

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17028

研究課題名（和文）アルツハイマー病における腸内細菌叢およびウイルス叢の網羅的メタゲノム解析

研究課題名（英文）Comprehensive metagenomic analysis of intestinal bacterial and viral flora in Alzheimer's disease

研究代表者

植松 未帆 (Uematsu, Miho)

大阪公立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80815647

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：近年、腸内微生物叢が腸脳相関を介して神経変性疾患の病態に影響を与える可能性が示唆されている。一方、viral dark matterと呼ばれる腸内ウイルス叢のゲノム配列や機能、種々の疾患との関係については、ほとんど分かっていない。本研究では、腸脳相関により腸内環境から強い影響を受けると考えられている神経変性疾患、なかでもアルツハイマー病やパーキンソン病などに着目した。疾患群と健常コントロール群の糞便サンプルにおける細菌叢とウイルス叢のメタゲノムを比較した結果、疾患群と健常コントロール群では異なる微生物叢の組成と遺伝子機能を呈しており、新規治療法の標的となり得ることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、次世代シーケンサー技術の飛躍的な進歩に伴い、腸内細菌叢の組成やその代謝産物が疾患の発症に与える影響に特に注目が集まっている。とりわけ、神経変性疾患と腸脳相関の関係は世界的に注目されている。本研究では、神経変性疾患に特徴的な腸内細菌叢の組成異常（ディスバイオシス）と遺伝子機能の変化を網羅的に解析することで、神経変性疾患の治療法を検討した。本研究のように腸内細菌叢の遺伝子機能を解析することで見出される治療戦略は、今後、新たな治療介入につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, it has been suggested that the gut microbiota may influence the pathogenesis of neurodegenerative diseases via the gut-brain connection. On the other hand, little is known about the genome sequence and function of the gut viral flora, called viral dark matter, and its relationship with various diseases. In this study, we focused on Alzheimer's disease and Parkinson's disease, which are thought to be strongly influenced by the gut-brain connection. After extracting the genes of intestinal bacteria and viruses from fecal samples, the genome sequences were analyzed using a next-generation sequencer and a supercomputer. Comparison of the metagenomes of the bacterial and viral flora in the disease and healthy control groups showed that the composition of the microflora and gene function differed between the disease and healthy control groups. This finding indicated that gut dysbiosis could be a potential target for novel therapies for neurodegenerative diseases.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：メタゲノム解析 メタボローム解析 腸内細菌叢 腸内ウイルス叢 アルツハイマー型認知症 パーキンソン病関連疾患 KEGG 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

近年、腸内細菌の構成異常やその結果生ずる代謝産物の変化や細菌由来の内毒素(LPS)などが、gut-brain axis および brain-gut microbiome axis を介してアルツハイマー病のタウ病変やアミロイド病変およびパーキンソン病の α シヌクレインの蓄積に影響を与えると報告され、神経変性疾患と脳腸相関の関連性が世界的に注目されている。これまで 16SrRNA 解析が精力的に行われてきたが、神経変性疾患に特徴的な菌などは未だ十分に明らかにされているとはいえない。さらに、腸内には既知のウイルスに加えて、'viral dark matter' と呼ばれている未知のウイルスが多数存在している (Hurwitz et al. FEMS Microbiol Lett. 2016)。しかし、これらのウイルスと神経変性疾患との関連性に関してはほとんど分かっていない。そこで、疾患特異的な腸内細菌やウイルスの同定およびそれらによって引き起こされる腸内微生物叢の組成異常や代謝産物の変化と神経変性疾患の病態との関連を明らかにすることにより、腸内微生物叢の異常の観点から神経変性疾患の病因を解明するとともに、新たな治療法開発につながる知見を得られる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、腸内における微生物叢およびその代謝産物が、神経変性疾患における異常蛋白の蓄積に関わるかどうか、および病変進行を押し進めるメカニズムに関与する可能性があるかどうかを検討するために、患者の糞便において細菌とウイルスの全ゲノム解析を行い、健常者のメタゲノムデータと比較することによってバイオマーカーとなりうる疾患特異的な腸内微生物の同定することを目的とした。さらに、腸内微生物の組成および代謝パスウェイの変化の情報を、全ゲノム解析によって網羅的に解析し、微生物ゲノム情報と神経変性疾患との関連を包括的に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、健常者およびアルツハイマー病患者の糞便サンプルにおける細菌叢とウイルス叢のメタゲノムデータを用いて相互に比較し、コントロール群と疾患群で異なる微生物叢の組成を推定するための、解析方法の構築を行った。具体的には、次の A、B、C、D、E の順に解析・検討した。

A 患者の糞便サンプルからの微生物叢の遺伝子抽出

アルツハイマー病およびパーキンソン病の患者の糞便サンプルを地域中核病院脳神経内科に受診中のさまざまな臨床的重症度の患者から募集した。集めた個々の糞便サンプルからの微生物叢については、最適化された遠心分離処理、フィルター処理および溶菌酵素処理等により①細菌、②遊離ウイルス、③細菌への付着ウイルスの3種類に分けて、それぞれに遺伝子を抽出した。これらの遺伝子に次世代シーケンサー用のカスタムアダプター配列をライゲーションしたライブラリを作成し、次世代シーケンサーで塩基配列を決定した。

B メタゲノムデータ解析

次世代シーケンスによって得られたゲノムデータの解析は、東京大学医科学研究所に設置されているスーパーコンピュータ SHIROKANE を利用して行った。生物種を推定するリファレンスデータとしては、申請者の研究室より産出されたメタゲノムデータと公共データベースから得られるゲノム配列の情報を用いた。

C 遺伝子機能解析 (KEGG パスウェイ解析)

スーパーコンピュータ SHIROKANE を利用し、KEGG パスウェイ解析のパイプラインを用いて遺伝子機能解析、パスウェイ解析を行い、疾患関連分子を探索した。

D 神経病理学的検討

A~C によって候補に挙げた疾患関連分子につき、剖検脳における分布を検討するため、多重免疫電顕の手法の検討を行った。また、疾患への関連の疑われる細菌について、in situ hybridization で組織への影響を検討した。

E 将来の研究のための準備

本研究で得られた知見から発症に影響を及ぼしうる候補の菌を挙げ、ヒト iPS 細胞由来の分化誘導したニューロンやアストロサイトに感染させ、細胞への影響を検討するため、ヒト iPS 細胞の中脳ドーパミン作動性ニューロンやアストロサイトへの分化誘導の条件検討を行った。

4. 研究成果

次世代シーケンサーを用いたショットガンシーケンシングにより、神経変性疾患患者の腸内細菌叢の全メタゲノム解析を行った結果、パーキンソン病関連疾患患者群の腸内細菌叢で

は、健常者にみられる細菌とは統計的に有意に異なる菌叢を特徴とするディスバイオーシスをきたしていることが分かった。得られた腸内微生物叢の遺伝子から ORF 領域を同定し、KEGG データベースを用いて遺伝子機能解析を行った。その結果、特徴的な細菌の生存に関わる種々の遺伝子のアバンダンスが健常者データベースと比べて統計的に有意に増加しており、一方で、有用菌の相対的な減少によって、一部の一次代謝経路に関連する遺伝子のアバンダンスが相対的に減少していることが分かった。また、パスウェイ解析においても特徴的な菌の生存に関わる、バイオフィーム形成や抗微生物ペプチドへの耐性などの種々の KEGG パスウェイが有意に亢進しており、その一方で、有用な代謝経路（ビタミン、アミノ酸、脂肪酸合成経路等）を構成する遺伝子のアバンダンスが相対的に低下していた。腸内ウイルス叢の構成の違いについてもメタゲノム解析による詳細な検討を行ったところ、パーキンソン病においては特徴的なウイルスファミリーの低下が有意にみられる他、細菌叢において増加している細菌に対するバクテリオファージの増加が見られ、細菌叢のディスバイオーシスを反映するウイルス叢の変化が生じていると考えられた。今後の研究の準備としては、解析により候補に挙げた疾患関連分子につき、剖検脳における分布を検討するための準備として、多重免疫電顕の手法につき検討した。また、とりわけパーキンソン関連疾患において特徴的であった細菌叢に着目し、この細菌の神経系細胞に対する影響を検討するため、疾患特異的 iPS 細胞を神経系細胞へ分化誘導するための条件検討を行い、将来の感染実験の準備をした。

本研究課題の結果をふまえて、今後は、腸内細菌叢関連神経変性疾患群に特有の腸内細菌叢の機能変化に対応した補充戦略や、共生病原腸内細菌（パソビオン）の制御に関する革新的な治療法の創出を目指す。

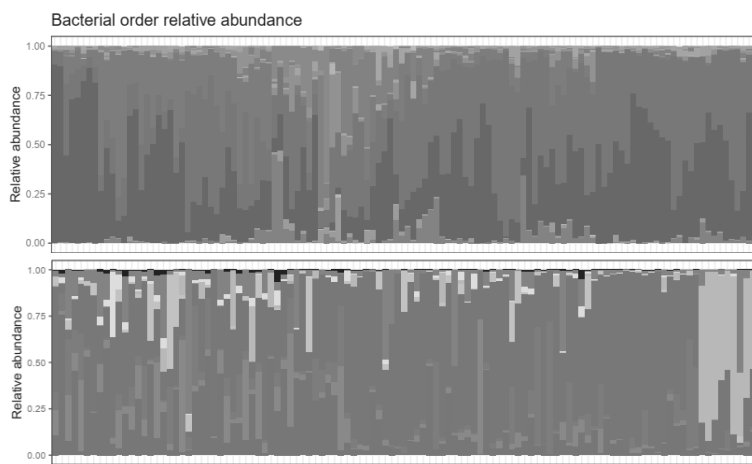


図1 細菌叢（上）およびウイルス叢（下）の構成異常の検討

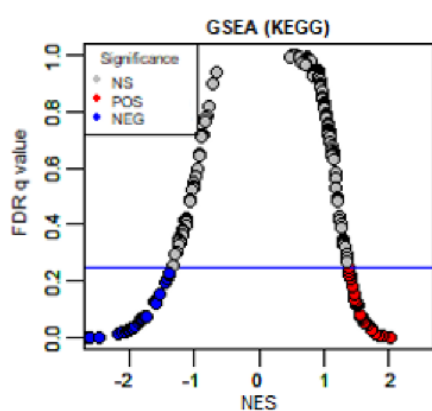


図2 KEGG パスウェイ解析 (GSEA)

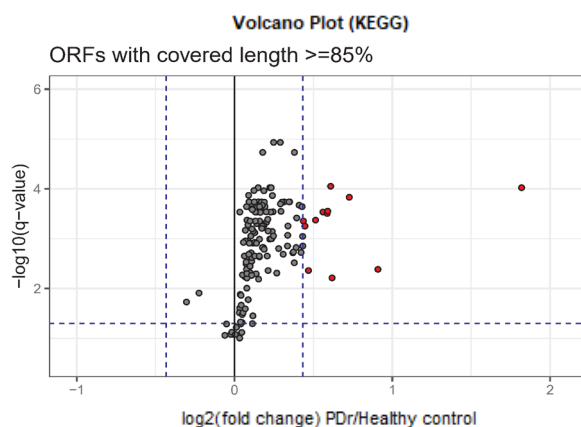


図3 KEGG パスウェイ解析 (Volcano plot)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uematsu M, Mikami K, Nakamura A, Takahashi R, Yokota T, Hirokawa K, Uchihara T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Parallel gold enhancement of quantum dots 565/655 for double-labelling correlative light and electron microscopy on human autopsied samples	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-09849-8 (Accepted 23 March 2022, Published 12 April 2022)	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 該当する
1. 著者名 Fujimoto K, Kimura Y, Shimohigoshi M, Satoh T, Sato S, Tremmel G, Uematsu M, Kawaguchi Y, Usui Y, Nakano Y, Hayashi T, Kashima K, Yuki Y, Yamaguchi K, Furukawa Y, Kakuta M, Akiyama Y, Yamaguchi R, Crowe SE, Ernst PB, Miyano S, Kiyono H, Imoto S, Uematsu S	4. 巻 28
2. 論文標題 Metagenome Data on Intestinal Phage-Bacteria Associations Aids the Development of Phage Therapy against Pathobionts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Host & Microbe	6. 最初と最後の頁 380 ~ 389.e9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chom.2020.06.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Fujimoto K, Kimura Y, Allegretti JR, Yamamoto M, Zhang YZ, Katayama K, Tremmel G, Kawaguchi Y, Shimohigoshi M, Hayashi T, Uematsu M, Yamaguchi K, Furukawa Y, Akiyama Y, Yamaguchi R, Crowe SE, Ernst PB, Miyano S, Kiyono H, Imoto S, Uematsu S	4. 巻 -
2. 論文標題 Functional Restoration of Bacteriomes and Viromes by Fecal Microbiota Transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	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） 10.1053/j.gastro.2021.02.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Fujimoto K, Kawaguchi Y, Shimohigoshi M, Gotoh Y, Nakano Y, Usui Y, Hayashi T, Kimura Y, Uematsu M, Yamamoto T, Akeda Y, Rhee JH, Yuki Y, Ishii KJ, Crowe SE, Ernst PB, Kiyono H, Uematsu S	4. 巻 157
2. 論文標題 Antigen-Specific Mucosal Immunity Regulates Development of Intestinal Bacteria-Mediated Diseases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1530-1543
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2019.08.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ebashi M, Ito Y, Uematsu M, Nakamura A, Hirokawa K, Kamei S, Uchihara T	4. 巻 7
2. 論文標題 How to demix Alzheimer-type and PSP-type tau lesions out of their mixture -hybrid approach to dissect comorbidity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun	6. 最初と最後の頁 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-019-0708-4	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 該当する

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 植松未帆
2. 発表標題 ホットトピックス06 プロテインパチー克服への道程：タウオパチーの病理学的検討と新規治療法の開発
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 植松未帆
2. 発表標題 シンポジウム3 タウ病変の疾患特異性—臨床診断から分子基盤まで—：タウ分子が織りなす超微形態、病変と分布からヒト脳疾患まで
3. 学会等名 第61回日本神経病理学会総会学術研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 植松未帆
2. 発表標題 Quantum dot/nanogold colabeling for double correlative light and electron microscopy of human brain
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江橋 桃子、融 衆太、伊藤 嘉恵、植松 未帆、中村 綾子、亀井 聡、横田 隆徳、廣川 勝昱、内原 俊記
2. 発表標題 AD特異的4Rタウ病変をPSPと区別する
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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