

令和元年6月17日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19246

研究課題名（和文）ビッグデータからみた腸内細菌と肥満の関係

研究課題名（英文）CHANGES IN GUT MICROBIOTA COMPOSITION WITH AGING IN OBESE ADULTS

研究代表者

田中 里奈 (Tanaka, Rin)

弘前大学・医学研究科・助手

研究者番号：40709713

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題は、腸内細菌叢と肥満の関係を、加齢の影響と生活習慣の違い（飲酒習慣、喫煙習慣）から検討し、新たな肥満予防、生活習慣病予防へと繋げることを目的とした。対象者は2014年度岩木健康増進プロジェクトに参加した1,082名とした。本研究から、非肥満群と肥満群では、加齢の影響による腸内細菌の組成は異なることが明らかとなった。しかし、飲酒習慣や喫煙習慣の有無では、非肥満群、肥満群ともに組成に有意差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、肥満と加齢による腸内細菌叢の影響が明らかとなった。肥満者と非肥満者では加齢による腸内細菌叢の変化が異なることから、腸内細菌叢のコントロールは肥満の予防・防止に有用である可能性が考えられ、また、年齢に応じて対応を変える必要があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is clarify the relationship between obesity and gut microbiota as a function of age. Furthermore, the impact of lifestyle factors on gut microbiota were discussed. Fecal samples from 1082 healthy Japanese adults aged 19-90 years who participated in the Iwaki Health Promotion Project in 2014. Changes in the composition of gut microbiota with age were different between the obese and non-obese groups. Bacterial diversity decreased with age at the phylum level. The abundances of certain gut microbiota, such as Bacteroidetes and Firmicutes, were different between the obese and non-obese groups. There were no significant differences in alcoholic and smoking habits. Bacterial diversity was different with age between the obese and non-obese group. The composition of Bacteroidetes and Firmicutes changed with increasing age in the obese group.

研究分野：公衆衛生

キーワード：腸内細菌叢 一般住民 肥満 生活習慣 加齢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満者は世界で男性 2 億 6600 万人、女性では 3 億 7500 万人いるとされ (2014 年時点)、今後もその数は増加することが予測されており、世界中で深刻な問題となっている。肥満は多くの病気を招く要因となることが知られている。その中でも特に、糖尿病や高血圧、脂質異常症などの生活習慣病と重複して発症するメタボリックシンドロームとも密接な関係があることが知られている。ダイエットなどで肥満を予防もしくは改善することもできるが、普段の生活習慣による肥満のより効果的な予防が求められている。

ヒトの腸内には 500~1,000 種類、総数にして 100 兆個 (重量で約 1 kg 相当) にも及ぶ腸内細菌が生息しており、これらの腸内細菌は宿主と共生関係にある。腸内細菌は生活習慣などの外的環境の影響を強く受け、「腸内細菌叢」と呼ばれる腸内細菌の生態系を形成している。近年、肥満に伴う腸内細菌叢の構成の変化に関する報告が増えてきている。例えば、正常個体と肥満個体では腸内細菌叢の構成が異なること、肥満によって腸内細菌叢の多様性が減少し、Firmicutes 門の比率が増加して相対的に Bacteroidetes 門の比率が低下することがマウス、ヒトで示されている。しかし、正常者と肥満者の腸内細菌叢の違いは明らかになっているものの、どのような生活習慣によって腸内細菌叢に変化が現れるかなどの詳細な研究は進んでいない。その理由として、腸内細菌の解析方法が十分に確立されていなかったことが挙げられる。従来の腸内細菌の解析方法は、糞便をサンプルとした培養法または qPCR 法であった。しかし、腸内細菌の約 70% が同定困難であり、メタゲノム解析には適さなかった。また、手法も非常に煩雑であった。

2. 研究の目的

本研究課題は一般住民を対象に 16S rDNA 遺伝子解析を行うことで、腸内細菌叢と肥満の関係を加齢の影響と生活習慣の違い (飲酒習慣、喫煙習慣) から検討し、新たな肥満予防、生活習慣病予防へと繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究対象

解析は 2014 年度岩木健康増進プロジェクトに参加した者のうち、大腸がんあるいは糖尿病の既往のある者、抗生剤を服用中の者、欠損項目のある者を除いた 1,082 名 (男性 410 名、女性 672 名) を解析の対象とし、年齢を 6 グループ (39 歳未満、40-49 歳、50-59 歳、60-69 歳、70-79 歳、80 歳以上) に分けて行った。また、BMI < 25kg/m² を非肥満群、BMI ≥ 25kg/m² を肥満群とした。

(2) 生活習慣

対象者には自己記入式質問用紙を事前に配布し、プロジェクト健診当日に個人面談を行い、回答の確認後に回収した。調査項目は性別、年齢、現病歴と既往歴、薬剤服用の有無であった。生活習慣は喫煙習慣および飲酒習慣の有無について、それぞれの有無を調査した。身長および体重は調査当日に測定した。

(3) 臨床的調査

空腹時血液生化学検査により、血清中の中性脂肪、HDL コレステロール、LDL コレステロール、グルコース、HbA1c を測定した。

(4) 腸内細菌解析

自己記入式質問用紙の配布に併せて、便検体の回収容器として採弁キットを配布し、プロジェクト健診当日にキットを回収し、16SrDNA 部分を用いた次世代シーケンズ解析とテクノスルガ・ラボ微生物同定データベース DB-BA9.0 による菌種の推定を行った。

回収した便検体について、ジルコニアビーズを用いて、FastPrep FP100A Instrument (MP Biomedicals, USA) による破碎を行った懸濁液 200 μL について、Magtration System 12GC (Precision System Science, Japan) および MagDEA DNA 200 (Precision System Science, Japan) を用いて細菌 DNA の抽出を行った。最終的に ND-100 (NanDrop Technologies, USA) を用いて DNA サンプルを 10 μg/μL に調整した。細菌の 16SrDNA における V3-V4 領域の約 430bp を増幅するため、Pro341F および Pro805R を使用し、Rotor-Gene Q quantitative thermal cyclers (Qiagen Germany) を用いて PCR 増幅を行った。PCR 増幅された DNA について、Illumina Miseq Reagent Kit version 2 および Illumina Miseq sequencing system (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いてプライマーを除く約 430bp を決定した。得られた DNA 配列について、Metagenome@KIN analysis software (World Fusion, Japan) を用い、テクノスルガ・ラボ微生物同定データベース DB-BA9.0 による菌種の推定を行った。

(5) 統計解析

解析は肥満群と非肥満群に分け、各菌の組成を比較した。肥満群と非肥満群の比較は Stata13 (StataCorp LLP, College Station, TX, USA) を用いて二乗検定と Kruskal-Wallis 検定により検討を行った。グループ内の比較は JMP 13 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) を用いて Steel 検定により検討を行った。

(6) 倫理的配慮

被験者には検査の目的と方法を説明し、あらかじめ文書で同意を得た。本研究は弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得た。

4. 研究成果

(1) 対象者の特徴

非肥満群 847 名、肥満群 235 名であった。うち、肥満群では男性の割合が非肥満群よりも有意に高かった。飲酒習慣および喫煙習慣では、非肥満群および肥満群で有意差は認められなかった。

臨床的調査では、中性脂肪、HDL コレステロール、LDL コレステロール、グルコース、HbA1c のすべての項目で肥満群の方が非肥満群よりも有意に高かった。

(2) 多様性の比較

Shannon-Wiener index を用いて腸内細菌叢の多様性を比較した。門レベルでは、肥満群、非肥満群ともに加齢とともに多様性は低下していた。しかし、綱レベルでは、非肥満群では加齢とともに多様性が低下していたのに対し、肥満群では有意な低下はみられなかった。

(3) 腸内細菌の組成の比較

肥満群、非肥満群それぞれで各菌種の組成を門レベルで比較したところ、Actinobacteria と Ignavibacteriae では肥満群、非肥満群ともに加齢とともに減少していた。Bacteroidetes は肥満群で加齢とともに減少していたのに対し、非肥満群では有意な変化は認められなかった。Firmicutes は肥満群で加齢とともに増加していたのに対し、非肥満群では有意な変化は認められなかった。

(4) 飲酒習慣による比較

肥満群、非肥満群ともに有意な変化は認められなかった。

(5) 喫煙習慣による比較

肥満群、非肥満群ともに有意な変化は認められなかった。

(考察)

本研究結果から、腸内細菌叢の加齢による影響は肥満者と非肥満者では異なることが明らかとなった。特に、Bacteroidetes と Firmicutes では肥満者と非肥満者で加齢による変化が異なることから、これらの菌種に着目した肥満対策が有用である可能性が考えられた。

食物繊維の摂取により Prevotella の割合が高くなり、動物性脂肪やたんぱく質の摂取により Bacteroides の割合が高くなることが報告されていることから、身体を動かすことが困難である高齢者などの肥満対策には、食生活により腸内細菌叢の割合をコントロールすることが有用である可能性が考えられた。特に、Bacteroidetes の割合を高くし、Firmicutes の割合を下げることが肥満を減少させ、体重等を維持する手助けとなる可能性が考えられた。

加えて、我々の結果は、腸内細菌は血清中グルコースと関連する可能性を示した。本検討では、血清中グルコースは非肥満群より肥満群で高くなっていた。さらに、血清中グルコースは加齢と共に上昇していたことから、Firmicutes の増加と関連した可能性が考えられた。先行研究では、若年者で高血糖と Bacteroides の間に関連が認められたと報告されている¹⁾。血清中グルコースと腸内細菌に何らかの関係がある可能性はあるものの、詳細な検討を行わなかったため、今後検討を行う必要があると考えられた。

これまでに生活習慣と腸内細菌の関係についていくつか報告がなされている。喫煙習慣については、クローン病患者における喫煙習慣が Bacteroidetes-Prevotella の割合に影響を与えることが報告された²⁾。さらに、飲酒習慣と腸内細菌の関係についてもいくつか報告されている^{3, 4)}。喫煙習慣と飲酒習慣は共に大腸がんのリスクファクターであることから、大腸がんと腸内細菌の関係についていくつか検討がなされている⁵⁾。以上より、本検討では飲酒習慣と喫煙習慣は腸内細菌叢の加齢による変化と関連は認められなかったものの、腸内の疾患と腸内細菌の関係を検討する際には生活習慣も考慮する必要がある可能性が考えられた。

(結論)

本研究では肥満者と非肥満者における腸内細菌叢の組成と加齢の関係、および生活習慣の関係を検討した。Bacteroidetes と Firmicutes の組成は加齢によって肥満者と非肥満者では異なることが明らかとなった。我々の研究成果により、いくつかの腸内細菌叢の組成をコントロールすることによって肥満者の体重管理が可能となる可能性が示された。

(参考文献)

1. Sepp E, Kolk H, Lõivukene K, Mikelsaar M. Higher blood glucose level associated with body mass index and gut microbiota in elderly people. Microb Ecol Health Dis. 2014;

25. doi: 10.3402/ mehd.v25.22857.
2. Benjamin JL, Hedin CR, Koutsoumpas A, Ng SC, McCarthy NE, Prescott NJ, Pessoa-Lopes P, et al. Smokers with active Crohn's Disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18:1092-100.
 3. Bode JC, Bode C, Heidelberg R, Dürr HK, Martini GA. Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. *Hepatogastroenterology.* 1984; 31: 30-4.
 4. Mutlu EA, Gillevet PM, Rangwala H, Sikaroodi M, Nagvi A, Engen PA, Kwasny M, et al. Colonic microbiome is altered in alcoholism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;302:G966-78.
 5. Fenq Q, Liang S, Jia H, Stadlmayr A, Tang L, Lan Z, Zhang D, et al. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nat Commun.* 2015;6:6528. doi: 10.1038/ncomms7528.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

(1) Rina Tanaka, Masashi Matsuzaka, Ippei Takahashi, Kaori Sawada, Shigeyuki Nakaji, Yoshihiro Sasaki. Changes in gut microbiota composition with aging in obese adults. *Hirosaki Med J.* 2019;69: 108-118.

〔学会発表〕(計1件)

(1) Rina Tanaka, Masashi Matsuzaka, Shigeyuki Nakaji, Yoshihiro Sasaki. Changes in gut microbiota associated with aging in obese individuals. 25th UEG Week Barcelona 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。