

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04125

研究課題名（和文）加齢性骨格筋減少症における腸内フローラ機能の役割

研究課題名（英文）Role of gut microbiota function on pathophysiology of sarcopenia

研究代表者

桑原 知巳（Kawahara, Tomomi）

香川大学・医学部・教授

研究者番号：60263810

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、60歳以上の高齢者32名について腸内フローラのメタゲノム解析、栄養摂取量分析を行い、骨格筋量と関連のある要因を調べた。その結果、骨格筋量と腸内フローラの菌組成パターンには違いが認められ、骨格筋量の少ない高齢者では、口腔内常在菌の占有割合が有意に高く、逆に骨格筋量の多い高齢者では、acetyl-CoA経路の機能アバUNDANCEが高く、緑黄色野菜の摂取量が多かった。これらのことから、腸内フローラ機能と栄養摂取の差が高齢者の骨格筋維持に関わる要因の一つであると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会を迎えた先進国では、健康寿命の延伸が喫緊の課題となっている。特に加齢性筋肉量減少症（サルコペニア）による活動性の低下を防ぐ手法の開発が求められている。サルコペニアの防止には栄養管理とレジスタンス運動が重要であるが、これら以外の有効な介入法は未だ確立されていない。本研究課題による骨格筋量と腸内フローラ機能や栄養摂取との関連性はサルコペニア予防の新たな介入点を示したという点で社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted the metagenomic analysis of gut microbiota and nutrient intake survey for 32 elderly persons aged over 60 years, and correlation of the data with skeletal muscle index (SMI) was evaluated. The abundance of microbes that are usually colonizing the oral and/or upper intestinal tract was higher in low SMI group than in high SMI group. Functional metagenomic analysis and nutrient intake survey indicated that acetyl-CoA pathway was abundant and green/yellow vegetable intake was higher in high SMI group, respectively. These results indicate that difference in gut microbiota function and nutrition intake influence on the skeletal muscle volume maintenance.

研究分野：腸内細菌学

キーワード：腸内細菌叢 加齢性骨格筋減少症 栄養摂取 メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

2018年度における日本の高齢化率は実に28.1%である。75歳以上の人口に占める割合は14.2%となり、今後も増加が予測されている。高齢社会における最も大きな問題は要介護人口の増加であり、社会保障費の増大に直結する。健康寿命の延伸は高齢社会が抱える様々な問題を解決するための最も重要な課題である。高齢者の身体機能低下の重要な兆候として“フレイル”と呼ばれる概念がある。フレイルは加齢に伴う生理機能の低下を示す概念であり、要介護状態に移行する最も大きな要因とされる。フレイルの身体的要素の主体は加齢性筋肉量減少症（サルコペニア）である。サルコペニアは筋肉量の低下による握力や歩行速度の低下などの機能的低下を含む概念である。サルコペニアの防止には栄養管理とレジスタンス運動が重要であるが、これら以外の有効な介入法は未だ確立されていない。高齢者の中には、70歳を過ぎてもマスターズ陸上大会に出場し、高い身体能力を維持している高齢者も存在する。2018年度開催のマスターズ陸上に参加した女性高齢者（以後、アスリート高齢者）と一般の高齢者（要介護状態ではないが、定期的な運動習慣なし）を比較したところ、筋肉量、運動機能（握力、歩行速度、立ち上がりテスト）とも有意にアスリート高齢者の方が高かった。また、腸内フローラの多様性を調べたところ、アスリート高齢者では一般高齢者に比較し、Firmucutes門とBacteroidetes門の比（F/B比）が有意に低く、両者の間には腸内フローラの違いがあることがわかってきた。ヒトの腸管には1,000種、100兆個にも及ぶ細菌が定着し、腸内フローラを形成している。腸内フローラは食物の消化、微量栄養素の供給、免疫賦活や種々の薬物代謝など、宿主にとって有益な生理活性を担っている。腸内フローラは非常に安定した生態系であるが、ストレス、偏食や加齢に伴いその構成や生理活性が変化する。この腸内フローラの破綻（dysbiosis）が、アレルギー、肥満、糖尿病、炎症性腸疾患、精神疾患などの発症リスクを高める（Cell Mol Life Sci., 2017）。腸内フローラの変化に起因する脂肪や筋肉組織での代謝異常や精神活動の低下は、高齢者のフレイルにおいて認められる生理機能異常の特徴と類似している（筋肉などのインスリン感受性組織でのアナボリックレジスタンスやミトコンドリア活性の低下）。①アスリート高齢者と一般高齢者で腸内フローラ機能に違いはあるのか、②違いがある場合にはどのような機能に違いがあるのか、また、③それらの機能は運動機能、筋肉量の維持や栄養摂取と関連するのか、これら3点を明らかにすることにより、新たなサルコペニア予防策の開発が期待されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は60歳以上のアスリート高齢者と一般高齢者を対象として腸内フローラの機能プロファイリング（“機能的エンテロタイプング”）を行い、機能的エンテロタイプと運動機能や筋肉量との関連性を調べることによってサルコペニアに関連する腸内フローラ機能を同定することである。一般高齢者の中にも運動機能や筋肉量を維持している被験者も含まれることが予想され、腸内フローラ機能と運動機能との相関性を見出すためにはスポーツ医学の専門家による運動能力や筋肉量の解析が必要となる。また、栄養摂取量は筋肉量の維持にとって重要な要因であり、腸内フローラ組成にも大きな影響を与える。そのため、被験者の食事内容の分析も本研究を遂行する上で必須である。そこで本研究では、スポーツ医学およびスポーツ栄養学を専門とする研究分担者（世良、刑部）の協力のもと、多面的な解析により腸内フローラ機能と高齢者の運動機能および筋肉量維持との関連性に迫る。本研究のコアをなす腸内フローラ機能の評価には、従来型の16S rRNA遺伝子を標的とした解析（メタ16S解析）では対応できない。また、メタ16S解析では菌種ごとの16S rRNA遺伝子のコピー数の違いやPCRバイアスによる影響のため、不正確な菌組成データにもとづく誤った結論を導く危険性が高い。一方、ショットガンメタゲノム解析ではPCRバイアスのリスクはなく、機能面での情報も得ることができる。また、真正細菌におけるリボソームタンパク質の遺伝子数は全て52個と一定であるため、リボソームタンパク質遺伝子にヒットするリード数をカウントすることで正確な菌組成の把握も可能である。運動機能や筋肉量の異なる高齢者の腸内メタゲノム解析を行い、リボソームタンパク質による正確な菌組成と代謝機能を比較することでサルコペニア予防に有用な腸内フローラ機能の同定を目指す。膨大な数のメタゲノム配列を用いて腸内フローラ機能を比較するためには、効率良く代謝機能の変動を捉えるツールが必要となる。研究分担者の高見は、メタゲノム配列を用いて代謝機能を比較できるMAPLE (Metabolic and Physiological Potential Evaluator, BMC Genomics 13:669, 2012)を世界に先駆けて開発し、自ら様々な微生物生態系へ適用することによりその潜在的代謝能力を明らかにしている。MAPLEはKEGGデータベースに登録された機能module（代謝パスウェイから切り出された合成、分解、輸送機能などに関連する730の個別反応経路）にメタゲノム配列をmappingし、各moduleの充足率やabundance（mappingされるread数）を算出することによりサンプル間での代謝機能の変動を評価するシステムである。本システムでは730にも及ぶ機能moduleに関する変数が一括して得られるため、従来型のメタゲノム解析では不可能であった詳細な機能プロファイリングが行える。この評価システムを高齢者の糞便サンプルに適用すれば、高齢者の運動機能維持に必要な腸内フローラパターンや代謝機能を網羅的に同定できる可能性が高い。MAPLEによる解析には良質の長いDNA配列の取得が必要であ

るが、研究分担者の豊田は次世代シーケンス技術に精通しており、微生物から哺乳類に至るまであらゆる生物のゲノム解析に多大な実績を持つ。本研究計画はこれら研究分担者が参画することで初めて実現できる新たな取り組みであり、抗加齢を主眼とした腸内フローラ研究において他の追随を許さない独自性の高いものである。本研究はサルコペニアやフレイルの早期検出および予防に機能的エンテロタイプという新たな概念をもたらし、医薬品やサプリメント開発に多大な情報を提供するとともに、現在の高齢化社会が抱える諸問題を解決する糸口を見出すことを主たる研究目的としている。

3. 研究の方法

本研究では加齢に伴う運動機能および筋肉量の低下に腸内フローラ機能がどのように関与するのかを以下の検討により明らかにする。

(1) 高齢者腸内フローラの機能的エンテロタイピング (桑原、今大路、豊田、高見)

本研究では70歳以上の高齢者100名（マスターズ陸上参加者50名と一般高齢者50名）を対象とする。男女比は可能な限り1:1とする。70歳以上の被験者より提供を受けた便検体からDNAを精製する（桑原、今大路）。DNA精製前の便懸濁液の一部を用いてDAPI染色を行い、菌密度を測定する。DNAは一定量の便検体から抽出し、抽出後はDNA量を測定する。これらのデータは腸内フローラのバイオマスの把握に必須である。メタゲノム配列の取得は、国立遺伝学研究所にて行い、各サンプルから良質な300万リードを抽出する（豊田）。リボソームタンパク質の出現頻度から正確な菌種組成を算出し、MAPLEを用いて代謝ポテンシャルを比較する（高見）。MAPLEでは図2に示すように各サンプル間でのmoduleの充足率やabundanceの違いを明確に捉えることができる。これらの数値をデータセットとして主座標分析や階層的クラスタリング解析により機能的エンテロタイピングを行う（桑原、今大路）。

(2) 高齢者の運動機能および骨格筋量測定 (世良)

サルコペニア診療ガイドライン2017では、握力低下（男性26 kg未満、女性18 kg未満）または歩行速度低下（0.8 m/秒）のいずれかを認めた場合、生体電気インピーダンス法による骨格筋量測定（skeletal muscle mass index: SIM）を行い、筋量低下（SIMが男性7.0 kg/m²、女性5.7 kg/m²未満）が認められた場合にサルコペニアの診断となる。米国における検討では、健康若年成人筋量平均値の2SD以下の割合は65-70歳で20%、80歳以上では50%以上で認められるとされており、対象の100名中には筋量低下を認める被験者が相当数含まれることが期待される。検体採取時に被験者すべてに上記3項目の測定を行い、多次元尺度法（MDS）やPERMANOVAにより運動機能や筋肉量と関連する機能的エンテロタイプを同定する。

(3) 機能的エンテロタイプ、運動機能、筋肉量、栄養素等摂取量の相関解析 (刑部)

被験者に対し、Food Frequency Questionnaire Based on Food Groups (FFQg ver.5)を用いた食事調査を行う。FFQgは数十から百数十項目の食品の摂取頻度や摂取量に関するデータを収集するアンケート調査であり、栄養疫学研究に汎用される。機能的エンテロタイプに関連する栄養素や食品群をMDSやPERMANOVAにより同定する。(1)から(3)の解析により、機能的エンテロタイプ、運動機能、筋肉量、摂取栄養素および食品群の間の相関関係を明らかにする。

(4) 便中代謝産物の解析 (桑原、川崎)

腸内フローラは宿主の栄養吸収に密接に関連しており、その機能変動は宿主の代謝に大きな影響を及ぼす。また、腸内フローラが産生する短鎖脂肪酸は肝臓、筋肉、脂肪組織などでのエネルギー代謝に利用される。高齢者間での腸内フローラの代謝機能の差異を調べるため、被験者より採取した便検体中の短鎖脂肪酸、残存カロリー、アミノ酸、炭水化物、脂質を定量する。また、これらの測定値から被験者間での腸管からの栄養素吸収能を評価する。これらの定量値と機能的エンテロタイプとの関連性を明らかにする。

4. 研究成果

本研究では、マスターズ陸上競技に参加した60歳以上の高齢者32名を対照に、骨格筋量測定、栄養調査、腸内フローラのメタゲノム解析を行った。本研究の実施については、予め香川大学研究倫理審査委員会による研究計画の審査を受け、承認を得ている。被験者には、研究の目的を説明し、インフォームドコンセントが得られた高齢者を解析対象とした。以下、項目別に結果を記載する。

(1) 高齢者の骨格量 (SMI 値) による群別

生体電気インピーダンス法による骨格筋量測定 (skeletal muscle mass index: SIM) を行い、以下の3つのカテゴリーに分類した。

(男性)

High group: SMI 7.7 以上、Middle: SMI 7.0-7.6、Low: SMI 7.0 未満

(女性)

High group: SMI 6.5 以上、Middle: SMI 5.7-6.4、Low: SMI 5.7 未満

(2) 高齢者の腸内フローラの16Sメタゲノム解析

被験者より便検体の提供を受け、DNAを抽出後、次世代シーケンサーによる16Sメタゲノム解析を行なった (図1)。その結果、菌叢の多様性指数に有意な変化は検出されなかったが、主座標分析による菌組成パターン解析では SMI 値の違いによる変化が認められ、多変量分散分析

(PERMANOVA) で有意な差が検出された ($p=0.0304$)。各群に特徴的な占有率を示す腸内細菌群を抽出するため、線形判別分析 (LeSfe) を行なった。その結果、SMI 低値のグループでは、Actinobacteria や Streptococcaceae などの口腔細菌の占有率が高く、SMI 高値のグループでは Dolichum の占有率が有意に高い所見が得られた (図2)。

(3) 便中短鎖脂肪酸定量

被験者より提供を受けた便検体中の 10 種類の短鎖脂肪酸を定量した。その結果、SMI 値による比較群間で有意な差は認めなかったが、SMI 低値グループにおいて succinic acid が高い傾向が認められた (図3)。

(4) 栄養摂取調査

FFQg による栄養摂取状況調査を分析した (図4)。被験者より提供を受けた便検体中の 10 種類の短鎖脂肪酸を定量した。6 栄養素による比較では、SMI 値による比較群間で有意な差を認めたのは、緑黄色野菜の摂取量であり、SMI 低値グループで有意に摂取量が低かった。また、有意差はないものの、魚類・肉類・卵・豆の摂取量も低い傾向にあり、脂肪・油の摂取量が多い傾向が認められた。

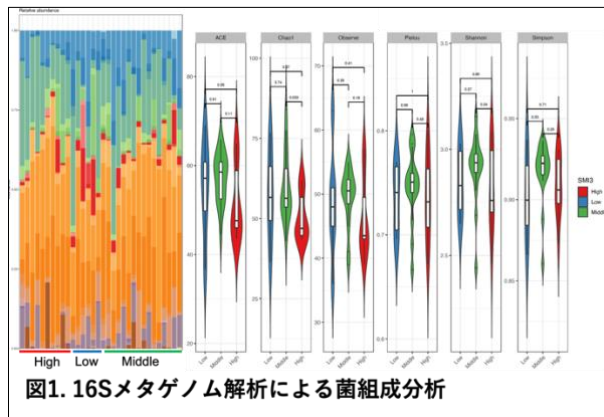


図1. 16Sメタゲノム解析による菌組成分析

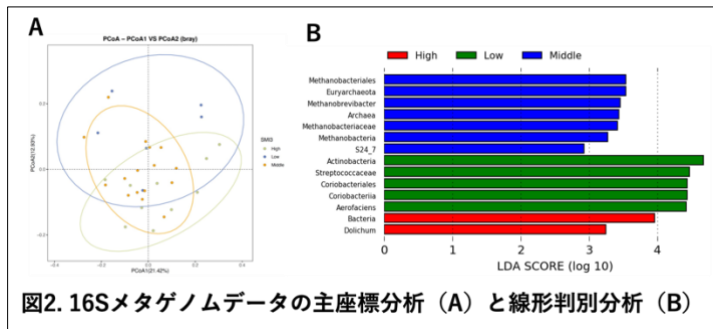


図2. 16Sメタゲノムデータの主座標分析 (A) と線形判別分析 (B)

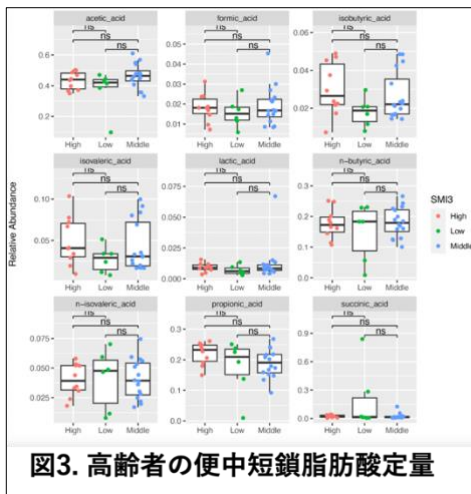


図3. 高齢者の便中短鎖脂肪酸定量

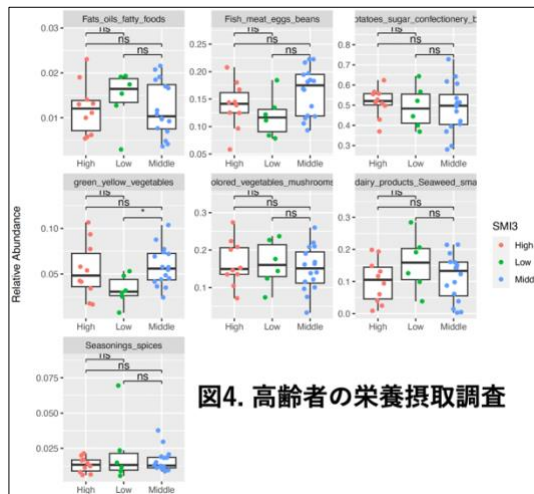


図4. 高齢者の栄養摂取調査

(5) 高齢者の腸内フローラの 16S メタゲノム解析

被験者より便検体の提供を受け、DNA を抽出後、次世代シーケンサーによるメタゲノム解析を行なった (図5)。1 検体あたり良質な 100 万リードを解析に供した。MAPLE による機能モジュールのアバundance比較の結果、SMI 高値グループでは炭酸固定に関わる acetyl-CoA 経路のアバundanceが有意に高かった。

以上の結果から、運動機能を維持した高齢者においても、骨格筋量の違いによる腸内フローラ機能や栄養摂取に違いが検出できた。これらの違いが骨格筋の維持にどのように関与しているのかを分子レベルで明らかにすることにより、加齢性骨格筋減少症 (サルコペニア) の予防に有効な介入法の開発が期待できる。

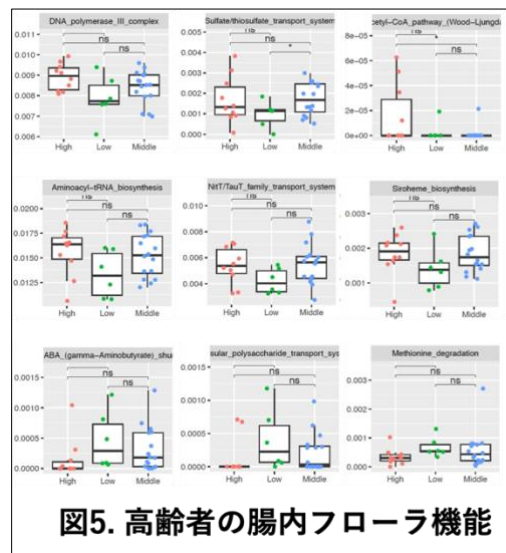


図5. 高齢者の腸内フローラ機能

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 Kajitani Rei, Noguchi Hideki, Gotoh Yasuhiro, Ogura Yoshitoshi, Yoshimura Dai, Okuno Miki, Toyoda Atsushi, Kuwahara Tomomi, Hayashi Tetsuya, Itoh Takehiko	4. 巻 49
2. 論文標題 MetaPlatanus: a metagenome assembler that combines long-range sequence links and species-specific features	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e130 ~ e130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab831	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 Fujii Takayuki, Nakayama-Imaohji Haruyuki, Tanaka Aya, Katami Hiroto, Tanaka Kazuya, Chiba Yoichi, Kawauchi Machi, Ueno Masaki, Kuwahara Tomomi, Shimono Ryuichi	4. 巻 38
2. 論文標題 Partially hydrolyzed guar gum alleviates hepatic steatosis and alters specific gut microbiota in a murine liver injury model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1759 ~ 1768
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-022-05221-z	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今大路治之、豊田敦、高見英人、田中彩、下野隆一、桑原知巳
2. 発表標題 乳幼児腸内フローラの再構成プロセスにおける代謝機能変動
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木基生、泉水亜紀子、上田麻実、富士川凜太郎、桑原知巳、鈴木啓太
2. 発表標題 高齢者において運動習慣が腸内細菌叢に及ぼす影響
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会
4. 発表年 2020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	豊田 敦 (Toyoda Atsushi) (10267495)	国立遺伝学研究所・ゲノム・進化研究系・特任教授 (63801)	
研究分担者	刑部 有希 (杉島有希) (Osakabe Yuuki) (10584948)	至学館大学・健康科学部・准教授 (33909)	
研究分担者	世良 泰 (Sera Yasushi) (20819643)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	
研究分担者	川崎 浄教 (Kawasaki Kiyonori) (30739206)	香川大学・農学部・准教授 (16201)	
研究分担者	高見 英人 (Takami Hideto) (70359165)	東京大学・大気海洋研究所・特任研究員 (12601)	
研究分担者	今大路 治之(中山治之) (Imaohji Haruyuki) (80294669)	香川大学・医学部・講師 (16201)	

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
---------	---------