ActiveSenior群と比較し、特にPDAD群（パーキンソン病とアルツハイマー病の併発群）とDLB群（レビー小体型認知症群）において、腸内菌叢の組成に違いが見られた。PDAD群は、class Verrucomicrobiae、class Gammaproteobacteria、class Bacilliの増加、class Clostridiaの減少が見られ、DLB群は、class Actinobacteria、class Coriobacteriiaの増加が見られた。

最後に認知症と関連のあるメチル化サイトの探索のため、「MCI群」と「HNMH群」に加え、Healthy被験者のうち65歳以上を使用し、「Active Senior群」とし、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73万メチル化サイトを解析に使用した。群間比較において特に、有意差 ($p < 0.01$) かつlogFC値±0.1以上のサイトを抽出した。Active Senior群とHNMH群の比較では、Active Senior群>HNMH群は、2872サイト。HNMH群>Active Senior群は、6サイト。Active Senior群とMCI群の比較では、Active Senior群>MCI群は、50サイト、MCI群>Active Senior群は、7サイトであった。また、HNMH群とMCI群の比較では、HNMH群>MCI群は、0サイト、MCI群>HNMH群は、5144サイト見られた（図3）。データは示していないが有意差を示したサイト数が多いActive Senior群>HNMH群とMCI群>HNMH群の両比較において、染色体上の領域別の頻度を比較したところ、転写領域（TSS200, TSS1500）は、有意差が見られたサイト全体の約15%程度、特に多かったのはBodyの約50%であった。図4に、Active Senior群と病者（MCI群とHNMH群）の有意差の見られたサイトの共通性を確認したところ、Active Senior群がMCI群とHNMH群に対しβ値が高値であったメチル化サイトは、合計35サイトであった。その他、2837サイトがHNMH群のみ、15サイトがMCI群のみであった。次に、有意差が見られたCpGサイトと今回測定した生化学項目との相関を調べたところ、認知症研究の重要マーカーであるアミロイドβ値と緩やかな相関が見られたサイトが検出された（図5）。

（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（HNMH群）の3群間比較の結果、HNMH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、HNMH群の病態別の群比較では、AD群が最も高いAbeta値を示し、PDAD群（パーキンソン病とアルツハイマー病の併発群）が、PD群（パーキンソン病単独群）より有意に高値であった。以上より血中のAbetaの蓄積がアルツハイマー病と関連がある事が示された。

糞便メタゲノム解析は、図2に示したHNMH群の病態別グループ比較では、ActiveSenior群と比較し、特にPDAD群（パーキンソン病とアルツハイマー病の併発群）とDLB群（レビー小体型認知症群）において、腸内菌叢の分布に特異的な組成が見られた。また、今回の結果から、PDAD群は、ADのみ、もしくはPDのみ発症者と異なる菌叢である事が示された。これは、PDADなどの病種が併発している被験者のデータが取得できたことにより、単独の症例の患者と併発症例の患者との比較が可能となり、またさらに上記の菌叢解析を進めることで、併発症例の要因の探索にも有効であると考えられた。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る。

次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65歳以上（Active Senior群）・軽度認知障害（MCI群）・認知症患者（HNMH群）の3群を用いて、エピゲノム解析では、特にActive Senior群と比較し病者（HNMH群、MCI群）で脱メチル化が進んでいるものが多く見られた。病者と健康な被験者65歳以上の比較において、特に有意差があったものの中には、詳細は示していないがHOOK遺伝子、BAZ1A遺伝子などアルツ

ハイマーに関連する遺伝子。そのほか、年齢に関連する遺伝子の転写領域にもメチル化に有意差が見られた。また特にアミロイドβと相関のあるサイトには、早老に関連すると報告がある遺伝子の転写に関わるサイトとの関係が確認できた(図5)。今回統計的に選び出したサイトが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。さらには、先に特許申請(特願2021-053424)にて報告した個々の遺伝子背景(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 なし

H. 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

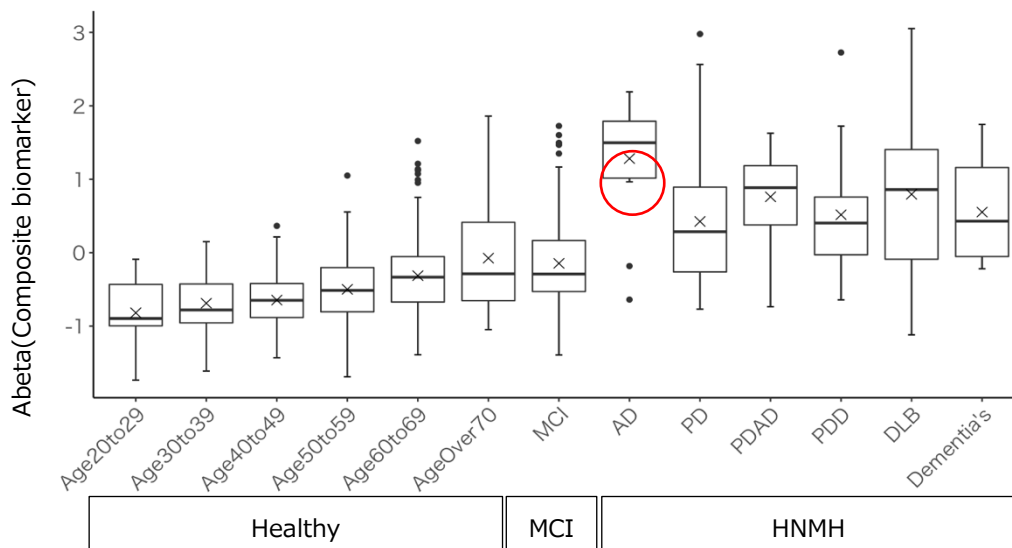


図1. アミロイドβ値 (Composite biomarker) の比較
 Healthy: 健常人、MCI: 軽度認知障害、HNMH: 認知症患者

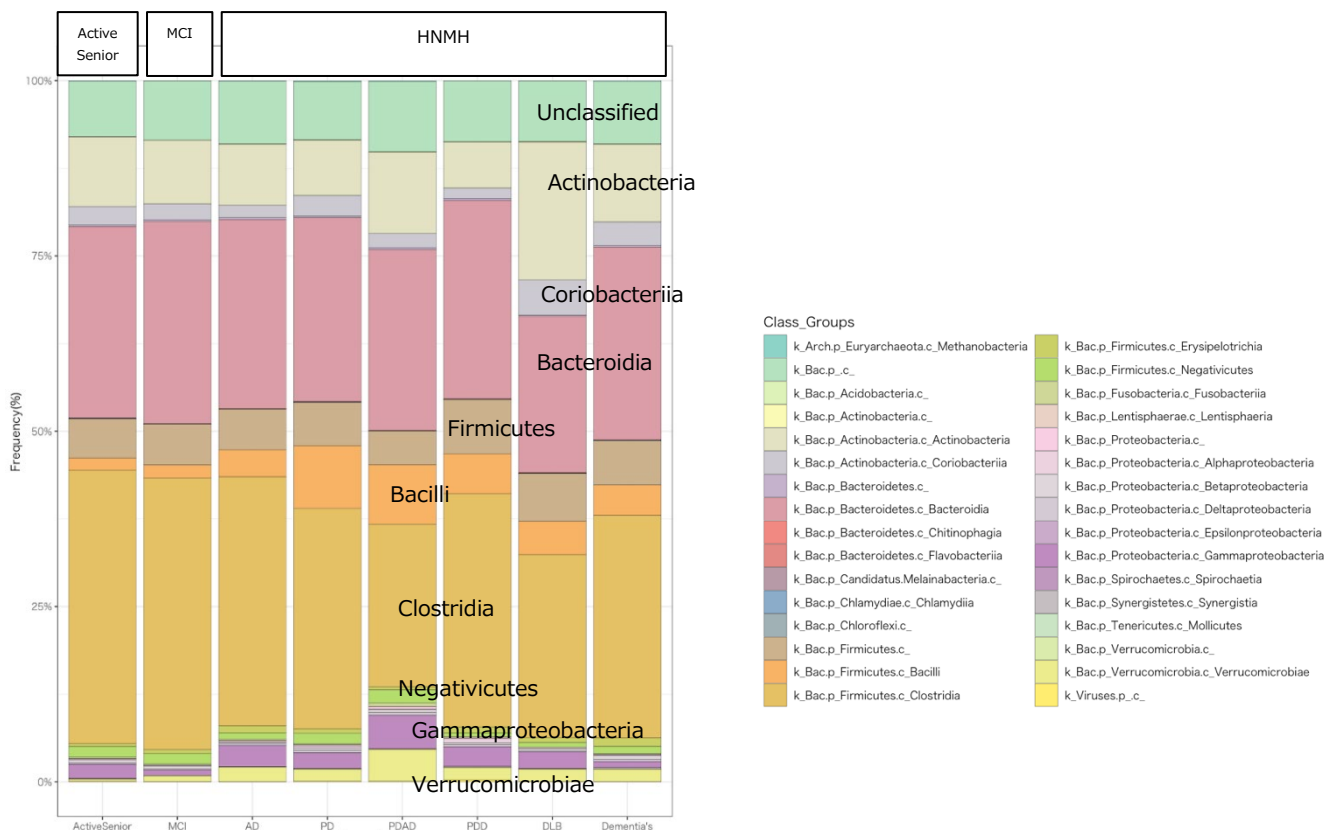


図2. 腸内菌叢 (Class) の比較

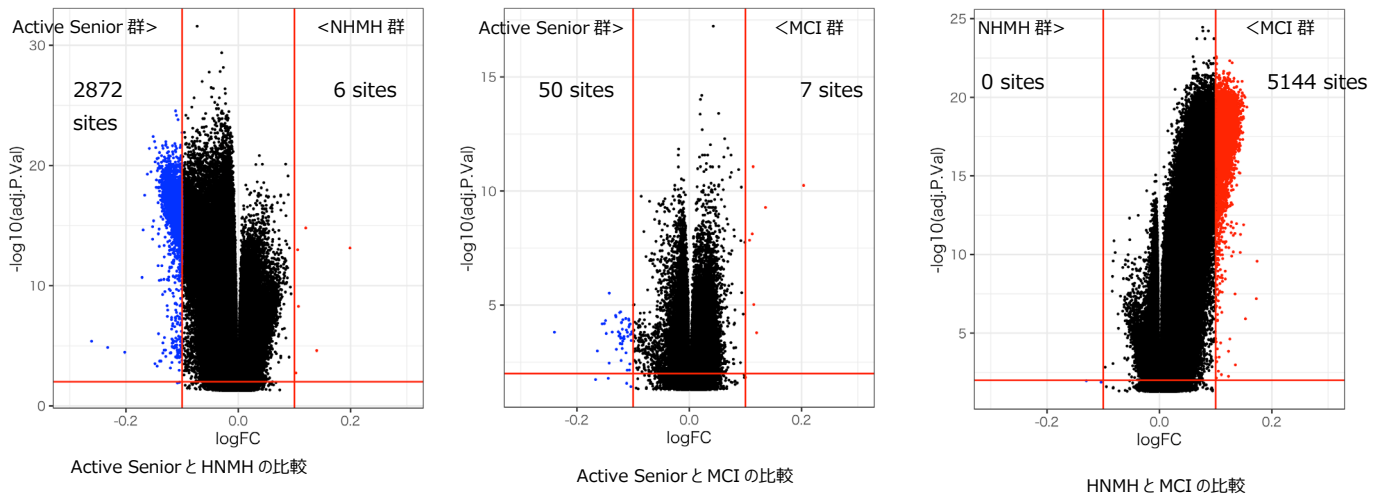


図 3. メチル化群間差

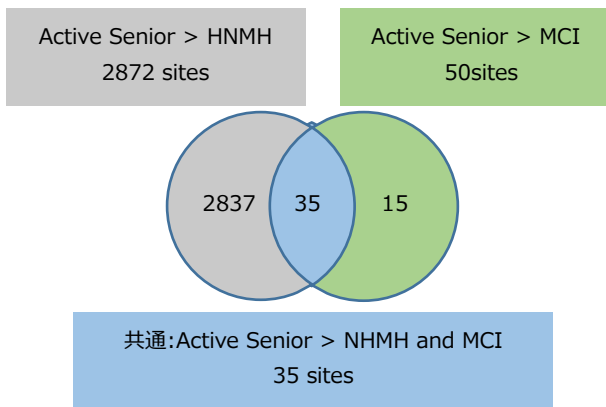


図 4. 群間比較 (共通サイトの確認)

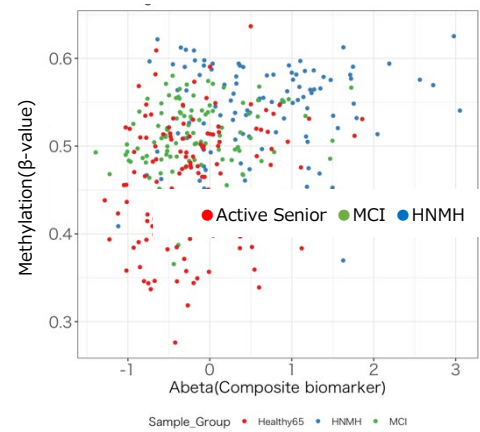


図 5. Abeta とメチル化サイトの関係

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

研究課題名：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)

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・ノトバイオト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、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、また門レベル、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。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認知症・MCI・非認知症を高精度に識別するロバストな認知症予測モデル (AUC 0.65~0.75) の開発に成功した。さらに、被験者の口腔所見 (因子) も加えた機械学習から、3群をより高精度に識別する認知症予測モデル (AUC 0.86~0.91) の開発にも成功した (図1)。

・App<NL-G-F>ノックインマウス (ADモデルマウス) を用いた脳内A β 蓄積と腸内細菌叢との関連性解

析では、腸内細菌叢とAb沈着と関連性が性差によって異なることを見出した。

・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、AD患者の糞便を定着させたノトバイオームマウスの作製等を計画している。

・通常の無菌マウスではその脳内タウタンパク質のリン酸化が通常マウスよりも増加しており、腸内細菌叢はタウリン酸化を抑制することが示唆された(図2)。

・昨年度に同定した新生ニューロンマーカー(Dcx)と負に相関する3種類の菌種を定着させたノトバイオームマウスにおいてDcxの有意な減少を観察した。これらの結果から、ニューロン新生への腸内細菌叢の関与が強く示唆された(図3)。

・AD患者由来の糞便細菌叢をもつノトバイオームマウスの場所認知機能に有意に相関する9 OTUs(8 OTUsは行動異常に負に相関)を特定し、現在その培養分離を進めている。

D. 考察

本年度の研究から、機械学習法を用いて高精度な認知症予測モデルを開発できた。これらのデータは唾液マイクロバイオ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と期待される。

E. 結論

唾液マイクロバイオームが認知症、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) Sato K, Watamura N, Fujioka R, Mihira N, Sekiguchi M, Nagata K, Ohshima T, Takashi Saito, Saido TC, Sasaguri H: A 3rd generation mouse model of

Alzheimer's disease shows early and increased cored plaque pathology composed of wild-type human amyloid β peptide. JBC 297,101004, 2021.

2) Takamura R, Mizuta K, Sekine Y, Islam T, Takashi Saito T, Sato M, Ohkura M, Nakai J, Ohshima T, Saido CT, Hayashi Y: Modality specific impairment of hippocampal CA1 neurons of Alzheimer's disease model mice. J Neurosci 41: 5315-5329, 2021

3) Sasaguri H, Hashimoto S, Watamura N, Sato, K Takamura R, Nagata K, Tsubuki S, Ohshima T, Yoshiki, A, Kitazume, Per Nilsson S, Winblad B, Saito T, Iwata N, Saido TC: Latest advances in modeling Alzheimer's disease. Frontiers in Neuroscience 807473, 2022.

4) Sato Y, Atarashi K, Plichta DR, Arai Y, Sasajima S, Kearney SM, Suda W, Takeshita K, Sasaki T, Okamoto S, Skelly AN, Okamura Y, Vlamakis H, Li Y, Tanoue T, Takei H, Nittono H, Narushima S, Irie J, Itoh H, Moriya K, Sugiura Y, Suematsu M, Moritoki N, Shibata S, Littman DR, Fischbach MA, Uwamino Y, Inoue T, Honda A, Hattori M, Murai T, Xavier RJ, Hirose N, Honda K: Novel bile acid biosynthetic pathways are enriched in the microbiome of centenarians. Nature 2021 599: 458-464.

5) Kikusui T: Aims of the special issue of "Neuro-Molecular Understanding for the Gut-Brain Axis". Neurosci Res. 2021 Jul;168:1-2.

6) Suzuki H, Furuya J, Hidaka R, Miyajima S, Matsubara C, Ohwada G, Asada T, Akazawa C, Sato Y, Tohara H, Minakuchi S: Patients with mild cognitive impairment diagnosed at dementia clinic display decreased maximum occlusal force: a cross-sectional study. BMC Oral Health. 2021 Dec 27;21(1):665.

2. 学会発表

1) 服部正平: 第27回日本ヘリコバクター学会ヒトマイクロバイオームのメタゲノミクス 2021年9月25日.

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

検体情報(2021年11月)

	非認知症(n=120)	MCI (n=109)	認知症 (n=163)
年齢	72.9±9.0	75.7±7.3	78.9±7.6
Male %	35.0	52.3	44.2

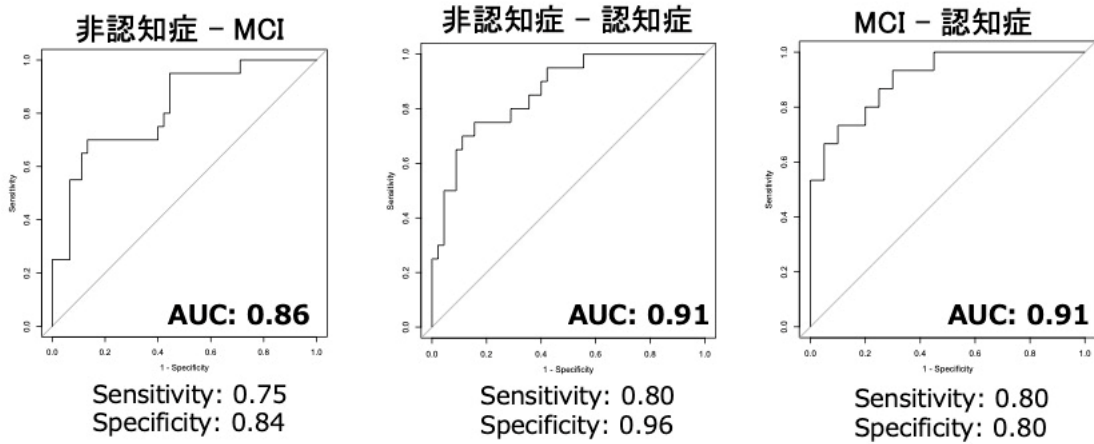


図1. 唾液菌叢・口腔データを用いたAUC-RFによる認知症予測モデルの開発

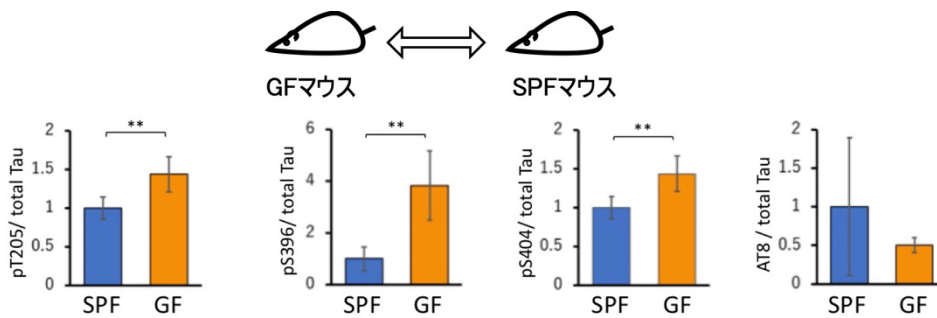


図2. 無菌(GF)及びSPFマウス脳内のタウリン酸化

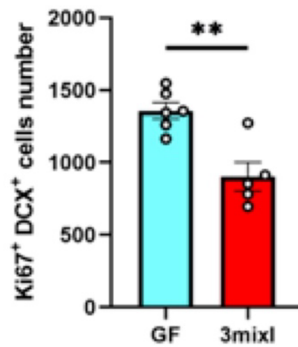


図3. 腸内菌によるニューロン新生の抑制

DCXに負に相関する3つの菌株mixを定着させたノトバイオームマウスにおけるDCX+細胞の減少

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
Sato K, Watamura N, Fujioka R, Mihi ra N, Sekiguchi M, Nagata K, <u>Ohs hima T</u> , Takashi S aito, Saido TC, Sa saguri H	A 3rd generation mouse model of Alzheimer's disease shows early and increased cored plaque pathology composed of wild-type human amyloid β peptide	JBC	297	101004	2021
Takamura R, Mizuta K, Sekine Y, Islam T, Takashi Saito T, Sato M, Ohkura M, Nakai J, <u>O hshima T</u> , Saido C T, Hayashi Y	Modality specific impairment of hippocampal CA1 neurons of Alzheimer's disease model mice	J Neurosci	41	5315-5329	2021
Sasaguri H, Hashimoto S, Watamura N, Sato, K Takamura R, Nagata K, Tsubuki S, <u>Ohs hima T</u> , Yoshiki, A, Kitazume, Per Nilsson S, Winblad B, Saito T, Iwata N, Saido TC	Latest advances in modeling Alzheimer's disease	Frontiers in Neuroscience	16	807473	2022
Sato Y, Atarashi K, Plichta DR, Arai Y, Sasajima S, Kearney SM, <u>Suda W</u> , Takeshita K, Sasaki T, Okamoto S, Skelly AN, Okamura Y, Vlami kis H, Li Y, Tano ue T, Takei H, Nittono H, Narushima S, Irie J, Itoh H, Moriya K, Sugiura Y, Suematsu M, Moritoki N, Shibata S, Littman DR, Fischbach MA, Uwamino Y, Inoue T, Honda A, <u>Hattori M</u> , Mura i T, Xavier RJ, Hirose N, <u>Honda K</u>	Novel bile acid biosynthetic pathways are enriched in the microbiome of centenarians	Nature	599	458-464	2021

<u>Kikusui T</u>	Aims of the special issue of "Neuro-Molecular Understanding for the Gut-Brain Axis"	Neurosci Res	168	1-2	2021
Suzuki H, Furuya J, Hidaka R, Miyajima S, Matsubara C, Ohwada G, Asada T, <u>Akazawa C</u> , Sato Y, Tohara H, Minakuchi S	Patients with mild cognitive impairment diagnosed at dementia clinic display decreased maximum occlusal force: a cross-sectional study	BMC Oral Health	21	665	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・エグゼクティブリサーチャー
(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	<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) 未審査に場合は、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4年5月10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）北海道情報大学・学長
（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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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	■ □	■	北海道情報大	□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□ ■	□		□
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	■ □	■	北海道情報大	□
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	□ ■	□		□
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:)	□ ■	□		□

(※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) 未審査に場合は、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 ■ 未受講 □
-------------	------------

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 ■ 無 □ (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 ■ 無 □ (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 ■ 無 □ (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 □ 無 ■ (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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式

令和4年5月10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 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 (所属部署・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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	早稲田大学、順天堂大学、 理化学研究所、麻布大学、 慶應義塾大学	<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 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。

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))

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
(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 学長

研究要旨

本年度は、健常人に加え、新たに軽度認知障害と認知症患者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、認知症患者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、健常人群と認知症患者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、未病者を含む健常者と軽度認知障害、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歳までの健康な被験者(以下、Healthy群)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、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、HNMH群)。

2. 測定項目

参加した被験者から採血を行い、生化学項目(亜鉛、アラキドン酸など)の他、血中アミロイドβ(以下、Abeta)の測定に使用した。Abetaの測定は、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。

糞便メタゲノム解析は、Healthy群の中から60歳以上(以下、ActiveSenior群)、MCI群とHNMH群の3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解析は、Healthy群(65歳以上)・MCI群・HNMH群の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。

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、血中アミロイドβ(Composite Biomarker値)のグラフを示した。HNMH群については、病態別に小グループを付与し、比較を行った。3群の比較では、HNMH>MCI>Healthyの順に、Abetaの蓄積が見られた。またHNMH群内の病態別6グループの比較

は、AD群（アルツハイマー群）のAbetaの平均値±SEは、 1.28 ± 0.23 とHNMH群内で最も高く、またPDAD群（パーキンソン病とアルツハイマー病の併発群）が、PD群（パーキンソン病単独群）より有意に高値であった。

次にActiveSenior群、MCI群、HNMH群から糞便を採取しDNA抽出を行い、糞便メタゲノム解析を行った。図2に腸内菌叢の系統分類結果を示した。HNMH群の病態別グループ比較では、ActiveSenior群と比較し、特にPDAD群（パーキンソン病とアルツハイマー病の併発群）とDLB群（レビー小体型認知症群）において、腸内菌叢の組成に違いが見られた。PDAD群は、class Verrucomicrobiae、class Gammaproteobacteria、class Bacilliの増加、class Clostridiaの減少が見られ、DLB群は、class Actinobacteria、class Coriobacteriiaの増加が見られた。

最後に認知症と関連のあるメチル化サイトの探索のため、「MCI群」と「HNMH群」に加え、Healthy被験者のうち65歳以上を使用し、「Active Senior群」とし、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73万メチル化サイトを解析に使用した。群間比較において特に、有意差 ($p < 0.01$) かつlogFC値±0.1以上のサイトを抽出した。Active Senior群とHNMH群の比較では、Active Senior群>HNMH群は、2872サイト。HNMH群>Active Senior群は、6サイト。Active Senior群とMCI群の比較では、Active Senior群>MCI群は、50サイト、MCI群>Active Senior群は、7サイトであった。また、HNMH群とMCI群の比較では、HNMH群>MCI群は、0サイト、MCI群>HNMH群は、5144サイト見られた（図3）。データは示していないが有意差を示したサイト数が多いActive Senior群>HNMH群とMCI群>HNMH群の両比較において、染色体上の領域別の頻度を比較したところ、転写領域（TSS200, TSS1500）は、有意差が見られたサイト全体の約15%程度、特に多かったのはBodyの約50%であった。図4に、Active Senior群と病者（MCI群とHNMH群）の有意差の見られたサイトの共通性を確認したところ、Active Senior群がMCI群とHNMH群に対しβ値が高値であったメチル化サイトは、合計35サイトであった。その他、2837サイトがHNMH群のみ、15サイトがMCI群のみであった。次に、有意差が見られたCpGサイトと今回測定した生化学項目との相関を調べたところ、認知症研究の重要マーカーであるアミロイドβ値と緩やかな相関が見られたサイトが検出された（図5）。

（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（HNMH群）の3群間比較の結果、HNMH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、HNMH群の病態別の群比較では、AD群が最も高いAbeta値を示し、PDAD群（パーキンソン病とアルツハイマー病の併発群）が、PD群（パーキンソン病単独群）より有意に高値であった。以上より血中のAbetaの蓄積がアルツハイマー病と関連がある事が示された。

糞便メタゲノム解析は、図2に示したHNMH群の病態別グループ比較では、ActiveSenior群と比較し、特にPDAD群（パーキンソン病とアルツハイマー病の併発群）とDLB群（レビー小体型認知症群）において、腸内菌叢の分布に特異的な組成が見られた。また、今回の結果から、PDAD群は、ADのみ、もしくはPDのみ発症者と異なる菌叢である事が示された。これは、PDADなどの病種が併発している被験者のデータが取得できたことにより、単独の症例の患者と併発症例の患者との比較が可能となり、またさらに上記の菌叢解析を進めることで、併発症例の要因の探索にも有効であると考えられた。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る。

次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65歳以上（Active Senior群）・軽度認知障害（MCI群）・認知症患者（HNMH群）の3群を用いて、エピゲノム解析では、特にActive Senior群と比較し病者（HNMH群、MCI群）で脱メチル化が進んでいるものが多く見られた。病者と健康な被験者65歳以上の比較において、特に有意差があったものの中には、詳細は示していないがHOOK遺伝子、BAZ1A遺伝子などアルツ

ハイマーに関連する遺伝子。そのほか、年齢に関連する遺伝子の転写領域にもメチル化に有意差が見られた。また特にアミロイドβと相関のあるサイトには、早老に関連すると報告がある遺伝子の転写に関わるサイトとの関係が確認できた(図5)。今回統計的に選び出したサイトが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。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 なし

H. 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

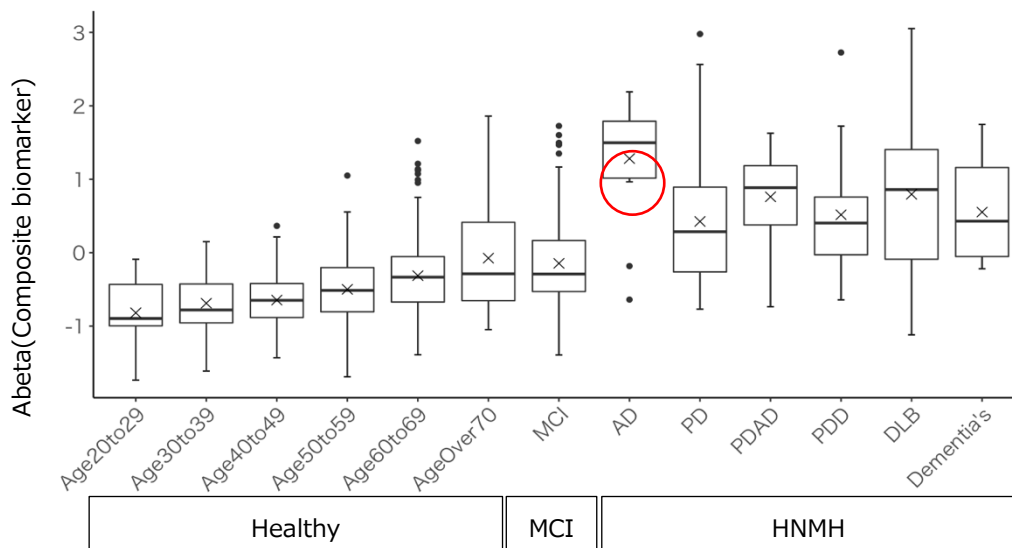


図1. アミロイドβ値 (Composite biomarker) の比較
 Healthy: 健常人、MCI: 軽度認知障害、HNMH: 認知症患者

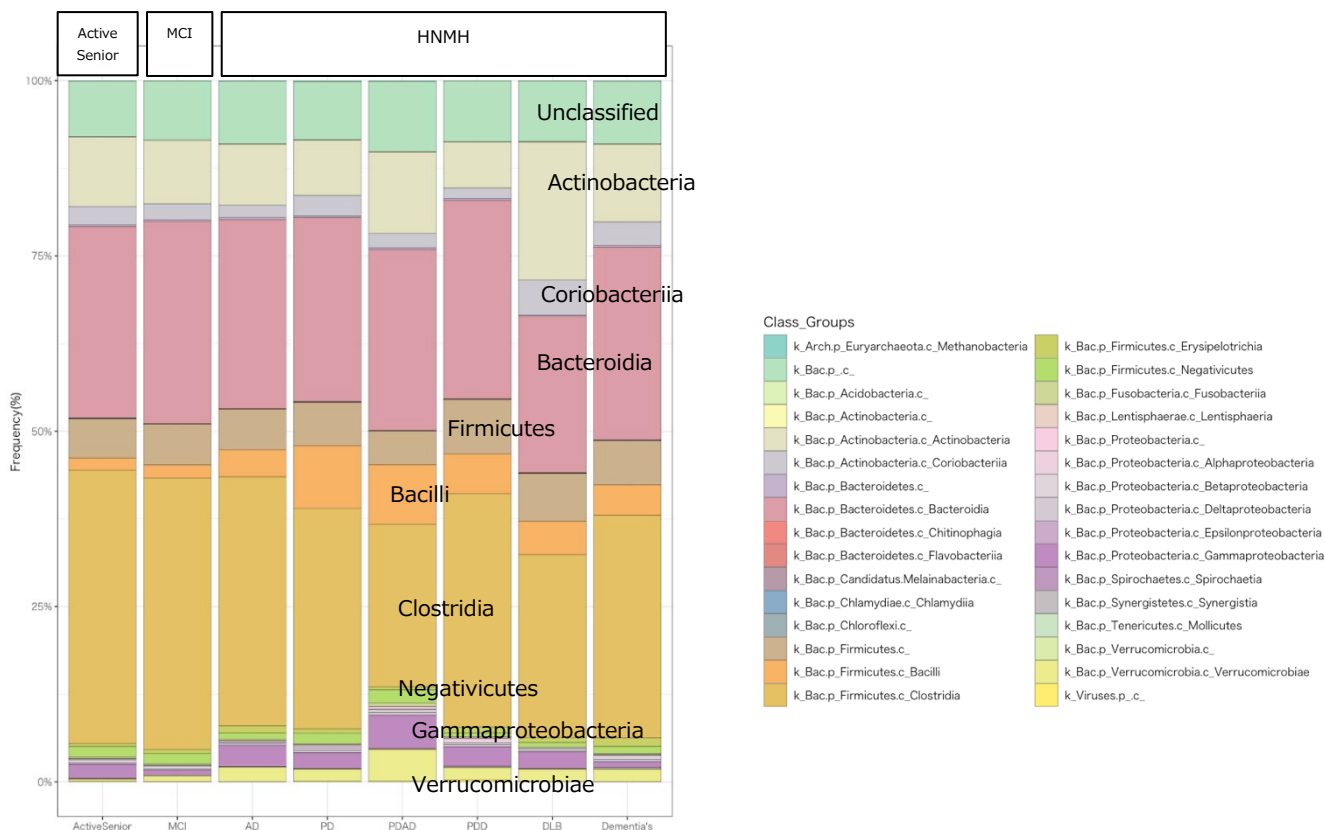


図2. 腸内菌叢 (Class) の比較

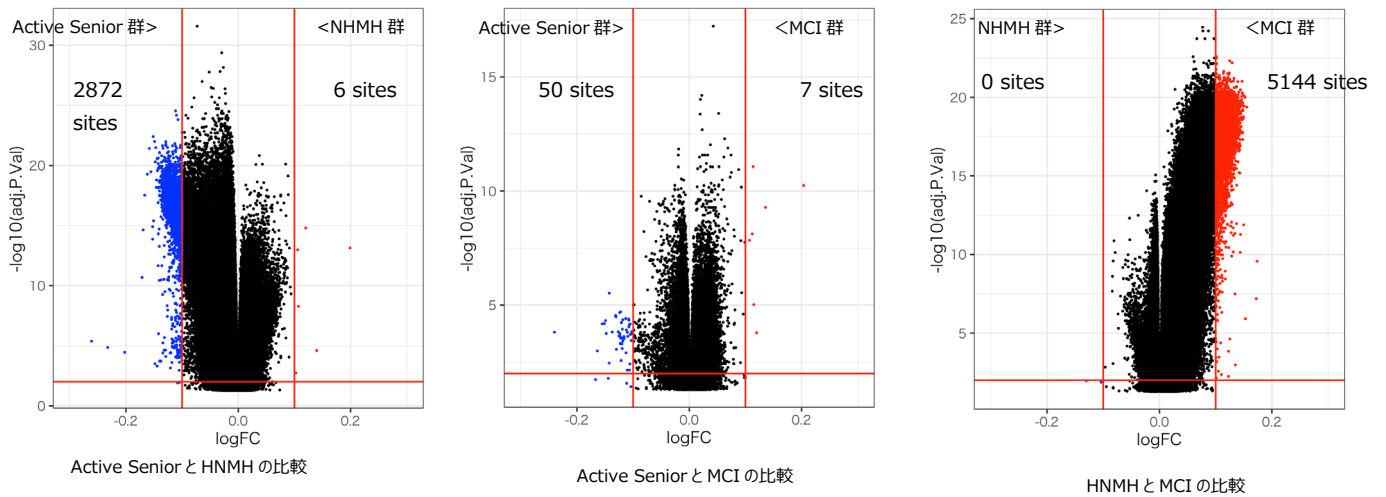


図 3. メチル化群間差

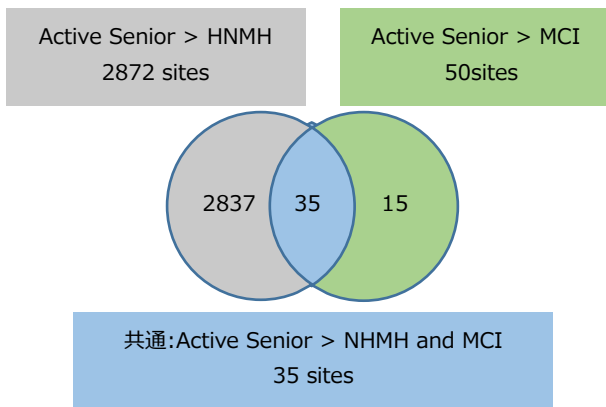


図 4. 群間比較 (共通サイトの確認)

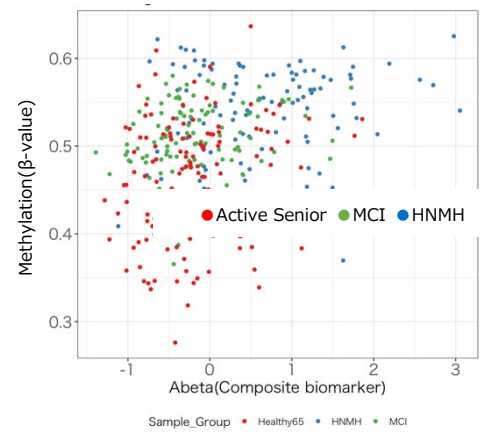


図 5. Abeta とメチル化サイトの関係

別紙 1

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オーム・バイオマーカー解析

令和3年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山本 万里

令和4(2021)年 5月

別紙2

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) -----6
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 -----14

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・エグゼクティブリサーチャー

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、健常者に加え、新たに軽度認知障害と認知症患者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蓄積量(CM値)は、認知症患者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、年齢の比較的若い世代では、CM値の上昇と生活習慣病リスクの上昇に正の関係のあり、50歳以上では50歳未満とは異なり、食事習慣(内容)がCM値に大きく影響していた。このため、食事内容の改善により、CM値の抑制の効果が期待される。さらに、健常者群と認知症患者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(分担研究)。また、機械学習を用いて唾液菌叢による認知症・MCI・非認知症を高精度に識別する予測モデルを構築した。App<NL-G-F>ノックインマウスの腸内細菌叢とAb沈着の関係には性差による違いがあることを見出した。56名の百寿者の腸内細菌叢解析と特徴的な細菌種を同定し(Nature, 2021に掲載)、腸内細菌叢の存在は脳内のタウリン酸化を抑制することが示唆された。海馬歯状回における新生ニューロンマーカー(Dcx)と負に相関する3種類の菌種を同定し、その分離菌株の無菌マウスへの移植によりDcxが有意に減少することを実証した。種々の抗生剤処理したノトバイオトマウスの行動・物体認知試験による認知症と関連する菌群の絞り込みを行い、場所・認知機能に有意に関与する9菌種を特定した(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・学長)

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 (neuro filament 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) の血清中のアミロイドβ蓄積量等を解析し、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20歳から70歳台の未病を含む健康な被験者587名 (20歳台: 21名、30歳台: 73名、40歳台: 139名、50歳台: 170名、60歳台: 145名、70歳台: 39名、男性172名、女性415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 $APP_{669-711}$ 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-TOFMS) により $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 及びそれらの前駆体である $APP_{669-711}$ の3種のペプチドを測定し、 $APP_{669-711}$

$A\beta_{1-42}$ 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リングした後、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。

睡眠状態は、PGV社睡眠脳波計を使って計測し、血液成分分析、血圧計測は常法によって実施した。食事摂取状態は食事摂取頻度調査 (FFQ) により算出した。認知機能はMinicogテストを実施した。

血液成分値、血圧、睡眠状態は、年齢、性別ごとにRobustZ scoreで標準化した (数値が3以上は3に、-3以下は-3にする)。

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

CM値は、加齢により増加していくが、50歳以上になると個人差が多く見られるようになり、加齢だけではない要因が存在する可能性がある (図1)。そのため、それぞれの解析は、50歳未満と50歳以上にわけて実施した。

血圧、血液成分とCM値の関係を解析したところ、50歳未満で、CM値が高めだと、CM値が低めの被験者に比べて、収縮期血圧、アルカリフォスファターゼ、血糖値、尿酸値が有意に高く、HDLコレステロールは有意に低かった (図2)。50歳以上では明確な差異は認められなかった。

摂取栄養とCM値の関係を解析したところ、50歳以上で、CM値が高めだと、CM値が低めの被験者に比べ、エネルギー摂取、コレステロール摂取効率、短鎖・中鎖脂肪酸摂取効率が有意に少なく、タンニン摂取効率が有意に高かった (図3)。50歳未満では明確な差異は認められなかった。

認知機能テストMinicogとCM値の関係のうち、近時記憶のスコアとCM値、時計描写とCMとの関係をU検定にて解析したところ、50歳未満では、近時記憶の点の低下によりCM値が高くなり、50歳以上では、時計描写テストの点数の低下によりCM値が高くなることが明らかになった (図4)。

(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

アミロイドβの脳内への蓄積程度を示すCM値との関係を、食事、運動、睡眠、ストレス、運動、腸内細菌叢等と比較した。

CM値は年代により異なる関係が見られ、50歳未満でCM値が高めの方は、

- 1 臨床検査値（血圧、肝機能腎機能、脂質など）が高め
- 2 睡眠時間が短め
- 3 腸内細菌の多様性が低い、
さらに
近時記憶のスコアが低い人はCM値高い。

50歳以上でCM値が高い人は

- 1 コレステロールや短鎖、中鎖脂肪酸の接種効率が悪い。
（エネルギー摂取量も低いため、全体的な摂取量が少ない）
- 2 睡眠時間が長め
さらに
時計描写のスコアが低い人はCM値が高いことがわかった。

以上の結果から
CM値への外的要因の影響は、年齢により異なる可能性があり、年齢の比較的若い世代では、CM値の上昇と生活習慣病リスクの上昇に正の関係のあることがみとめられた。そのため、食事習慣を含む生活習慣の改善による生活習慣病リスクの低減は、CM値の抑制にも効果が期待される。一方、50歳以上では50歳未満とは異なり、食事習慣（内容）がCM値に大きく影響していた。このため、食事内容の改善により、CM値の抑制の効果が期待される。

E. 結論

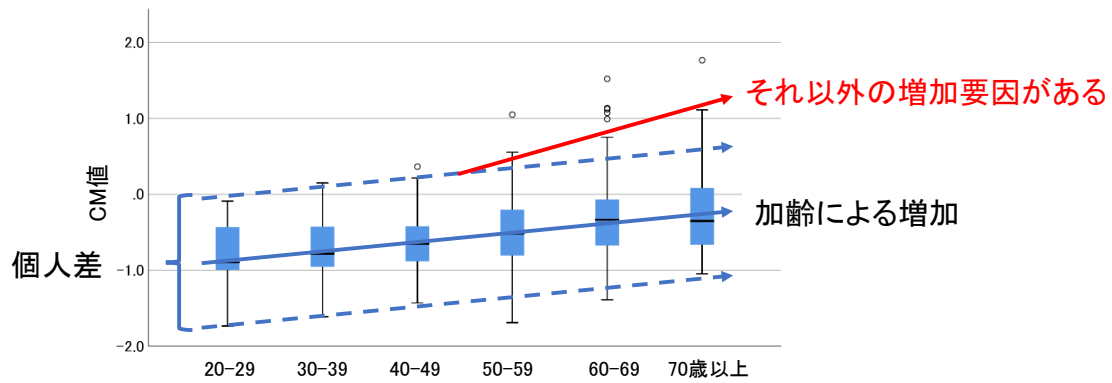
アミロイドβ蓄積量を増加させるリスクの高い血液成分、食生活、睡眠状態などの情報は、個別化健康指導や栄養指導などの実現を示唆するとともに、ヘルスケア分野の市場拡大による経済効果が期待できると考えられる。

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

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 なし
2. 実用新案登録 なし



個人差に関連する要因が、50歳以上では50歳未満とは異っている。
そのため50歳以上は分散が大きく変化する。

図1. アミロイドβ蓄積の加齢による変動

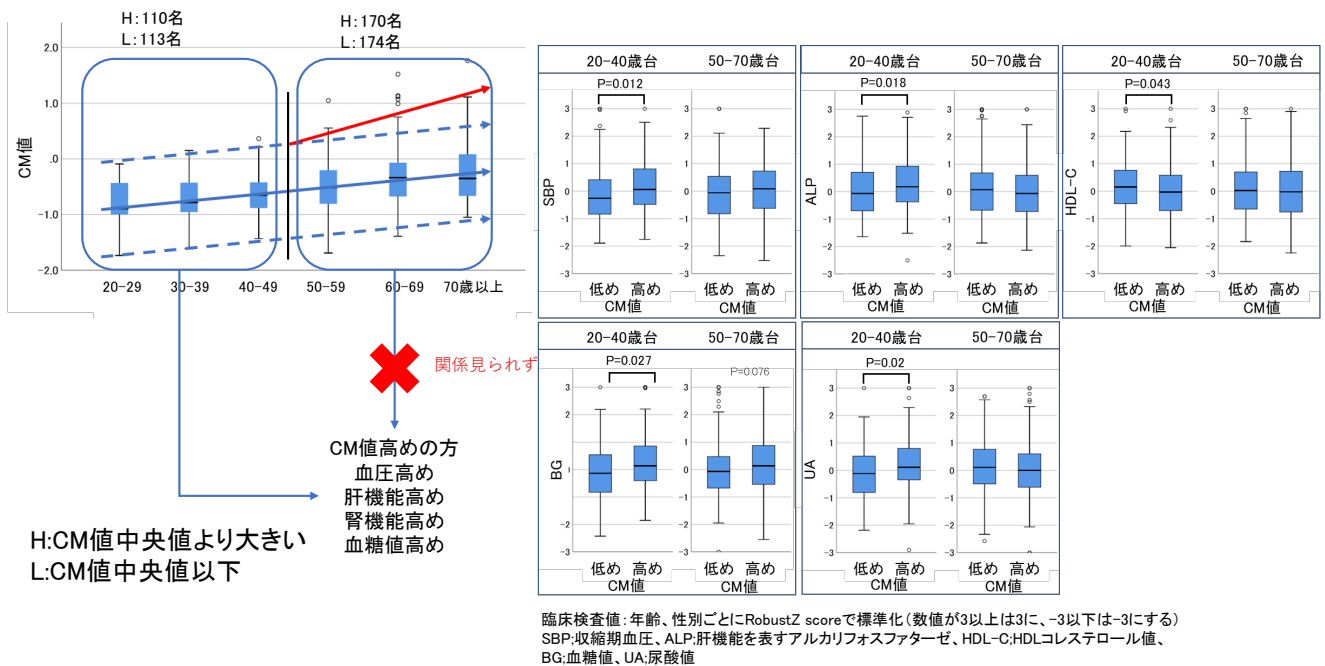


図2. 摂取栄養とCM値の関係

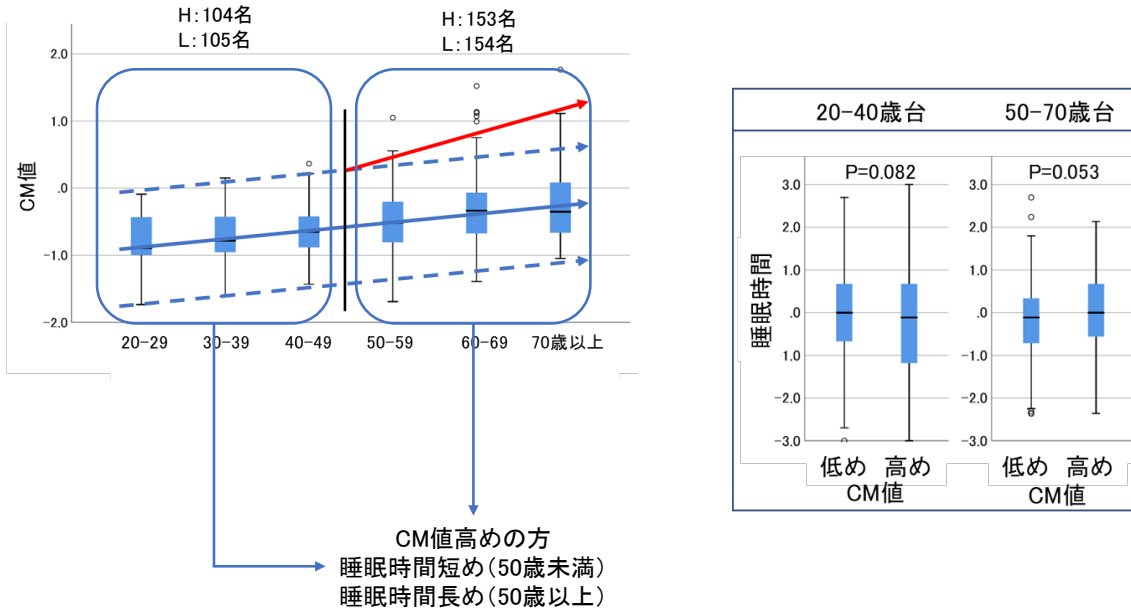


図3. 睡眠時間とCM値の関係

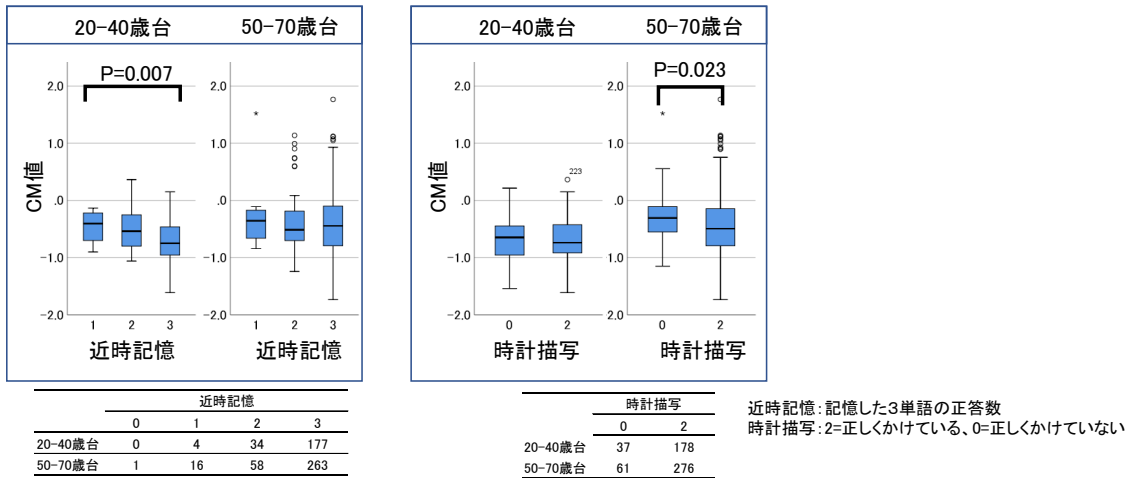


図4. 認知機能テスト Minicog とCM値の関係

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))

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
(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 学長

研究要旨

本年度は、健常人に加え、新たに軽度認知障害と認知症患者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、認知症患者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、健常人群と認知症患者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、未病者を含む健常者と軽度認知障害、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歳までの健康な被験者(以下、Healthy群)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、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、HNMH群)。

2. 測定項目

参加した被験者から採血を行い、生化学項目(亜鉛、アラキドン酸など)の他、血中アミロイドβ(以下、Abeta)の測定に使用した。Abetaの測定は、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。

糞便メタゲノム解析は、Healthy群の中から60歳以上(以下、ActiveSenior群)、MCI群とHNMH群の3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解析は、Healthy群(65歳以上)・MCI群・HNMH群の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。

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、血中アミロイドβ(Composite Biomarker値)のグラフを示した。HNMH群については、病態別に小グループを付与し、比較を行った。3群の比較では、HNMH>MCI>Healthyの順に、Abetaの蓄積が見られた。またHNMH群内の病態別6グループの比較

は、AD群（アルツハイマー群）のAbetaの平均値±SEは、 1.28 ± 0.23 とHNMH群内で最も高く、またPDAD群（パーキンソン病とアルツハイマー病の併発群）が、PD群（パーキンソン病単独群）より有意に高値であった。

次にActiveSenior群、MCI群、HNMH群から糞便を採取しDNA抽出を行い、糞便メタゲノム解析を行った。図2に腸内菌叢の系統分類結果を示した。HNMH群の病態別グループ比較では、ActiveSenior群と比較し、特にPDAD群（パーキンソン病とアルツハイマー病の併発群）とDLB群（レビー小体型認知症群）において、腸内菌叢の組成に違いが見られた。PDAD群は、class Verrucomicrobiae、class Gammaproteobacteria、class Bacilliの増加、class Clostridiaの減少が見られ、DLB群は、class Actinobacteria、class Coriobacteriiaの増加が見られた。

最後に認知症と関連のあるメチル化サイトの探索のため、「MCI群」と「HNMH群」に加え、Healthy被験者のうち65歳以上を使用し、「Active Senior群」とし、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73万メチル化サイトを解析に使用した。群間比較において特に、有意差 ($p < 0.01$) かつlogFC値±0.1以上のサイトを抽出した。Active Senior群とHNMH群の比較では、Active Senior群>HNMH群は、2872サイト。HNMH群>Active Senior群は、6サイト。Active Senior群とMCI群の比較では、Active Senior群>MCI群は、50サイト、MCI群>Active Senior群は、7サイトであった。また、HNMH群とMCI群の比較では、HNMH群>MCI群は、0サイト、MCI群>HNMH群は、5144サイト見られた（図3）。データは示していないが有意差を示したサイト数が多いActive Senior群>HNMH群とMCI群>HNMH群の両比較において、染色体上の領域別の頻度を比較したところ、転写領域（TSS200, TSS1500）は、有意差が見られたサイト全体の約15%程度、特に多かったのはBodyの約50%であった。図4に、Active Senior群と病者（MCI群とHNMH群）の有意差の見られたサイトの共通性を確認したところ、Active Senior群がMCI群とHNMH群に対しβ値が高値であったメチル化サイトは、合計35サイトであった。その他、2837サイトがHNMH群のみ、15サイトがMCI群のみであった。次に、有意差が見られたCpGサイトと今回測定した生化学項目との相関を調べたところ、認知症研究の重要マーカーであるアミロイドβ値と緩やかな相関が見られたサイトが検出された（図5）。

（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（HNMH群）の3群間比較の結果、HNMH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、HNMH群の病態別の群比較では、AD群が最も高いAbeta値を示し、PDAD群（パーキンソン病とアルツハイマー病の併発群）が、PD群（パーキンソン病単独群）より有意に高値であった。以上より血中のAbetaの蓄積がアルツハイマー病と関連がある事が示された。

糞便メタゲノム解析は、図2に示したHNMH群の病態別グループ比較では、ActiveSenior群と比較し、特にPDAD群（パーキンソン病とアルツハイマー病の併発群）とDLB群（レビー小体型認知症群）において、腸内菌叢の分布に特異的な組成が見られた。また、今回の結果から、PDAD群は、ADのみ、もしくはPDのみ発症者と異なる菌叢である事が示された。これは、PDADなどの病種が併発している被験者のデータが取得できたことにより、単独の症例の患者と併発症例の患者との比較が可能となり、またさらに上記の菌叢解析を進めることで、併発症例の要因の探索にも有効であると考えられた。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る。

次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65歳以上（Active Senior群）・軽度認知障害（MCI群）・認知症患者（HNMH群）の3群を用いて、エピゲノム解析では、特にActive Senior群と比較し病者（HNMH群、MCI群）で脱メチル化が進んでいるものも多く見られた。病者と健康な被験者65歳以上の比較において、特に有意差があったものの中には、詳細は示していないがHOOK遺伝子、BAZ1A遺伝子などアルツ

ハイマーに関連する遺伝子。そのほか、年齢に関連する遺伝子の転写領域にもメチル化に有意差が見られた。また特にアミロイドβと相関のあるサイトには、早老に関連すると報告がある遺伝子の転写に関わるサイトとの関係が確認できた(図5)。今回統計的に選び出したサイトが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。さらには、先に特許申請(特願2021-053424)にて報告した個々の遺伝子背景(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 なし

H. 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

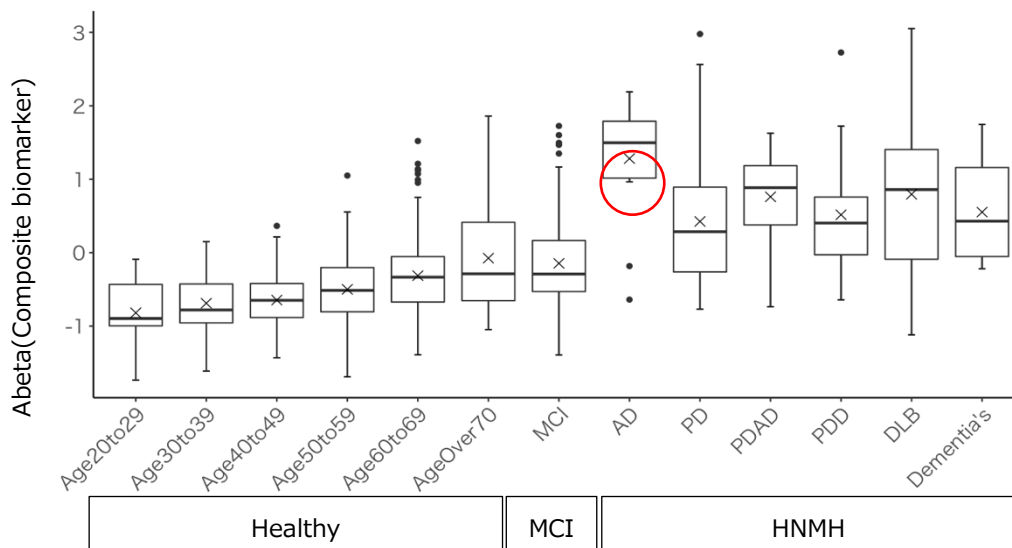


図1. アミロイドβ値 (Composite biomarker) の比較
 Healthy: 健常人、MCI: 軽度認知障害、HNMH: 認知症患者

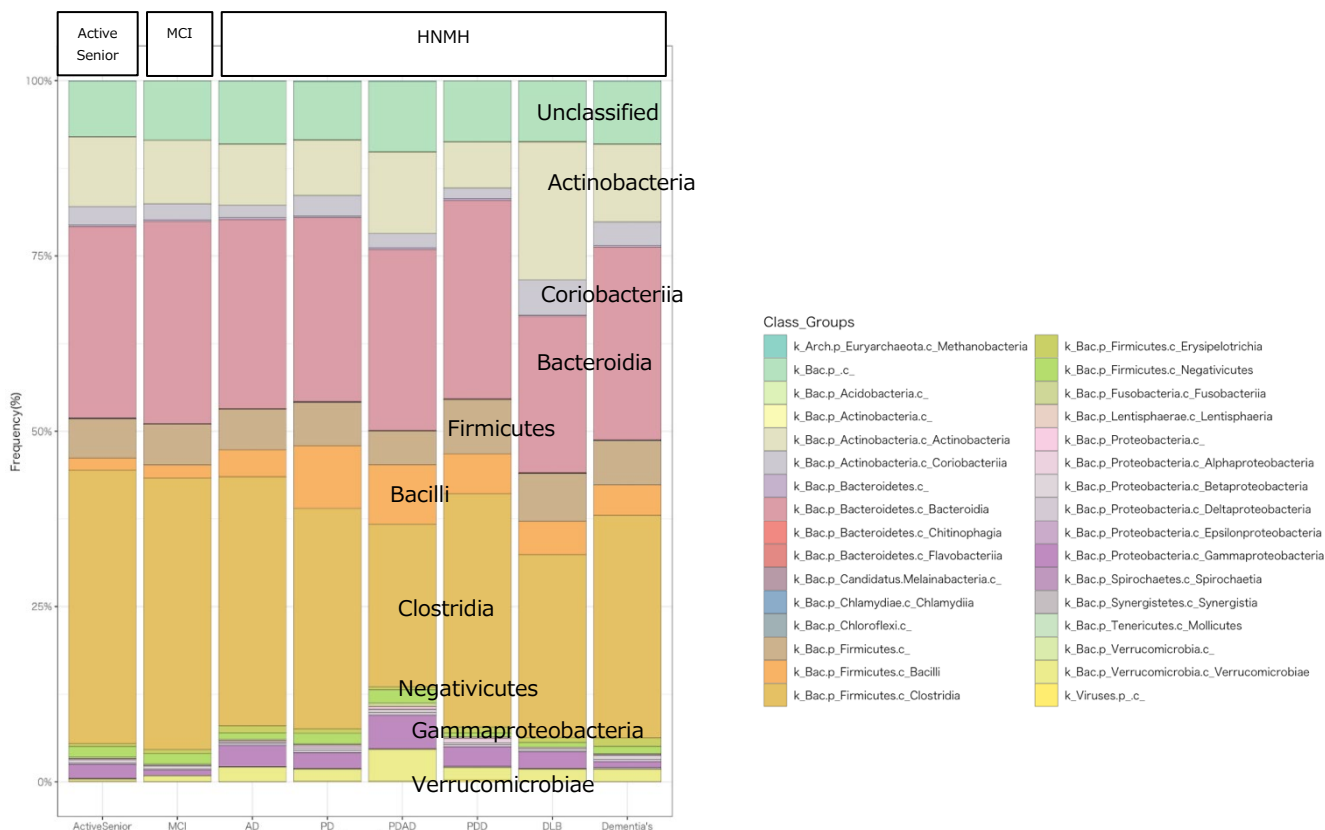


図2. 腸内菌叢 (Class) の比較

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

研究課題名：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)

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・ノトバイオト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た。

C. 研究結果

・AD、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、また門レベル、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。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認知症・MCI・非認知症を高精度に識別するロバストな認知症予測モデル (AUC 0.65~0.75) の開発に成功した。さらに、被験者の口腔所見 (因子) も加えた機械学習から、3群をより高精度に識別する認知症予測モデル (AUC 0.86~0.91) の開発にも成功した (図1)。

・App<NL-G-F>ノックインマウス (ADモデルマウス) を用いた脳内A β 蓄積と腸内細菌叢との関連性解

析では、腸内細菌叢とAb沈着と関連性が性差によって異なることを見出した。

・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、AD患者の糞便を定着させたノトバイオームマウスの作製等を計画している。

・通常の無菌マウスではその脳内タウタンパク質のリン酸化が通常マウスよりも増加しており、腸内細菌叢はタウリン酸化を抑制することが示唆された (図2)。

・昨年度に同定した新生ニューロンマーカー (Dcx) と負に相関する 3 種類の菌種を定着させたノトバイオームマウスにおいて Dcx の有意な減少を観察した。これらの結果から、ニューロン新生への腸内細菌叢の関与が強く示唆された (図3)。

・AD患者由来の糞便細菌叢をもつノトバイオームマウスの場所認知機能に有意に相関する9 OTUs (8 OTUsは行動異常に負に相関) を特定し、現在その培養分離を進めている。

D. 考察

本年度の研究から、機械学習法を用いて高精度な認知症予測モデルを開発できた。これらのデータは唾液マイクロバイオ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と期待される。

E. 結論

唾液マイクロバイオームが認知症、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) Sato K, Watamura N, Fujioka R, Mihira N, Sekiguchi M, Nagata K, Ohshima T, Takashi Saito, Saido TC, Sasaguri H: A 3rd generation mouse model of

Alzheimer's disease shows early and increased cored plaque pathology composed of wild-type human amyloid β peptide. JBC 297,101004, 2021.

2) Takamura R, Mizuta K, Sekine Y, Islam T, Takashi Saito T, Sato M, Ohkura M, Nakai J, Ohshima T, Saido CT, Hayashi Y: Modality specific impairment of hippocampal CA1 neurons of Alzheimer's disease model mice. J Neurosci 41: 5315-5329, 2021

3) Sasaguri H, Hashimoto S, Watamura N, Sato, K Takamura R, Nagata K, Tsubuki S, Ohshima T, Yoshiki, A, Kitazume, Per Nilsson S, Winblad B, Saito T, Iwata N, Saido TC: Latest advances in modeling Alzheimer's disease. Frontiers in Neuroscience 807473, 2022.

4) Sato Y, Atarashi K, Plichta DR, Arai Y, Sasajima S, Kearney SM, Suda W, Takeshita K, Sasaki T, Okamoto S, Skelly AN, Okamura Y, Vlamakis H, Li Y, Tanoue T, Takei H, Nittono H, Narushima S, Irie J, Itoh H, Moriya K, Sugiura Y, Suematsu M, Moritoki N, Shibata S, Littman DR, Fischbach MA, Uwamino Y, Inoue T, Honda A, Hattori M, Murai T, Xavier RJ, Hirose N, Honda K: Novel bile acid biosynthetic pathways are enriched in the microbiome of centenarians. Nature 2021 599: 458-464.

5) Kikusui T: Aims of the special issue of "Neuro-Molecular Understanding for the Gut-Brain Axis". Neurosci Res. 2021 Jul;168:1-2.

6) Suzuki H, Furuya J, Hidaka R, Miyajima S, Matsubara C, Ohwada G, Asada T, Akazawa C, Sato Y, Tohara H, Minakuchi S: Patients with mild cognitive impairment diagnosed at dementia clinic display decreased maximum occlusal force: a cross-sectional study. BMC Oral Health. 2021 Dec 27;21(1):665.

2. 学会発表

1) 服部正平: 第27回日本ヘリコバクター学会ヒトマイクロバイオームのメタゲノミクス 2021年9月25日。

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

検体情報(2021年11月)

	非認知症(n=120)	MCI (n=109)	認知症 (n=163)
年齢	72.9±9.0	75.7±7.3	78.9±7.6
Male %	35.0	52.3	44.2

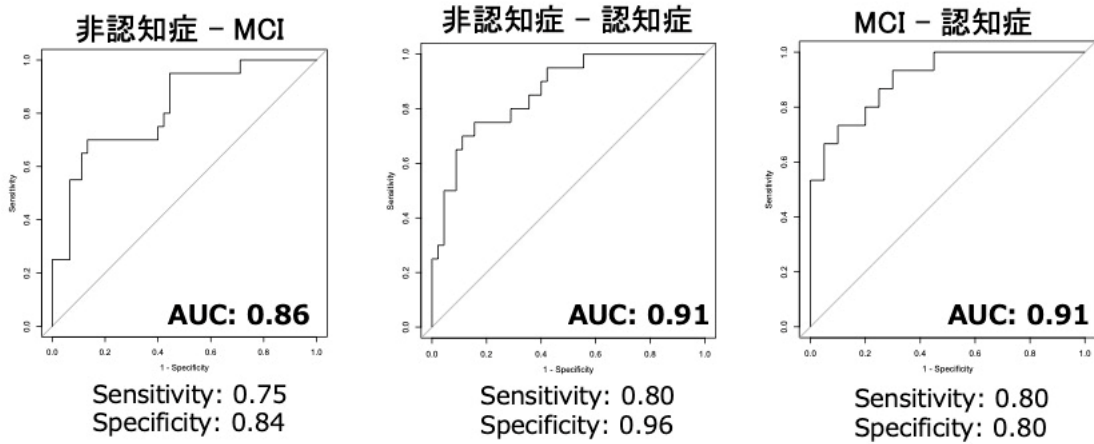


図1. 唾液菌叢・口腔データを用いたAUC-RFによる認知症予測モデルの開発

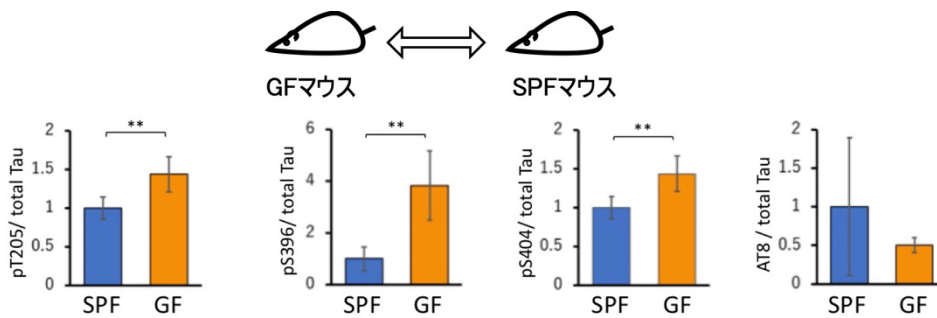


図2. 無菌(GF)及びSPFマウス脳内のタウリン酸化

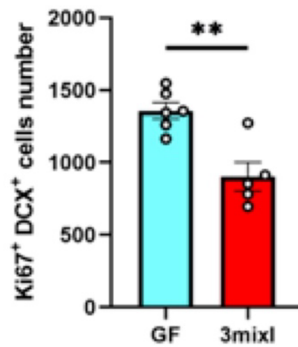


図3. 腸内菌によるニューロン新生の抑制

DCXに負に相関する3つの菌株mixを定着させたノトバイオームマウスにおけるDCX+細胞の減少

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
Sato K, Watamura N, Fujioka R, Mihi ra N, Sekiguchi M, Nagata K, <u>Ohs hima T</u> , Takashi S aito, Saido TC, Sa saguri H	A 3rd generation mouse model of Alzheimer's disease shows early and increased cored plaque pathology composed of wild-type human amyloid β peptide	JBC	297	101004	2021
Takamura R, Mizuta K, Sekine Y, Islam T, Takashi Saito T, Sato M, Ohkura M, Nakai J, <u>O hshima T</u> , Saido C T, Hayashi Y	Modality specific impairment of hippocampal CA1 neurons of Alzheimer's disease model mice	J Neurosci	41	5315-5329	2021
Sasaguri H, Hashimoto S, Watamura N, Sato, K Takamura R, Nagata K, Tsubuki S, <u>Ohs hima T</u> , Yoshiki, A, Kitazume, Per Nilsson S, Winblad B, Saito T, Iwata N, Saido TC	Latest advances in modeling Alzheimer's disease	Frontiers in Neuroscience	16	807473	2022
Sato Y, Atarashi K, Plichta DR, Arai Y, Sasajima S, Kearney SM, <u>Suda W</u> , Takeshita K, Sasaki T, Okamoto S, Skelly AN, Okamura Y, Vlami kis H, Li Y, Tano ue T, Takei H, Nittono H, Narushima S, Irie J, Itoh H, Moriya K, Sugiura Y, Suematsu M, Moritoki N, Shibata S, Littman DR, Fischbach MA, Uwamino Y, Inoue T, Honda A, <u>Hattori M</u> , Mura i T, Xavier RJ, Hirose N, <u>Honda K</u>	Novel bile acid biosynthetic pathways are enriched in the microbiome of centenarians	Nature	599	458-464	2021

<u>Kikusui T</u>	Aims of the special issue of "Neuro-Molecular Understanding for the Gut-Brain Axis"	Neurosci Res	168	1-2	2021
Suzuki H, Furuya J, Hidaka R, Miyajima S, Matsubara C, Ohwada G, Asada T, <u>Akazawa C</u> , Sato Y, Tohara H, Minakuchi S	Patients with mild cognitive impairment diagnosed at dementia clinic display decreased maximum occlusal force: a cross-sectional study	BMC Oral Health	21	665	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・エグゼクティブリサーチャー
(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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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	■ □	■	北海道情報大	□
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	□ ■	□		□
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	■ □	■	北海道情報大、農研機構	□
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	□ ■	□		□
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：)	□ ■	□		□

(※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) 未審査に場合は、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 ■ 未受講 □
-------------	------------

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 ■ 無 □ (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 ■ 無 □ (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 ■ 無 □ (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 □ 無 ■ (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4年5月10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) 北海道情報大学・学長
(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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		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	<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	<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) 未審査に場合は、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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式

令和4年5月10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 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 (所属部署・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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	早稲田大学、順天堂大学、 理化学研究所、麻布大学、 慶應義塾大学	<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 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。