

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15267

研究課題名（和文）ヒトコホートをを用いたビタミンBの摂取が腸内細菌群集に与える影響の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the effect of vitamin B intake on gut bacterial communities using a human cohort

研究代表者

朴 鐘旭（PARK, JONGUK）

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 AI健康・医薬研究センター・客員研究員

研究者番号：60803335

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：腸内細菌に影響する食事成分として食物繊維以外の栄養素により新たな腸活のスタンスを解明するため、コホートデータを用いて栄養摂取と腸内細菌叢間の関連解析を行った結果、ビタミンB1とRuminococcaceae間で関連があることを確認し、*in silico*パスウェイ解析によって、属する細菌は生存に必要なにもかかわらず、自らビタミンB1の合成ができないことを解明した。さらに、酪酸産生にも影響することを明らかとし、ビタミンB1欠乏エサ飼育マウスを用いた解析結果と共に、論文投稿、国際学会にて報告した。また、機械学習を用い、酪酸産生には酢酸、ビタミンB1摂取、酪酸産生菌が独立して影響することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、健康意識の高いコホートデータを用いて、栄養摂取と腸内細菌との関連を網羅的に調査し、ビタミンB1の摂取が特定の腸内細菌の腸内での競争力に影響すること、様々な作用で健康と関連する酪酸産生に影響することを疫学的に明らかにし、*in silico*、*in vivo*での検証まで行った。さらに、機械学習にてビタミンB1の摂取が独立して酪酸産生に影響することを確認した。健康意識の高いヒトを対象としていることから、バランスのいい栄養摂取状況の中で、効果的である可能性が示唆されたことには意義がある。また、体への負担も大きくない素材であるため、一般的な現代人が行える効果的な腸活として提案できる。

研究成果の概要（英文）：To clarify a new notion of intestinal activity by nutrients other than dietary fiber as dietary components that affect intestinal bacteria, we performed an association analysis between nutritional intake and intestinal microbiota using cohort data. We confirmed the association between vitamin B1 and Ruminococcaceae. *In silico* pathway analysis, we clarified that the bacteria from this genus cannot synthesize vitamin B1 independently, even though it is necessary for survival. Furthermore, we explained that it also affects butyrate production. We submitted a paper and reported it at an international conference, presenting the results of an analysis using mice fed a vitamin B1-deficient diet. In addition, using machine learning, we clarified that acetic acid, vitamin B1 intake, and butyrate-producing bacteria independently affect butyrate production.

研究分野：腸内細菌

キーワード：腸内細菌 栄養素 ビタミン バイオインフォマティクス コホート研究

1. 研究開始当初の背景

健康の維持は腸内環境が大きく関与していることが最近の研究により報告されており、腸内環境の改善、維持を目的とした研究が活発に行われている。実際に、腸内環境の乱れにより、腸疾患はもちろん、アレルギーや糖尿病などの生活習慣病が発症すると報告されていることから(1) 腸内環境をより良く保つことは健康な体を保つことと直接つながっていると認識され、社会的な関心が高まっている。腸内環境に最も影響するのは、食事による栄養摂取とその栄養を活用する腸内細菌環境であると知られており、これらを改善することにより、腸内環境も改善されると報告されている(2)。腸内細菌群集と栄養との関係を理解するための研究は、主に、腸内細菌の主要な餌である食物繊維が注目されている。しかし、実際には、大腸に到達する物質は、食物繊維に限定されなく、タンパク質 20~40%、抵抗性澱粉、脂肪、植物化学物質を含む 45~85g の固体は、小腸上皮から吸収されず、毎日大腸に到達すると報告されている(3)。これらの関連性を考慮すると、食物繊維だけでなく、他の食べ物を介して腸内細菌群集が変化することができ、我々の腸内環境改善に非常に有用である可能性がある。その中で、ビタミン B1 は、*-ketoglutarate dehydrogenase* と *pyruvate dehydrogenase* のようないくつかの酵素の補因子として重要であり、クエン酸サイクルに関与することを明らかにしている。また、腸共生細菌を含む腸の中の多くの細菌は、成長のためのエネルギーを生成するような代謝活動をするためにビタミン B1 が必要であると報告されていることから(4) ビタミン B1 の摂取が腸内細菌群集に大きく影響する可能性を考えた。

そこで、申請者は研究グループの協力のもと、ビタミン B1 欠乏エサで飼育したマウスを用いて、ビタミン B1 の欠乏が腸内細菌叢にどのような影響を及ぼすのかを評価した。その結果、ビタミン B1 の欠乏によってマウスの腸内細菌叢が大きく変化することを明らかにした。さらに、糞便中の酪酸がコントロールと比べ有意に減少することを見出した。従って、食事で摂取するビタミンにより腸内細菌、もしくは環境が変化されることで、我々の健康に影響を及ぼす可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ビタミン B1 の摂取と腸内細菌との関連についてヒトコホートをを用いて解明し、そのメカニズムを明らかにすることである。食事が、個人内の腸内細菌群集に影響を与えることは、すでに明らかになっているが、豊富なデータを基にした腸内細菌群集に対する、食事の影響はまだ複雑で多くの臨床研究で実現するのは難しい。これは、今まで形成された食事の多様性に依りて、各個人が高度にパーソナライズされた腸内環境を持っているからである。これらの理由から、栄養摂取が腸内細菌群集に及ぼす影響を明確にするために、健康な日本人の大規模なコホートをを用いて、ビタミン B1 を含む栄養摂取と腸内細菌との関連を明らかにし、そのメカニズムについて検討した。

3. 研究の方法

申請者の研究グループがすでに確立し運営している観察研究の参加者を対象とし、アンプリコンシーケンシング法によって得られた腸内細菌情報と BDHQ によって得られた栄養摂取情報との関連を網羅的に解析した。

ビタミン B1 が腸内細菌叢の構成ならびに酪酸産生に影響を与えるメカニズムを解明するため、ビタミン B1 の欠乏によって影響を受けた細菌種を同定し、KEGG を用いたパスウェイ情報や細菌のゲノム情報を用いて酵素の遺伝子データを照合し、まとめた情報をもとに、ビタミン B1 に制御される細菌種の遺伝学的特徴を明らかにした。

4. 研究成果

健康な日本人の腸内細菌叢構成に影響する細菌を探索するため、PCoA-envfit 解析を行った。解析は細菌の門レベルから属レベルまで多様なレベルで行った (fig.1A)。その結果、エンテロタイプとして知られている細菌を含め、複数の細菌が確認された。腸内細菌叢 - 栄養素の関係を PCoA-envfit 解析で確認した結果、ビタミン B 群と zinc, magnesium などの微量栄養素が同じ方向で関連していることが明らかとなった (fig.1B)。二つの解析の結果から、腸内細菌叢に関連を示した栄養素が特定の細菌に影響する可能性が示唆された。このことから、腸内細菌叢構成に影響する細菌と腸内細菌叢に関連を示した栄養素をピックアップし、相関解析を行った結果、PCoA-envfit の結果と同様に、方向性が似ている細菌が正の相関関係を示した。その中でも family level の Ruminococcaceae と vitamin B1 の摂取量間で最も高い相関を示した (fig.1C)。Ruminococcaceae と vitamin B1 の摂取量間の相関について変数の分布の確認のため、geom plot にて確認した結果、偏りなく、正の相関が確認された (fig.1D)。また、どれぐらいの vitamin B1 の摂取量が Ruminococcaceae の存在量が関連したのかを確認するため、vitamin B1 の摂取量を 0.1 mg ずつグループ化し、比較解析を行った (fig.1E)。その結果、0.6 mg/1,000 kcal/day まではその前のグループと比べ有意に Ruminococcaceae の存在量が多いことが確認された。

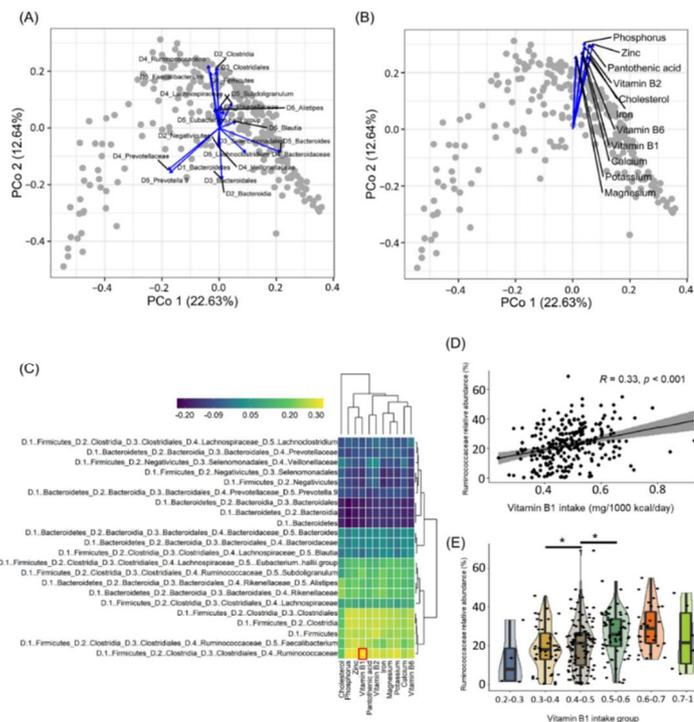


Fig.1 腸内細菌と栄養摂取との相関関係

vitamin B1は細菌の代謝反応に補酵素として必須である報告もあることから、vitamin B1の摂取によって Ruminococcaceae familyの腸内細菌環境での生存力・競争力に影響する可能性があるとの仮説を設定し、Ruminococcaceae familyとvitamin B1の関係に焦点を当てて研究を行った。

本研究のヒトの結果で、RuminococcaceaeがvitaminB1に影響されることは確認されたが、同じく、dominant 腸内細菌である Bacteroidaceae には影響が確認されなかった (Fig.1C)。

一方で、一部の腸内細菌はvitaminB1を自ら合成することが報告されていることから、Ruminococcaceae と Bacteroidaceae の違いは、vitamin B1の合成の有無が関与しているのではないかと考え、

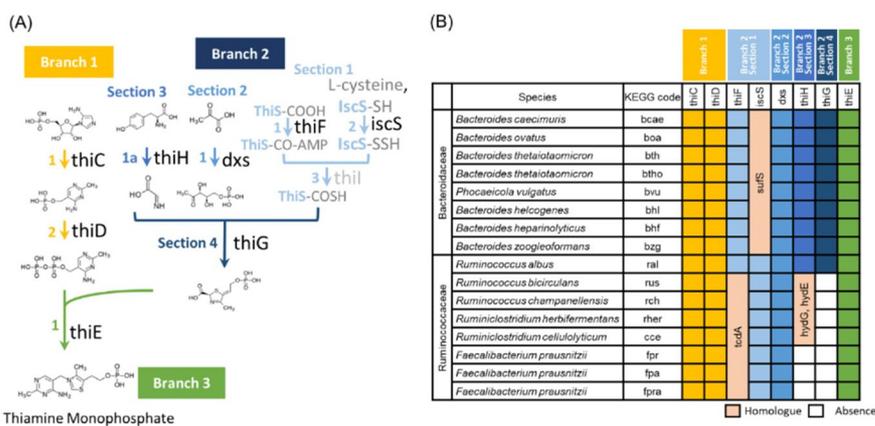


Fig.2 ビタミン B1 合成経路および Ruminococcaceae に属する細菌の関連酵素保有比率

全ゲノムシーケンシングデータからvitamin B1の合成経路に必要な酵素の有無を確認した (fig.2A, B)。その結果、Branch2-section1-2 (thiF), Branch2-section3 (thiL), Branch2-section4 (thiG, thiE), Branch3-2 (thiL) 酵素が

Bacteroidaceae に属する細菌では、ほとんど確認された反面、Ruminococcaceae に属している細菌では確認されなかった。このことから、ヒトコホートデータを用いた結果、マウス実験系の結果、PATHWAYの結果が同様に、vitamin B1の摂取が腸内環境中の Ruminococcaceae の生存に影響するとの結果を示した。

Ruminococcaceae に属する多くの細菌は代謝産物として、butyrate を合成することが知られており、vitamin B1の摂取はbutyrateの合成にもかかわっていると考えられる。このことから、Ruminococcaceae familyに含まれているgenusの中で、最も多いFaecalibacteriumの代謝経路を確認した (fig.4A)。その結果、Faecalibacteriumは、pyruvateからAcetyl-CoAに変換される反応で、pyruvate ferredoxin oxidoreductaseがvitamin B1が補酵素として必要であることを確認した。vitamin B1の摂取によってbutyrateの合成が影響されるかを確認するため、マウスの糞便からbutyrateの量を測定した結果、マウスの結果で、butyrateはvitamin B1欠損マウスで有意に減少した (fig.4B)。ヒトデータにおいてはbutyrateとvitamin B1間で相関がみられなかった (fig.4C)。butyrate産生とvitamin B1摂取間で相関がみられなかった原因を調べるため、PCA HPC解析を用いてvitamin B1-butyrate-Faecalibacteriumの関係を確認した結果、三つのクラスターが作成された (fig.4D, E)。1、2クラスターは、vitaminB1, Ruminococcaceaeの量でbutyrate産生が相関していることが確認された。一方で、3クラスターは、vitaminB1, Ruminococcaceaeの量とbutyrate産生量で異なった結果が示された。butyrateの産生に影響する要因として、まず基質である食物繊維の摂取量が関与していると考え、2と3のクラスター間で比較解析を行った結果、2と3のクラスター間で、差はみられなかった (fig.4F)。食物繊維の摂取量と糞便中のbutyrate量間の直接的な関係を確認するため、相関解析を行った結果でも、相関はみられなかった (fig.4G)。ヒトコホートデータの多様性を超える食物繊維の摂取によるbutyrate産生への影響はみられなかった。食物繊維 腸内細菌 短鎖

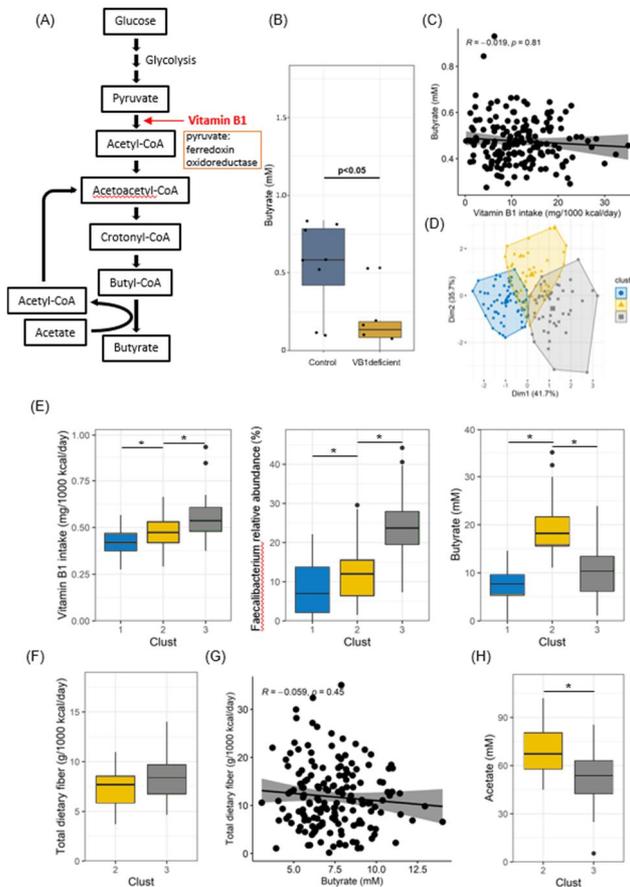


Fig.3 butyrate 産生との関連解析

Table 1. ランダムフォレスト機械学習モデルの結果

	Acetate		Acetate, vitamin B1		Acetate, vitamin B1 ,Faecalibacterium	
	RMSE	R2	RMSE	R2	RMSE	R2
1	5.39	0.41	5.22	0.44	4.65	0.53
2	5.47	0.39	5.23	0.44	4.73	0.53
3	5.36	0.43	5.30	0.45	4.62	0.56
4	5.58	0.36	5.05	0.47	4.75	0.51
5	5.27	0.40	5.25	0.45	4.64	0.53
Ave.	5.41	0.40	5.21	0.45	4.68	0.53

このことから、ビタミン B1 の摂取は、酪酸産生菌の生存に関与し、腸内環境中の酪酸の量にも影響することが示唆された。本研究の結果は、食事生活の調整によって腸内細菌環境を調整する一つのスタンダードとなることが期待できる。

<引用文献>

- 1 . Mosca, A.; Leclerc, M.; Hugot, J.P. Gut Microbiota Diversity and Human Diseases: Should We Reintroduce Key Predators in Our Ecosystem? *Front. Microbiol.* 2016, 7, 455.
- 2 . Shanahan, F.; van Sinderen, D.; O'Toole, P.W.; Stanton, C. Feeding the Microbiota: Transducer of Nutrient Signals for the Host. *Gut* 2017, 66, 1709-1717.
- 3 . Silvester, K.R.; Englyst, H.N.; Cummings, J.H. Ileal Recovery of Starch from Whole Diets Containing Resistant Starch Measured In Vitro and Fermentation of Ileal Effluent. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995, 62, 403-411.
- 4 . Magnúsdóttir, S.; Ravcheev, D.; de Crécy-Lagard, V.; Thiele, I. Systematic Genome Assessment of B-Vitamin Biosynthesis Suggests Co-Operation Among Gut Microbes. *Front. Genet.* 2015, 6, 148.

脂肪酸間の相関関係を網羅的に解析した結果、基質である食物繊維は、短鎖脂肪酸との関連が見られなかった。一方で、butyrate パスウェイの最終工程で代謝される Acetate による影響を考え、糞便中の Acetate の量を測定し、2 と 3 のクラスター間で比較解析を行った結果、2 クラスターが 3 クラスターと比べ、有意に多いことが確認できた (fig.4H)。このことから、3 クラスターでは、Acetate が比較的少ないため、CoA が脱落できず、butyrate に代謝される前の Butyl CoA が蓄積されている可能性が考えられる。

また、これらの結果をもとに機械学習を用い、腸内の butyrate の量に影響する acetate、ビタミン B1 摂取、Faecalibacterium について、健闘した結果、Acetate のみで作成したモデルと Acetate, vitamin B1 を組み合わせたモデル間で RMSE、R2 がともに有意差を示しており (RMSE $p = 0.018$, R2 $p = 0.005$)、Acetate, vitamin B1 を組み合わせたモデル t と Acetate, vitamin B1, Faecalibacterium を組み合わせたモデル間でも、有意差を示し (RMSE $p = 0.00002$, R2 $p = 0.00003$)、酪酸産生には酢酸、ビタミン B1 摂取、酪酸産生菌が独立して影響することを明らかとした (Table 1)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Park Jonguk, Hosomi Koji, Kawashima Hitoshi, Chen Yi-An, Mohsen Attayeb, Ohno Harumi, Konishi Kana, Tanisawa Kumpei, Kifushi Masako, Kogawa Masato, Takeyama Haruko, Murakami Haruka, Kubota Tetsuya, Miyachi Motohiko, Kunisawa Jun, Mizuguchi Kenji	4. 巻 14
2. 論文標題 Dietary Vitamin B1 Intake Influences Gut Microbial Community and the Consequent Production of Short-Chain Fatty Acids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2078 ~ 2078
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu14102078	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Park Jonguk
2. 発表標題 Dietary vitamin B1 intake influences gut microbial community and the consequent production of short-chain fatty acids
3. 学会等名 International Symposium on Microbial Ecology (ISME) (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------