

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科獣医学専攻

平成年度博士課程入学

氏名 増岡 弘晃

指導教員名 平山 和宏

論文題目 腸内細菌による宿主栄養獲得への寄与

【背景と目的】 いわゆる次世代シーケンサー (NGS) を始めとする近年の遺伝子配列解析技術の進展により、腸内細菌叢解析は日進月歩で発展し続けている。これに伴い、腸内細菌叢と宿主栄養との関連、特に腸内細菌が宿主のエネルギー獲得を補助する役割を担う可能性があることが明らかになりつつある。しかし、いずれの先行研究においても、寄与する細菌(群)の正確な同定やメカニズムの解明には至っておらず、様々な手法を組み合わせたアプローチが必要だと言える。本研究では、腸内細菌叢の宿主栄養獲得への寄与を明らかにする目的で、特殊な食習慣を持つ民族を例にとり、食糧問題における大きな課題である「栄養不良」および「栄養過多」と腸内細菌叢の関連について研究を行った。タンパク質の摂取量が極端に少ないパプア・ニューギニア (PNG) 高地人と自給自足に近い生活様式を伝統的に営むラオス北部の山岳民族の2つの民族を対象とした。「栄養不良」についての研究として、第一章ではまず、タンパク質欠乏の状態の場合に腸内細菌叢が示す応答について SPF マウスを用いて調べ、第二章では、第一章の結果を基に「低タンパク質適応」の状態にあるとされる PNG 高地人の腸内細菌叢が低タンパク質状況下で宿主に対してどのような役割を示すかについて調べた。「栄養過多」についての研究として、第三章では、近年市場経済の広まりと食生活の急変に伴い、非感染性疾患 (Non-communicable diseases: NCDs) のリスクファクターが上昇しているラオス北部における栄養転換、すなわち食生活の近代化と腸内細菌叢の変容の関係について調べるため、異なる経済状況すなわち栄養状態にある3地点を選び、腸内細菌叢の比較・解析をした。

○ 第一章: SPF マウスにおける低タンパク質食が与える腸内細菌叢への影響

【材料と方法】 20匹の9週齢の雄 BALB/cAJcl 系統の SPF マウスを4群に分け、各群それぞれにタンパク質含有量が3%、6%、9%、12%となるように配合した飼料を4週間与え、7日毎に体重の測定および糞便のサンプリングを行った。また、実験28日目には血液のサンプリングも行った。3%タンパク質飼料を与えた群 (3%群) と12%タンパク質飼料を与えた

群 (12%群)については、糞便からの DNA 抽出を酵素法により行い、MiSeq シーケンスシステム (illumina) にて細菌叢解析を行った。血液は血清分離し、バイオマーカーの測定を行った。

【結果】 3%群では体重の減少が見られた。血清 BUN 濃度についても 3%群で低くなった。腸内細菌叢の α 多様性は、3%群では実験を通じて変化がなかったが、12%群では Chao1 の 28 日目での減少、Shannon 指数の実験 7 日目からの減少が見られた。 β 多様性については、weighted と unweighted 両方の UniFrac 距離で、3%群と 12%群のどちらにおいても、実験 0 日目とその他の実験日との間に有意な差が見られた。3%群では、*Enterobacter ludwigii*、*Microbacterium maritypicum*、*Citrobacter amalonaticus* などにアサインされた OTU の相対存在比が実験の進行に従って増加していた。

【考察】 本研究では、3%群と 12%群のそれぞれで腸内細菌叢の特徴的な変化を検出した。特に、3%群では「尿素窒素サルベージ」との関連が示唆されるいくつかの細菌種の増加が検出された。タンパク質摂取に関連する腸内細菌叢の役割を明らかにするための更なる研究は、特に低所得国におけるヒトの栄養不足に関連する課題の解決に貢献することが期待される。

○ 実験 2: PNG 高地人の腸内細菌叢の持つ栄養機能の解明

【材料と方法】 無菌の BALB/cA マウスを 10 匹ずつの 2 群に分け、PNG 高地人および日本人の糞便を投与し、12%タンパク質飼料で 3 週間の馴化を行った。馴化後に、マウスをさらに 2 群ずつの計 4 群に分け、それぞれの群に 3%または 12%タンパク質飼料を 4 週間与えた。すなわち、「PNG 3%群」、「PNG 12%群」、「JPN 3%群」、「JPN 12%群」の 4 群を作成した。1 週間ごとに体重の測定をし、実験開始日と実験 28 日目の 2 時点で糞便を採取した。また、実験 28 日目には尿および血液サンプルを採取し、バイオマーカーを測定した。糞便からは DNA 抽出を酵素法により行い、MiSeq シーケンスシステムにて細菌叢解析を行った。

【結果】 各群の体重は、JPN 3%群では実験 7 日目以降、JPN 12%群と比較して有意に低くなり、PNG 3%群においては実験 14 日目から、PNG 12%群と比較して有意に低くなった。実験 28 日目においては、PNG 3%群は JPN 3%群と比較して有意に体重の減少が小さかった。腸内細菌叢の α 多様性指標である OTU 数、Chao1 は両方の PNG 群で上昇が見られ、Shannon 指数は、JPN 両群および PNG 12%群では実験 0 日目と比較して 28 日目に有意な減少が見られたが、PNG 3%群では有意な差は見られなかった。実験 28 日目における weighted UniFrac 距離の各群間の比較では JPN 3%群と JPN12%群、JPN3%群と PNG12%群、JPN12%群と

PNG12%群の間には有意な差が見られず、PNG3%群のみ細菌叢の類似度が低く、異なるクラスターを形成しており、細菌叢を構成する細菌の組成比も大きく異なっていた。

【考察】 PNG 群では JPN 群と比較して、低タンパク質飼料による体重の減少が抑制された。この体重減少の違いは腸内細菌叢に起因する可能性が考えられた。また、腸内細菌叢の多様性解析や組成比の解析によって PNG3%群でのみ特徴的な菌叢変化が起こることが明らかになった。特に、PNG3%群ではウレアーゼ産生菌や窒素固定遺伝子を持つ細菌の割合が増加している可能性が考えられた。今後、メタゲノム解析などのより詳細な解析方法により、PNG 高地人の持つ腸内細菌叢の機能や菌種および株レベルでの解析を行っていく必要がある。

○ 実験 3: ラオス北部における栄養転換に伴う腸内細菌叢変容

【材料と方法】 伝統的な狩猟採集生活から市場経済へのシフトが急速に進むラオス北部にて、都市化の程度の異なる 3 地域、すなわち都市部、中間部、山岳部にてサンプリング調査を行い、糞便と同時に対象地域で摂取される代表的な 28 種の食品群の摂取頻度（サンプリング実施前の一週間に食品を摂取した日数）についての情報を得た。糞便は RNeasy 保存液に保存し、日本へと輸送し、酵素法にて DNA 抽出を行った。得られた DNA を MiSeq シーケンシステムにて解析し、腸内細菌叢解析を行った。また、食品群の摂取頻度と腸内細菌叢の相関を正準相関分析（CCA）にて解析した。

【結果】 全ての α 多様性指標は山岳部において、他地域と比較して有意に高いことが明らかとなった。また、weighted、unweighted どちらの UniFrac 距離においても、山岳部-中間部の距離、山岳部-都市部の距離は、中間部-都市部の距離および雨期-乾期の距離よりも有意に大きかった。さらに、*Prevotella* 属、*Massilibrevotella* 属、*Intestinibacter* 属などの菌属は山岳部特異的に相対存在量が高く、*Fusobacterium* 属、*Klebsiella* 属、*Bacteroides* 属などの菌属は山岳部特異的に相対存在量が低かった。また、CCA の結果より、bitter bamboo shoot、肉類、果物（栽培種）、スパイス、麺類の 5 つの食品群が細菌叢構造の説明のために重要な食品であることが示唆された。相関解析により、bitter bamboo shoot、肉類、果物（栽培種）、麺類はそれぞれ数種の菌属と相関関係にあることが分かった。

【考察】 本研究では、山岳部とその他の地域の人々の腸内細菌叢は大きく異なることが明らかになった。山岳部で特異的に多い菌属には食物繊維などの難消化性成分からエネルギー源となる短鎖脂肪酸を作ることが知られる *Prevotella* 属があり、一方で都市部や中間部では *Fusobacterium* 属や *Klebsiella* 属、*Bacteroides* 属などの NCDs との関連が報告されている

菌属が特異的に多かった。*Prevotella* 属は bitter bamboo shoot と正の相関がある一方で、*Fusobacterium* 属、*Klebsiella* 属、*Bacteroides* 属と負の相関があり、またこれらの菌属は肉類や果物（栽培種）、麺類と正の相関があった。これらのことより、市場経済へのシフトに伴う食事の変化により、エネルギー回収に関連する細菌が減り、一方で NCDs の発症に関わる細菌が増えている可能性が示唆された。今後、メタゲノム解析などの手法を用いてより詳細な解析を行う必要がある。

【総括】 本研究では、異なる 3 つのアプローチで腸内細菌と宿主の栄養状態の相関についての研究を行い、その結果食事と腸内細菌叢は密接に関連しており、食事によって変化した腸内細菌叢が宿主に影響を及ぼす可能性が示唆された。その結果、栄養と腸内細菌叢の関係、特にその作用機序について真に理解するためには、マウスを用いた動物実験が必要不可欠であると考えに至ったが、同時にマウス実験における難しさを痛感することとなった。今後、より精度の高い動物実験を行うために、マウスの詳細な飼育方法やヒト腸内細菌叢の無菌マウスへの移植方法などを改善していく必要があると考えられた。本研究では、パプア・ニューギニア高地人やラオス山岳民に着目して腸内細菌叢の解析を行ったが、彼らは特殊な食習慣を持っており、腸内細菌叢と栄養の関係についての研究には適したモデルだと言える。世界には彼ら以外にも特殊な食生活を営む民族が点在しており、彼らの腸内細菌叢がどのような役割を有すかについては非常に興味深い。現在でも、地球上では数多くの人々が食糧問題に悩まされている現状にある。今後の人類の維持・発展のためには、食糧問題の迅速な解決が必要不可欠である。将来的に、本研究を含む多くの研究で示唆されている、エネルギー回収に関わる腸内細菌をプロバイオティクスのような形で応用することで、栄養が欠乏している人々への栄養改善法の開発も可能であると考えられ、食糧問題を解決する一手となりうると期待している。