

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

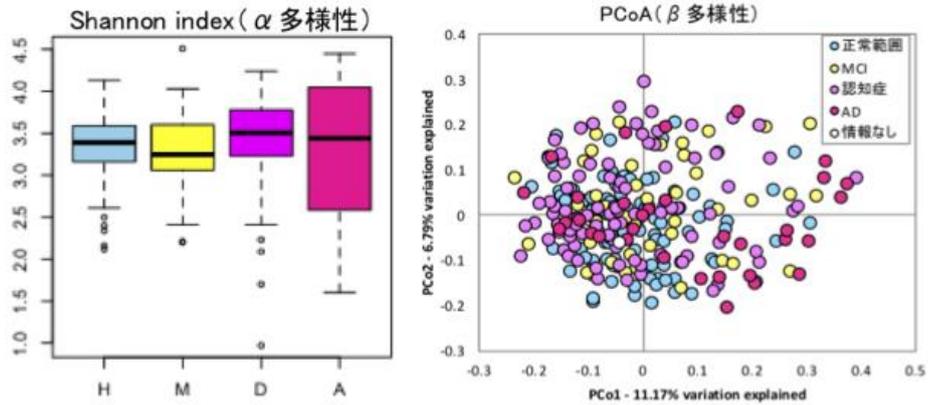


図1. 16Sデータに基づいた認知症患者を含む被験者群間の唾液細菌叢の比較

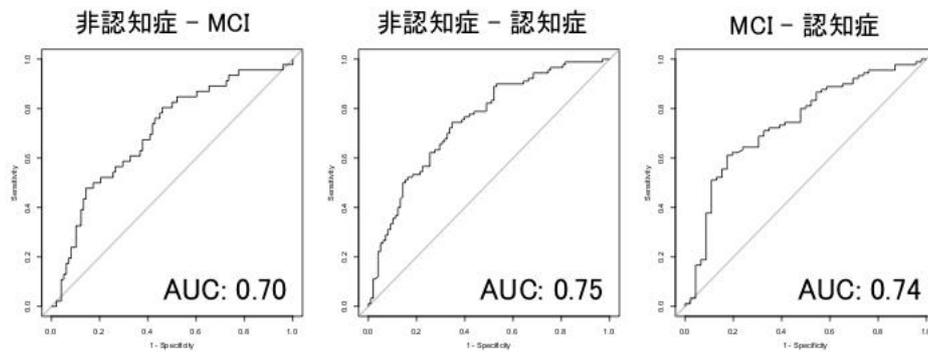


図2. 機械学習(random forest法)による認知症予測モデル(唾液菌・種レベル)のROC曲線

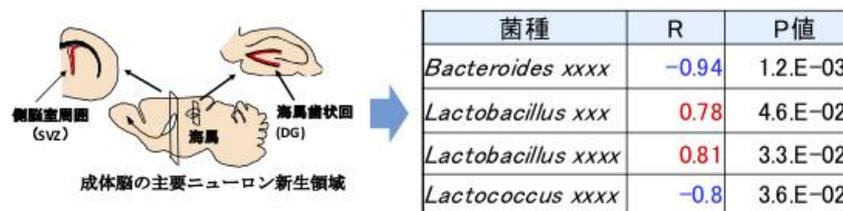


図3. マウス成体脳のニューロン新生能(DCXレベル)と相関する腸内細菌種