

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10173

研究課題名(和文) 早産児の腸管マイクロバイオーームと網羅的遺伝子発現の解析及び母体腔細菌叢移植の検討

研究課題名(英文) intestinal microbiome of premature newborn

研究代表者

垣内 五月(KAKIUCHI, SATSUKI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20447395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：胎児は子宮内では無菌に近い状態で生存しており、出生後の腸管マイクロバイオーームの確立過程には不明な点が多い。今回新生児の腸管マイクロバイオーーム解析により、胎便はほぼ無菌に近いが分娩様式に依存した違いがあること、生後は多様性を増しながら菌叢が変化していくが分娩様式による違いが続くこと、が示された。フローサイトメトリー解析では、制御性T細胞が生後早期の日齢で大きく変化することが示され、分娩様式による遺伝子発現に違いがあることが示された。腸管マイクロバイオーームと宿主の健康維持および疾病発症とのかわりの機序の多くはいまだ不明であるが、今回の研究結果はこれを解明する一助となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の解析により、分娩様式が生後の新生児の腸管細菌叢形成に影響を与えることが示された。また、免疫担当細胞が生後どのように変化していくかはこれまでデータがなかったが、今回の解析で急激な変化が起こっていることも示され、この変化に分娩様式が影響することもわかり、これは新しい知見である。新生児の腸管マイクロバイオーームの形成過程や、マイクロバイオーームと宿主の健康維持や疾病発症とのかわりについてはいまだ不明な点が多いが、これを解明するうえで一助となる研究が施行できた。

研究成果の概要(英文)：Fetuses are almost aseptic in the uterine environment. There are many things to be clarified about how microbiomes are formed in neonates after birth and how the microbiome formation interacts with the hosts' health. Our current research revealed several important findings on this issue. First, although meconium taken just after birth is almost aseptic, there are subtle differences in the intestinal bacterial flora depending on the modes of delivery. Second, the intestinal bacterial flora changes after birth with increasing diversity and the difference due to the modes of delivery is maintained to one month after delivery. Third, flow cytometric analysis showed that the proportion of the regulatory T cells changes drastically after birth and the gene expression of the immune cells is different depending on the modes of delivery. These data would have an important role in the future research on the microbiome and immune systems of the fetuses and the newborn.

研究分野：新生児医学

キーワード：マイクロバイオーーム 新生児

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトは皮膚、粘膜胃、消化管などに豊富な微生物と共存していて、これらマイクロバイームは宿主の健康維持および疾病発生と大きなかかわりがあることが知られるようになってきていた。いっぽう、子宮内で胎児はほぼ無菌に近い状態で存在しているため、生後どのように細菌叢が形成されていくか、これがどのように健康形成や疾病発生にかかわっていくかに注目が大いに集まっていた。とくに分娩様式による相違や生後の経時的変化についての日本人におけるデータがほとんどなく、その解明が待たれていた。さらに、マイクロバイームと呼応する宿主免疫についてはさらに未解明の部分が多い。

2. 研究の目的

分娩形式の違いに応じた、

A. 新生児早期の便検体による腸内細菌層の変遷

B. 新生児早期の血液の免疫細胞組成の変遷と免疫関連遺伝子の変化の探索について解明すること。

3. 研究の方法

研究は、特に大きな合併症のない日本人母および、満期産で生まれた新生児を対象とし、2018.01.01 から 1 年間リクルートした結果、47 母子組から同意を得ることができた。

A. 便検体に関して、47 組の母子から、計 187 検体のサンプルを得ることができた。便検体の採取、保存、DNA 抽出に関しては、2017 年度中の予備実験で最適化した方法にて行った。2018 年 12 月より、長期冷凍保存しておいたこれらのサンプルについて DNA 抽出を開始し、187 検体すべてが Quality check も含めて 2019 年 1 月中に終了、2019 年 2 月にこれらの検体をもとに 16S amplification protocol を行い、目的とする V1-V2 の領域を PCR で増幅した。マニュアルに基づいてこれらの増幅産物に index を付与し、ライブラリを作成したものを、2019 年 2 月末に、Miseq によるシーケンシングを依頼した。2019 年度に入り、この raw data が納品され、Linux 上で QIIME を動かし、腸内細菌層の解析を行った。

B. 47 人のうち、計 43 人の新生児から計 59 検体の血液を得ることができた。それぞれの血液は、単核球分離 MofloXDP による analyze&sorting RNeasy Micro kit による RNA 抽出 Bioanalyzer2100 による Quality check を経て、計 190 検体の免疫担当細胞由来 RNA を得ることができた (Treg 31 検体、NK 細胞 30 検体、B cell 43 検体、CD8T 43 検体、CD4T 43 検体)。これらのうち、Treg31 検体、CD8T 32 検体、CD4T 31 検体を Novaseq による RNAseq を行い、血液検体のフローサイトメトリーでの免疫細胞組成の結果とともに、Linux や、R を用いて解析した。

4. 研究成果

A. 胎便、生後便、成人便における主要な菌叢を得ることができた。D5 の便では主要な菌種として Family レベルで 6 種が挙げられ、d5 1m 母と 多様性を増しながら、ダイナミックに菌叢が変化すること、また、分娩様式による違い (経膈分娩児で Bacteroidetes が明らかに多い、など) が再確認された。日齢 4 と日齢 5 ではほとんど差は見られなかった。胎便と本研究で呼んでいる検体中は他の時期の検体に比べてほぼ無菌に近い検体であったが、分娩様式に関連した細菌叢のわずかな違いが見られた。しかし、その採取方法から肛門周辺皮膚の細菌叢の混入の可能性が否定できていないのが問題である。

B. 免疫細胞組成に関して、出生早期の日齢による変化が明らかになった (特に制御性 T 細胞と呼ばれる分画は日齢 4 と日齢 5 のわずか 1 日の違いでも非常に異なる) のに対し、分娩様式による差は非常にわずかであった。CD4T 細胞の RNAseq による結果も同様であった。CD4T 細胞の日齢による遺伝子変化は、CD4T 細胞中の Treg 分画の比率の変化によるところが非常に大きかったので、全検体の CD4T 遺伝子発現を Treg 分画の比率によって補正したところ、分娩様式による遺伝子発現のわずかな違いをパスウェイレベルで見出すことができた。具体的には、経膈分娩児で PI3K-Akt を含めた各種パスウェイが相対的に活性化しており、帝王切開児では抑制系パスウェイである PTEN パスウェイが相対的に活性化しているなど、全体としては相対的に抑制されていることが示唆された。

これらの遺伝子発現の違いは CD4T 細胞のみで見られ、同時に sort された CD8T 細胞では検出されなかった。(なお、Bcell, NK 細胞についての data は現時点で解析中である)

今回の研究で得られた結果を統合して一つの結論とすることは現段階では困難だが、新生児のマイクロバイーム獲得過程やその分娩様式による相違、さらに、胎児新生児の免疫成熟にかかわる豊富な新規情報が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	高橋 尚人 (Takahashi Naoto)		
研究協力者	伊藤 淳 (Ito Atsuh)		