

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17H04134

研究課題名（和文）双生児を対象とした腸内細菌叢の構成因子の探索

研究課題名（英文）Research for constituents of microbiome in twins

研究代表者

富澤 理恵 (Tomizawa, Rie)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：20584551

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 15,020,000円

研究成果の概要（和文）：20歳から90歳の257名の成人双生児の腸内細菌叢と生活習慣に関連する情報の収集を行った。一部は認知機能調査や血液検査などと同時に収集した。本課題では、一卵性双生児間の差分に着目する新しい解析方法を検討した。Lactobacillus属は有意にペア内の構成比の差が小さかったことから、これは環境因子に対する感受性が低いと考えられた。一方で有意にペア内の構成比の差が大きかった菌は、環境因子に対する感受性が高いと考えた。このように双生児間の差分に着目することで、遺伝の影響を考慮した特異度の高い細菌を抽出する方法を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一卵性双生児のデータから、これまでになく一卵性双生児間の差分に着目する解析方法で検討した。Lactobacillus属は有意にペア内の構成比の差が小さかったことから、これは環境因子に対する感受性が低いと考えられた。一方で有意にペア内の構成比の差が大きかった菌は、環境因子に対する感受性が高いと考えた。このように双生児間の差分に着目して、高血圧と腸内細菌叢との関連をみたところ、先行研究と同じ関連性を示す菌が抽出され、遺伝の影響を考慮しても高血圧との関連があると考えられた。このように双生児間の差分に着目することで、遺伝の影響を考慮した特異度の高い細菌を抽出する方法を検討した。

研究成果の概要（英文）：We asked adult twins registered at the Center for Twin Research, Osaka University Graduate School of Medicine, to participate in this research. We obtained consent from 257 between the ages of 20 and 90, most of whom are monozygotic twins, and collected stool samples and lifestyle questionnaires. Before the COVID-19 epidemic, some had concurrent sampling data (cognitive function, blood tests, DNA information, etc.). In this project, we investigated a new analysis method that focuses on the differences between monozygotic twins. Lactobacillus had a significantly smaller difference in composition ratio within a pair, suggesting that it is less sensitive to environmental factors. On the other hand, it was considered that with a significantly large difference within a pair was highly sensitive to environmental factors. By focusing on the differences between twins in this way, we investigated a method of extracting bacteria with high specificity that considers the influence of genetics.

研究分野：基礎看護学

キーワード：腸内細菌叢 双生児研究

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸内細菌は、1000種以上の100兆を超える微生物で構成され¹、宿主であるヒトとの間に平衡関係を維持している。ヒト腸内細菌叢は、肥満、糖尿病、結腸直腸癌、動脈硬化症、炎症性腸疾患を含む多くの病気との関連が報告されている。例えば、世界中の公衆衛生上の課題である過体重と肥満については、非肥満群と肥満群の腸内細菌叢の違いに着目した結果²、非肥満群で腸内細菌の多様性が高く、さらに、肥満群ではインスリン抵抗性、脂質異常症、高い炎症状態を示したことを報告している。また、長期的な食事が腸内細菌叢の菌種組成に関連する³ことや、食事摂取と腸内細菌ならびに代謝物、炎症状態との関連に着目した肥満と過体重の方を対象としてエネルギー制限食事と体重維持食事の食事介入試験⁴の結果、腸内細菌の多様性の低い群には食事介入が臨床症状を改善させることを示した。これらのように、生活習慣病の発症リスク評価や治療効果の予測に腸内細菌叢が一助を担うことも強く示唆されている。したがって、人間の腸内細菌叢と人間の健康との関係についての知識を高めることは重要である。

腸内細菌叢に影響を与えるさまざまな環境要因の中で、腸内細菌叢の組成に影響を与える生活習慣要因は、食事⁵、ストレス、身体活動、薬物摂取、飲酒、喫煙習慣ということが分かっている。加えて、遺伝⁶、出産(分娩)方法、地理的影響、年齢⁷など調整できない、または、調整しにくい要因も腸内細菌叢には影響する。また、日本人の腸内細菌叢構成は外国人のそれとは異なり^{8,9}、日本人を対象とした研究が必要である。

本研究では、日本人双生児を対象に調査することで、日本人の腸内細菌叢とそれに影響する環境要因に着目した。

2. 研究の目的

腸内細菌叢や生活習慣病など疾患の発病や進行の双方にも、生活習慣をはじめとする環境の影響だけでなく、個人がもつ遺伝的影響も関与していることが報告されている。本研究の目的は、個人の遺伝的背景を考慮した上で、腸内細菌叢や疾患にどのような環境因子が影響を与えているかを特定することである。

これらを解明するためには、双生児を対象とする双生児研究法は、遺伝要因を制御し、特定の環境因子の影響を明確に出来る有用な手法である。特に生活習慣に関連するこれらは民族的・文化的・社会的背景の影響を受けるため、日本在住日本人双生児を対象とした研究法を用いる。

3. 研究の方法

大阪大学大学院医学系研究科附属ツインリサーチセンター(以下、OUCTR)が管理する大阪大学ツインレジストリ(以下、レジストリ)は全年齢の双生児がボランティア登録されている。本研究では、レジストリに登録されている成人双生児に協力依頼をし、同時期にサンプリングに協力いただける双生児ペアに対して、インフォームドコンセントを得て調査を行った。

調査内容は、糞便サンプルのほか、生活習慣や腸内細菌叢に関連する食事(brief-type self-administered diet history Questionnaire: BDHQと自作質問項目)、ストレス、身体活動、薬物接種、飲酒、喫煙習慣などとした。

糞便サンプルは、採便キット(株式会社テクノスルガ・ラボ、静岡県)にて採取を依頼した。採便キットはグアニジン溶液が入っており、採取後よく混合し、受け取り後DNA抽出まで4°Cで保存した。糞便サンプルの混合物は、ビーズ・ビーティング法を用いて機械的に破碎し、DNAの抽出にはGene Prep Star PI-80X(倉敷紡績株式会社、東京)を使用した。DNA抽出後、16S rRNA遺伝子のV3-V4領域を増幅し、MiSeqシーケンスシステム(Illumina, San Diego, CA, USA)を用いて塩基配列を決定した。糞便のサンプリングおよび16S rRNAの配列決定を含むすべての手順は、細見ら¹⁰のプロトコル通りに実施した。得られたペアエンドのFASTQデータを、リードトリミングとリード結合をしたのち、操作的分類単位(Operational Taxonomic Unit; OTU)を作成した。OUT作成と多様性分析は、QIIMEのパイプライン(バージョン1.9.1)を使用して実施した¹¹。FASTQファイルのトリミングから腸内細菌叢の多様性分析までのすべての手順は、先行研究¹²通りに実行した。OTUは、USEARCHアルゴリズム[27]を使用し、SILVA 128リファレンスデータベース¹³を参考にして、97%の相同性で属レベルまで作成した。

4. 研究成果

一卵性双生児28ペア56名の男性のデータセットを用いた。対象者の背景は、59.4±19.4(20-80)歳、BMIは23.4±3.9であった(表1)。抗生物質の服用により腸内細菌叢が影響を受けることが明らかになっていることから、データセットの作成時に、2週間以上抗生物質を服用していないこと、また、習慣的なアルコールの影響を考慮して、大量のアルコールを飲む習慣がないことを確認した。

一卵性双生児のデータから、これまでにない一卵性双生児間の差分に着目する解析方法で検討した。はじめに、統計解析のために、1検体あたり10,000リードを無作為に抽出し、平均で1リー

ド以下の分類群はノイズとして除外した。その結果、133属が抽出された。次に、相対存在比の大きさに依存するバイアスを避けるために、菌存在比の標準化のため、生データの組成値を下記計算式にてQ値を、clusterSim Rパッケージの正規化関数を使用して算出した。

$$Q = (\text{生データの組成値} - X\text{属の平均値}) / (X\text{属の標準偏差})$$

そのあとで、双生児ペア内で、属ごとに、双生児内差 (intra-twin difference; ITD) を算出し、抽出した133属それぞれのX属の平均ITD値 (mean ITD_x) と全133属28ペアのITDの平均値 (MD) を算出し、mean ITD_xとMDをウェルチのt検定で比較し、ITD_xの平均値がMDよりも有意に大きい属を環境要因の影響を受けやすい属として抽出し、分析の対象とした。

算出には、Rパッケージのcor関数を用いた。全統計解析は、R (バージョン3.5.0) を用いた。

ウェルチの二標本 t 検定を用いて、133 属それぞれの X 属の平均 ITD 値 (mean ITD_x) と、全 133 属 28 ペアの ITD の平均値 (MD) を比較し、MD=0.668 (p < 0.05) をカットオフ値として比較したところ、133 属から最終的に 13 属を選出した (表 2)。

13 属の中で、Lactobacillus だけが mean ITD が MD よりも有意に小さく、環境因子の影響を受けなかった。

そのほか、Bacteroides、Parabacteroides、Lachnospiraceae UCG-008 グループ、Lachnospiraceae UCG-004 グループ、Lachnospiraceae ND3007 グループ、Lachnospiraceae FCS020 グループ、Roseburia、Eubacterium hallii グループ、Lachnospira、Faecalibacterium、Ruminococcaceae UCG-003 グループ、Gardnerella の 12 属は mean ITD_x が MD よりも有意に大きく、環境因子の影響を受けると判断した。

抽出された 13 属のうち、Lactobacillus は双生児内差が小さいことから、遺伝的要因の影響を受けやすいと考えた。Lactobacillus は幼少期に定着する属として報告されており、この結果の原因の一つと考えられる。しかし、この結果は、双生児を対象とした既報研究で抽出された属とは一致していない。Lactobacillus と肥満との関連性に着目した研究では、肥満の被験者では腸内細菌叢における Lactobacillus の存在量が減少し、逆に Lactobacillus の存在量が増加することが示された。ほかにも、メタボリックシンドローム患者では Lactobacillus が増加することが示されている。これらのことから、メタボリックシンドロームや肥満と Lactobacillus の関係についての先行研究の結論は一貫していない。Lactobacillus については、プロバイオティクスとしての機能について多くの研究がなされている。最近のメタゲノム解析では、高脂肪食を与えた 8 週齢のスイス系マウスに Lactobacillus と Bifidobacterium の混合プロバイオティクスを投与すると、腸内細菌叢の組成が変化し、インスリン感受性を増加させたことを示した¹⁴。また、プロバイオティクスの乳酸菌は、非アルコール性脂肪性肝疾患や IBD において、有害な細菌を増殖させることで消化管バリア機能を高めることが示されている¹⁵⁻¹⁶。

先行研究では、メタボリックシンドロームや肥満は、ある程度、遺伝的要因の影響を受けていることも明らかになっており¹⁷、これらの関係を明らかにするためには遺伝的要因を考慮する必要がある。

本研究では、他の 12 属では双生児内の差が有意に大きかったため、環境因子の影響を受けやすいと考えた。

本研究では、腸内細菌叢への遺伝的および環境的影響を、遺伝的要因を排除するために、一卵性双生児ペア内差に焦点を当てた分析法を考案し、検討した。

このように双生児間の差分に着目して、腸内細菌叢と疾患の有無や環境因子データの関連をみたとき、遺伝の影響を考慮してもその関連があると考えられる。この方法を用いて、生活習慣や認知機能について分析を進めている。

表 1. 参加者の背景と栄養摂取量の平均($n = 56$).

	Mean	±	SD	(Min - Max)	Median	
Age	59.3	±	19.4	20 - 80	67.5	
Body mass index	23.4	±	3.9	15.5 - 32.9	23.8	
Nutrients						
Energy intake	(kcal/day)	2057.5	±	587.4	858.9 - 3564.9	1946.5
Protein	(g/1000 kcal)	38.5	±	7.4	20.3 - 54.6	37.3
Fat	(g/1000 kcal)	30.2	±	6.6	18.5 - 46.1	30.2
Carbohydrates	(g/1000 kcal)	133.9	±	19.7	94.7 - 172.0	135.3
Total Dietary Fiber	(g/1000 kcal)	6.7	±	1.8	2.5 - 10.2	6.8
Na	(mg/1000 kcal)	2307.0	±	479.2	1300.8 - 3630.0	2271.6
K	(mg/1000 kcal)	1459.7	±	429.4	564.2 - 2307.9	1412.4
Ca	(mg/1000 kcal)	319.4	±	122.5	91.9 - 625.7	310.7
Fe	(mg/1000 kcal)	4.5	±	1.1	2.2 - 6.7	4.7
Retinol equivalent	(μg/1000 kcal)	434.9	±	197.6	98.2 - 907.4	390.2
Vitamin D	(μg/1000 kcal)	7.7	±	4.6	0.2 - 23.2	6.6
ATC	(μg/1000 kcal)	4.2	±	1.2	2.1 - 8.1	4.3
Vitamin K	(μg/1000 kcal)	192.1	±	91.7	33.9 - 441.9	189.9
Vitamin B1	(mg/1000 kcal)	0.4	±	0.1	0.2 - 0.7	0.4
Vitamin B2	(mg/1000 kcal)	0.7	±	0.2	0.3 - 1.3	0.7
Vitamin B6	(mg/1000 kcal)	0.7	±	0.2	0.3 - 1.6	0.7
Vitamin B12	(μg/1000 kcal)	4.9	±	2.6	0.3 - 14.2	4.3
Vitamin C	(mg/1000 kcal)	64.6	±	28.1	17.6 - 151.3	60.2

栄養摂取量スコアは、簡単なタイプの自己記入式食生活史質問票の結果から算出。SD: 標準偏差。

表 2. 133 属から平均的な双子内差に基づいて選択された属

科	属	双生児内差の平均 (meanITD _x)	<i>P</i>
ALL(MD)		0.668	—
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	0.380	0.015 *
Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	1.338	0.000 *
Bifidobacteriaceae	<i>Gardnerella</i>	1.073	0.035 *
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae</i> UCG-008 group	1.163	0.006 *
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae</i> UCG-004 group	1.075	0.018 *
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae</i> ND3007 group	1.063	0.022 *
Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae</i> FCS020 group	1.060	0.026 *
Lachnospiraceae	<i>Roseburia</i>	1.146	0.020 *
Lachnospiraceae	<i>Eubacterium hallii</i> group	0.987	0.032 *
Lachnospiraceae	<i>Lachnospira</i>	1.037	0.041 *
Porphyromonadaceae	<i>Parabacteroides</i>	1.064	0.028 *
Ruminococcaceae	<i>Faecalibacterium</i>	1.043	0.028 *
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcaceae</i> UCG-003 group	1.030	0.038 *

ウェルチの *t* 検定 (* $p < 0.05$).

引用文献

1. Kamada, N.; Seo, S.-U.; Chen, G.Y.; Núñez, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2013, 13, 321–335.
2. Le Chatelier, E.; Nielsen, T.; Qin, J.; Prifti, E.; Hildebrand, F.; Falony, G.; Almeida, M.; Arumugam, M.; Batto, J. M.; Kennedy, S.; et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature.* 2013, 500(7464), 541–546.
3. Wu, G. D.; Chen, J.; Hoffmann, C.; Bittinger, K.; Chen, Y. Y.; Keilbaugh, S. A.; Bewtra, M.; Knights, D.; Walters, W. A.; Knight, R.; et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial

- enterotypes. *Science (New York, N.Y.)*. 2011,334(6052), 105–108.
4. Cotillard, A.; Kennedy, S. P.; Kong, L. C.; Prifti, E.; Pons, N.; Le Chatelier, E.; Almeida, M.; Quinquis, B.; Levenez, F.; Galleron, N.; et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*. 2013,500(7464), 585–588.
 5. O’Keefe, S.J.D.; Li, J.V.; Lahti, L.; Ou, J.; Carbonero, F.; Mohammed, K.; Posma, J.M.; Kinross, J.; Wahl, E.; Ruder, E.; et al. Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. *Nat. Commun.* 2015, 6, 1–14.
 6. Goodrich, J.K.; Davenport, E.R.; Beaumont, M.; Jackson, M.A.; Knight, R.; Ober, C.; Spector, T.D.; Bell, J.T.; Clark, A.G.; Ley, R.E. Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins. *Cell Host Microbe* 2016, 19, 731–743.
 7. Odamaki, T.; Kato, K.; Sugahara, H.; Hashikura, N.; Takahashi, S.; Xiao, J.-Z.; Abe, F.; Osawa, R. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: A cross-sectional study. *BMC Microbiol.* 2016, 16, 1–12.
 8. Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K. S.; Manichanh, C.; Nielsen, T.; Pons, N.; Levenez, F.; Yamada, T.; et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010, 464(7285), 59–65.
 9. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012, 486(7402), 207–214.
 10. Hosomi, K.; Ohno, H.; Murakami, H.; Natsume-Kitatani, Y.; Tanisawa, K.; Hirata, S.; Suzuki, H.; Nagatake, T.; Nishino, T.; Mizuguchi, K.; et al. Method for preparing DNA from feces in guanidine thiocyanate solution affects 16S rRNA-based profiling of human microbiota diversity. *Sci. Rep.* 2017, 7, 1–10.
 11. Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Peña, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; et al. QIIME Allows Analysis of High-Throughput Community Sequencing data. *Nat. Methods* 2010, 7, 335–336.
 12. Mohsen, A.; Park, J.; Chen, Y.A.; Kawashima, H.; Mizuguchi, K. Impact of quality trimming on the efficiency of reads joining and diversity analysis of Illumina Paired-end reads in the context of QIIME1 and QIIME2 microbiome analysis frameworks. *BMC Bioinform.* 2019, 20, 581.
 13. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools. *Nucleic Acids Res.* 2012, 41, D590–D596.
 14. Bagarolli, R.A.; Tobar, N.; Oliveira, A.G.; Araújo, T.G.; Carvalho, B.M.; Rocha, G.Z.; Vecina, J.F.; Calisto, K.; Guadagnini, D.; Prada, P.O.; et al. Probiotics modulate gut microbiota and improve insulin sensitivity in DIO mice. *J. Nutr. Biochem.* 2017, 50, 16–25.
 15. Li, X.; Juntao, H.; Ning, G.; Xiaolan, L.; Ming, L.; Xiaokang, W.; Zeshi, L.; Yaofeng, J.; Jiali, L.; Jiru, X.; et al. Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia. *Sci. Rep.* 2017, 7.
 16. Park, J.-S.; Choi, J.W.; Jhun, J.; Kwon, J.Y.; Lee, B.-I.; Yang, C.W.; Park, S.-H.; Cho, M.-L. *Lactobacillus acidophilus* Improves Intestinal Inflammation in an Acute Colitis Mouse Model by Regulation of Th17 and Treg Cell Balance and Fibrosis Development *J. Med. Food* 2018, 21, 215–224.
 17. Bulik, C.M.; Sullivan, P.F.; Kendler, K.S. Genetic and environmental contributions to obesity and binge eating. *Int. J. Eat. Disord.* 2003, 33, 293–298.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsumoto Natsuko, Park Jonguk, Tomizawa Rie, Kawashima Hitoshi, Hosomi Koji, Mizuguchi Kenji, Honda Chika, Ozaki Ritsuko, Iwatani Yoshinori, Watanabe Mikio, Kunisawa Jun	4. 巻 57
2. 論文標題 Relationship between Nutrient Intake and Human Gut Microbiota in Monozygotic Twins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicina	6. 最初と最後の頁 275 ~ 275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/medicina57030275	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Rie Tomizawa, Jonguk Park, Koji Hosomi, Natsuko Matsumoto, Hitoshi Kawashima, Kenji Mizuguchi, Jun Kunisawa, Chika Honda	4. 巻 10
2. 論文標題 Relationship Between Human Gut Microbiota and Nutrition Intake in Hypertensive Discordant Monozygotic Twins.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hypertension: Open Access	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本夏子、本多智佳、大阪ツインリサーチグループ、富澤理恵
2. 発表標題 成人一卵性双生児を対象とした腸内細菌叢と健康習慣に関する研究
3. 学会等名 日本公衆衛生学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本夏子、富澤理恵、本多智佳、赤田加奈子、細見晃司、朴鐘旭、渡邊幹夫、岩谷良則、大阪ツインリサーチグループ、國澤純
2. 発表標題 成人一卵性双生児を対象とした腸内細菌叢と飲酒習慣に関する研究
3. 学会等名 日本臨床検査教育学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富澤理恵、松本夏子、本多智佳、赤田加奈子、細見晃司、朴鐘旭、夏目やよい、川島和、水口賢司、乾富士男、大阪大学ツインリサーチグループ、國澤純
2. 発表標題 —卵性双生児とマイクロバイオーム
3. 学会等名 日本双生児学会第32回学術講習会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	本多 智佳 (Honda Chika) (40625498)	滋賀医科大学・医学部・客員准教授 (14202)	
研究分担者	國澤 純 (Kunisawa Jun) (80376615)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 ワクチン・アジュバント研究センター・センター長 (84420)	
研究分担者	乾 富士男 (Inui Fujio) (80469551)	天理医療大学・医療学部・教授 (34606)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------