

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H01827

研究課題名(和文) 骨格筋機能とサルコペニアに関連する消化管マイクロビオームの基盤研究

研究課題名(英文) Association of microbiome profile with skeletal muscle function

研究代表者

永富 良一 (Nagatomi, Ryoichi)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：20208028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 24,100,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌叢と骨格筋機能(筋力および筋量)との関連を示すマウスモデル確立のために、抗生物質除菌マウスを作出し、カルディオトキシンによる筋損傷からの回復過程の遅延を仮説として検証を試みたが、先行のパイロット研究の結果を再現できずに至った。一方、既存コホート研究参加者の職場検診受診時の微生物叢メタゲノム解析および生活習慣解析から握力と関連する要因を探索した。トマト摂取頻度が高い方が3年間の握力低下量が小さいことを明らかにした。糞便はマウスモデルが確立されないため口腔内微生物叢の採取方法と解析のパイプライン化を試み歯ブラシ液の有用性を明らかにしたが、握力と関連するメタゲノム要因は特定できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯ブラシから得られる微生物叢は主仮説の筋力との関連は見られなかったが最も多様性が高く、今後微生物解析に有用であることを示した。一方、多様な食事要因の中からトマトおよび関連食品摂取頻度が高い方が握力の低下量が少ないことから、トマト摂取が筋力低下、サルコペニアに対して保護的に働くことも介入研究等で確認すれば、生活習慣改善策の一つとして利用できる可能性が高い。またそのメカニズムの追求は加齢にともなう筋力低下を防ぐさらなる対策をたてるためにも有用である。

研究成果の概要(英文)：In order to establish an animal model to elucidate the contribution of gut microbiome to skeletal muscle function and muscle mass, we examined the effect of microbial removal by antibiotics on the recovery process of skeletal muscle injury induced by the injection of cardiotoxin. Contrary to our expectation based on a previous pilot study, neither muscle mass, histological integration, nor MR imaging all failed to show any delay or deterioration in the recovery process from the damage. In a concurrent attempt to find factors associated with skeletal muscle strength decline, microbial samples from oral cavity and stool were analyzed. We established an analytical pipeline for the metagenomic analysis for oral metagenome. Among samples from different site from the oral cavity, tooth brush attached microbiome was shown to be useful, but we found no association with the grip strength. Instead, we found high tomato product consumption was protective against the grip strength decline.

研究分野：体力科学

キーワード：食品摂取頻度 トマト 歯ブラシ 口腔内メタゲノム 筋力低下 サルコペニア

1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは骨格筋量が減少し筋力が低下する状態であり、運動トレーニング効果の減弱とともに要介護に直結する重要な危険因子である。我が国は世界一の超高齢国であり介護関連支出は増大の一途をたどり国家財政を圧迫している。われわれは高齢者コホート研究において身体活動量が多くても筋力に依存する体力が低いと医療費支出が高いことを報告している (Yang G et al, 2011 *Geriatr Gerontol Int*)。したがってサルコペニアの予防・改善を図ることは国家的な重要課題である。本課題は以下の3つの点から着想した。

(1) 骨格筋維持に関連する生活習慣要因： 身体活動量の維持や増加、不活動時間の短縮や筋力トレーニングはサルコペニアの予防や改善に一定の効果がみられ介護予防事業に取り入れられているが、その効果は限定的である(曾根ら, 2013日本衛生学雑誌.68:11-21)。われわれは高齢者のコホート研究(仙台鶴ヶ谷研究)および職域コホート研究(仙台卸商研究. 門間ら, 2013運動疫学研究)において筋力(下肢伸展筋力と握力)および筋力に依存する傷病に関連する生活習慣要因およびバイオマーカーの分析を行ってきた。

体力・運動能力に対する食事因子： 仙台鶴ヶ谷研究において6年間の追跡期間中タンパク質摂取の多寡に関わらず野菜中心の食事パターン者で転倒骨折者が多く、肉中心の食事パターン者では少なかった(Monma et al, 2010 *BMC Geriatr*)。他のコホート研究においても高齢者の健康寿命延伸に対する動物性タンパク摂取の重要性が指摘されている。

心疾患リスク軽減因子アディポネクチンは筋力維持増強に対して負に作用する： 脂肪細胞分泌因子アディポネクチンは虚血性心疾患の抑制因子であるが、仙台鶴ヶ谷研究の7年間の追跡ではアディポネクチン濃度高値の方が要介護状態発生リスクが高く、運動機能低下がその要因であった(Hozawa et al. 2011 *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*)。仙台卸商研究では中年者でもアディポネクチン高値者は筋力が低かった (Huang et al. 2013 *BMC Musculoskeletal Disord*)。これは先行研究における高齢者のアディポネクチン高値と速筋タイプ筋線維の減少と一致している (Ingelsson et al. *J Clin Endocrinol Metab* 2009.94:953e7)。さらに仙台卸商研究ではアディポネクチン濃度はタンパク質摂取量に関わらず低脂肪乳製品の摂取頻度と相関していた (Niu et al. 2013. *Eur J Nutr*)。

このようにわれわれは栄養素に依存しない食事因子と筋力の関連を明らかにしてきたが、栄養素との関連がみられないため、なぜ筋力と関連するのか生物学的な説明ができなかった。

(2) 健康に対するマイクロビオームの重要性： 一方、近年次世代 DNA シークエンサーが微生物解析に利用できるようになった結果、人間の体内外の微生物叢(マイクロビオーム)の健康や疾病への影響を解明する研究が急速に進展している。米国 NIH では 2008 年から 5 年間増額 1.15 億ドルを費やして 200 名の健康人の体内外 18 カ所のマイクロビオームの解析を行った(Human Microbiome Project:HMP)。肥満者と適正体重者の便マイクロビオームは前者でフィルミクテス/バクテロイデス(F/B)比が大きく後者では小さく、F/B 比は BMI と高い相関を示した(Verdam et al. 2013 *Obesity* doi:10.1002/oby.2046)。肥満者の便をマウスに移植するとわずか 2 週間で体重が増加し、適正体重者の便を移植すると肥満マウスの体重も正常化することが明らかになり (Ridaura et al. 2013 *Science* 341, DOI: 10.1126/science.1241214)、やはりバクテロイデス優位がマウスの体重適正化に関与していることが報告されている。フィルミクテス門は善玉菌ビフィドバクテリア属やラクトパチルス属、悪玉菌クロストリジウム属両方を含んでいる。このように現在急速に進んでいるマイクロビオーム研究にはこれまでの善玉菌悪玉菌の常識を覆す新たなマイクロビオームの発見とそのメカニズム解明が期待されている。しかし NIH の HMP プ

ロジェクトは肥満や代謝疾患や炎症・免疫系を主要なターゲットとしておりマイクロビームとサルコペニアの関係については未解明である。上述したわれわれの疫学研究成果はサルコペニアあるいは骨格筋機能の維持に関連するキーがマイクロビームにあることを強く示唆している。しかも肥満や代謝性疾患とは異なるマイクロビームの寄与が見出される可能性が高い。

(3) 腸内マイクロビームがサルコペニアに関与するメカニズムを解明するための動物モデル：筋力トレーニングや慣れない運動を実施した後に起こる筋損傷からの回復は筋量や筋力の重要な決定因子であり、高齢者では回復が遅延することが知られている。われわれはマウスの蛇毒筋損傷モデルを用いて損傷からの回復に寄与する因子を探索している。例えば、ロイヤルゼリーは高齢マウスの筋量増加に寄与する(Niu et al. 2013 J Gerontol A Biol Sci Med Sci (ePub))。さらに抗生剤投与により腸内細菌を除去したマウスは損傷からの回復が著しく遅延し回復不全に陥ることを報告している(Nagatomi, 第13回国際運動免疫学会 ISEI, Newcastle, Australia, 2013.9.10)。このマウス筋損傷モデルを骨格筋維持・増強に寄与する腸内マイクロビームのメカニズム解明の基盤になる動物モデルとして直ちに利用できる可能性がある。

2. 研究の目的

サルコペニアに関連する口腔内あるいは便マイクロビームの特徴を明らかにし、そのメカニズムを解明するための動物モデルを確立すること。

3. 研究の方法

(1) 口腔内および便サンプル採取方法標準化のためのマイクロビームの安定性・不安定性に関与する日常生活要因の検討：歯磨きの方法や頻度、間食や深夜食などマイクロビームの安定性に関わる日常生活要因の影響を、反復採取、要因の介入試験により検討し、試料採取方法の標準化をはかる。また口腔内および便マイクロビームの関連性の解析も行う。

(2) 筋力あるいは筋力低下危険因子と関連するヒト口腔内および便マイクロビームの解析：仙台卸商コホート研究において、2015年度下半期および2016年度の定期健診時にインフォームドコンセントを得られた参加者から、(1)で得られた知見に基づく標準化された方法に基づき歯垢および便サンプルを採取し、次世代シーケンサーを用いた16S-ribosome RNA解析によりマイクロビームの門/綱/目/科/属レベルの系統解析を行い、同時に測定する握力と関連するマイクロビームプロフィールを明らかにするとともに、コホートベースラインで測定された筋力および筋力低下危険因子であるバイオマーカー・アディポネクチンなどとの関連を解析する。

(3) 便マイクロビームがサルコペニアに関与するメカニズムを解明するための動物モデルの確立：2015年度には蛇毒によるマウス筋損傷モデルを利用し、便マイクロビームがどのように筋力と関連するのかを解明するための基盤動物モデルを確立する。すでにパイロット研究から筋損傷からの回復が遅延することが示されている抗生剤除菌マウスを用いて、損傷回復過程遅延に関連する血中・筋中サイトカイン・成長因子のプロフィールを明らかにする。続いて異なる抗菌スペクトルを持つ抗生剤の投与を行い筋損傷回復過程遅延に関連する抗菌スペクトルを持つ抗生剤と、そのときの便マイクロビーム(次世代シーケンサー)のプロフィールの解析を行う。2016年度以降には、除菌マウスに低筋力あるいは高筋力のヒト便試料を移植し、筋損傷回復課程への影響を評価するモデルを確立する。

4. 研究成果

(1) 平成27年度はまず唾液や糞便の保管条件およびDNA抽出手法についての比較検討を行

った。引き続き最適と判断された手法により平成27年7月から平成28年3月の間に協同組合仙台卸商センター組合員の定期職場健診時に同意が得られた263名より糞便、歯垢・唾液サンプルを得るとともに、握力測定、アンケート調査から得られた社会人口学的特性、生活習慣、過敏性腸症候群、抑うつ傾向と健康状態、および健康診断項目の生活習慣病（肥満、高血圧、糖尿病、脂質異常症、高尿酸血症）に関する情報を収集した。糞便サンプルはトイレットペーパーに付着した糞便を採取する「トイレットペーパー - スワブ採取法」を、歯垢・唾液サンプルは歯磨き後の歯ブラシを生理食塩水に浸し、それを検体とする「ハブラシ - 生理食塩水懸濁法」による採取手法を採用した。得られた検体はただちに-80度で保存を行った。また口腔検体の解析技術の確立を行った。DNA抽出、マーカー遺伝子配列(16S rRNA V4領域部分配列)のPCR増幅、イルミナ社MiSeqによるDNA配列決定のワークフローを確立した。得られた情報のドライ部分の解析パイプラインを確立した。解析パイプラインではHOMD(human oral microbiome database)の参照配列を利用し、必要なデータ処理スクリプトの開発と実装を行った。確立された解析方法にしたがって収集したサンプルの分析を開始した。また糞便からのDNA抽出方法の文献的検討、また市販キットのトライアル製品を利用したワークフローの検討を行った。糞便からのDNA抽出を行う環境の整備を行った。

(2) 平成28年度は、前年度と同様に、生活習慣、握力、生化学情報に加え、口腔、糞便等の生体試料を収集した。協同組合仙台卸商センターの組合員2126名に調査資料を配布し、578名の対象者から研究参加への同意を得た（参加率は約27.2%）。このうち、前年度参加者は133名であり、生活習慣、握力と口腔内細菌に関する項目に欠損がある4人を除外した結果、追跡できる分析対象者は129名であった。

前年度すでに収集した検体のうち、パイプラインが確立している唾液と本研究で採用した歯ブラシ液の検体についてシーケンス解析を行った。その結果、歯ブラシ液は、採取が簡便であるだけでなく、より多くの細菌叢が含まれ情報量が多いことがわかった(投稿準備中)。勤労者222名を対象にした口腔内細菌と握力、生活週間、健康状態との関連を分析した。多変量線型回帰分析により（年齢と性別調整済）、握力と負の関連を示すいくつかの菌種が認められた。さらに、その他の生活習慣や健康状態との関連性を検討した結果、口腔内細菌叢と喫煙習慣、飲酒習慣、花粉症、鬱指標等との間の関連の示唆された(投稿準備中)。また本研究のベースになっている仙台卸商研究の3年間の追跡データにより握力の低下に関連する生活習慣要因の検討を行ったところ、トマトおよび関連食品の摂取頻度が高い群では、低い群に比べて握力の低下が小さくなり、トマトおよび関連食品が筋力低下に対して保護的に働くことが示唆された（雑誌論文）。

(3) 平成29年度は、前年度までに得られたデータの統計解析と唾液・歯ブラシ液・糞便検体のアンプリコン解析の継続を行った。まず、口腔内細菌叢のプロファイルから喫煙習慣者の推定ができる可能性が明らかになった（投稿準備中）。また、歯磨き時間と口腔内細菌叢について検討した結果、歯磨き時間の長短による細菌叢変化は、個人の識別能に影響を与えないということがわかった(投稿準備中)。さらに、糞便のDNA抽出方法について検討を行い、迅速にDNA抽出が行えるようになり、より効率的に解析ができるようになった。しかし現在までにメインアウトカムとして期待されていた握力に関連する細菌叢プロファイルは特定できておらず、除菌マウスへの糞便移植を行うことができなかった。

一方、従来のマウスを用いた筋損傷回復過程のモニタリングは安楽死後の動物からの抽出

筋の重量および組織学的な検討に依存していた。したがって同一個体の筋損傷の回復過程の追跡は血中の組織損傷に関わるサイトカインなどのメディエーターが中心であった。これは損傷そのものの定量性に欠けると共に、これらのマーカーの正常化をもって回復とするだけであり、回復そのもののモニタリングができていなかった。そこで、同一個体の筋損傷からの回復過程を追跡するために、蛇毒カルディオトキシンの筋組織内注入による筋損傷誘導後、経時的にMRI撮影を行うことにより筋損傷からの回復過程を追跡した。カルディオトキシン注入の方法によるバラツキが起こることが明らかになるとともに、MRI上の変化は時間経過とともに改善していくが、2週間にわたり観察することが可能となった。既存の報告にある組織学的な回復過程と同様に2週間でほぼイメージ上の変化が消失することが明らかになった。またカルディオトキシン注入部位の評価を同日内に行うことができ、筋損傷モデルの質の大幅な改善ができることを明らかにした(学会発表)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Ren Z., Huang C., Momma H., Cui Y., Niu K., Sugiyama S., Nanno M., and Nagatomi R. High Tomato and Tomato Product Consumption is Protective Against the Decline in Handgrip Strength Among Japanese Adults: The Oroshisho Study. *J Epidemiol* 28: 397-403, 2018.

(査読あり)

〔学会発表〕(計1件)

Nunomiya, A, Osana, S., Takada, H. and Nagatomi R. Is muscle damage affected by gut bacterial elimination- a MRI study. European College of Sports Science. 2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：坪井 明人

ローマ字氏名： Tsuboi Akito

所属研究機関名：東北大学

部局名：東北メディカルメガバンク機構

職名：教授

研究者番号(8桁): 00241646

研究分担者氏名：長崎 正朗

ローマ字氏名： Nagasaki Masao

所属研究機関名：東北大学

部局名：東北メディカルメガバンク機構

職名：教授

研究者番号(8桁): 90396862

(2)研究協力者

研究協力者氏名：布宮 亜樹
ローマ字氏名： Nunomiya Aki

研究協力者氏名：長名 シオン
ローマ字氏名： Osana Shion

研究協力者氏名：任 重宇
ローマ字氏名： Zhou Ren

研究協力者氏名：門間 陽樹
ローマ字氏名： Momma Haruki

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。