

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Life-Style related Diseases including Cardiovascular Diseases and Diabetes Mellitus
- 研究開発課題名 : (日本語) 食-腸-医をつなぐ生活習慣病の新規メカニズムの解明と腸内細菌叢やその代謝産物に着目した病態制御法の開発
(英語) Research for novel mechanisms of life-style related disease in terms of diet, gut microbiome, and medicines, and the development of a disease control method focusing on the gut microbiome and its metabolites.
- 研究開発担当者 所属 役職 氏名 : (日本語) 医薬基盤・健康・栄養研究所 身体活動研究部・室長 村上晴香
(英語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Department of Physical Activity Research, Director, Haruka Murakami
- 実施期間 : 平成 28 年 11 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究
開発課題名 : (日本語) 腸内細菌叢に関連する生活習慣調査のための調査票開発
(英語) Development of a questionnaire to investigate lifestyle related to the gut microbiome.
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名 : (日本語) 医薬基盤・健康・栄養研究所 身体活動研究部、室長・村上晴香
(英語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Department of Physical Activity Research, Director, Haruka Murakami
- 分担研究
開発課題名 : (日本語) 腸内細菌叢を反映する糞便評価票の開発・健常者における腸内細菌叢と糞便との関連の解析
(英語) Development of a stool evaluation sheet reflecting the composition of gut microbiome.

研究開発分担者 (日本語) 医薬基盤・健康・栄養研究所 健康増進研究部、室長・村上晴香
所属 役職 氏名 : (英語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Department of Physical Activity Research, Director, Haruka Murakami

研究開発分担者 (日本語) 医薬基盤・健康・栄養研究所 健康増進研究部、部長・宮地元彦
所属 役職 氏名 : (英語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Department of Physical Activity Research, Division Chief, Motohiko Miyachi

分担研究 (日本語) **健常者・境界域者・有疾患における食 - 腸 - 代謝関連の解析**
開発課題名 : (英語) Analysis of the associations between diet, gut microbiome, and metabolism in healthy people, those on the borderline, and patients.

研究開発分担者 (日本語) 医薬基盤・健康・栄養研究所 健康増進研究部、室長・村上晴香
所属 役職 氏名 : (英語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Department of Physical Activity Research, Director, Haruka Murakami

研究開発分担者 (日本語) 国立国際医療研究センター 人間ドック、副センター長・井上博睦
所属 役職 氏名 : (英語) National Center for Global Health and Medicine, Medical Examination Center, Vice director, Hiromu Inoue

研究開発分担者 (日本語) 医薬基盤・健康・栄養研究所 健康増進研究部、部長・宮地元彦
所属 役職 氏名 : (英語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Department of Physical Activity Research, Division Chief, Motohiko Miyachi

研究開発分担者 (日本語) 医薬基盤・健康・栄養研究所ワクチンマテリアルプロジェクト、プロジェクトリーダー・國澤純
所属 役職 氏名 : (英語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Laboratory of Vaccine Materials, Project leader, Jun Kunisawa

分担研究 (日本語) **食 - 腸 - 疾患発症の経路解明のためのバイオインフォマティクス**
開発課題名 : (英語) Bioinformatic analysis of interactions between diet, gut microbiota and diseases

研究開発分担者 (日本語) 医薬基盤・健康・栄養研究所バイオインフォマティクスプロジェクト、プロジェクトリーダー・水口賢司
所属 役職 氏名 : (英語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Laboratory of Bioinformatics, Project leader, Kenji Muzuguchi

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究は、代謝性疾患（特に糖尿病）発症における食事と腸内細菌叢を介した新規メカニズムの解明と、腸内細菌叢やその代謝産物に着目した病態制御法の開発を目的としている。平成 28 年度においては、①腸内細菌叢と関連する生活習慣（食事・栄養摂取状況や身体活動状況）を把握するための質問票の開発、②腸内細菌叢を反映しうる糞便評価法の開発、③参加者リクルートおよび腸内細菌叢やその代謝産物の解析、④既存のデータベースの拡張および補強を行った。

現在、我々の研究グループにおいて運営している NEXIS コホート（Nutrition and Exercise Intervention Study）では、健常者を対象に、体組成や生活習慣病危険因子、食や身体活動を含めた生活習慣、体力等の測定を経年的に行っており、さらに糞便の採取も行い腸内細菌叢の解析を実施してきた。本研究は、この研究資源を活かしつつ、さらに対象を代謝性疾患にも拡大しているところである。平成 28 年度においては、本研究への参加同意を 30 名の方から得ており、計 400 名の糞便のサンプリングが完了した。これまでに、腸内細菌叢解析のため、グアニジン溶液を用いたサンプリングから DNA 抽出までの一連のプロトコルの検討・最適化を行い、本成果は Scientific Reports に受理され、近日中に掲載される予定である。また、収集されたすべての糞便サンプルから DNA 抽出を完了しており、シーケンスを開始している。血液サンプルについては、ELISA や Bioplex による抗体及びサイトカイン・ケモカインの測定系、GC-MS による代謝物の測定系を確立し、測定を開始している。さらに、収集した試料のバンク化のため、余剰の DNA 及び糞便サンプルは-30℃で、余剰の血液サンプルは-80℃もしくは液体窒素タンクに保管している。

また、腸内細菌叢の構成や多様性に影響を及ぼすであろう食事や栄養の要因を網羅的かつ適切に把握可能な質問票を開発するため、先行研究を対象に、食と腸内細菌叢に関するシステマティックレビューを行った。これまで検討された食事・栄養因子として、高脂肪食、ベジタリアン食、グルテンフリー、プロバイオティクス、オリゴ糖、多糖・食物繊維、麦・穀類、ポリフェノールなどが抽出された。さらに既存の 369 名のデータを用いて、55 項目の食行動と腸内細菌叢の多様性（ β diversity）との関連を PCoA 解析により検討し、関連のある 7 項目の食行動を抽出した。これらの結果を基に、質問項目を作成し、腸内細菌叢に関連する質問票の作成を行った。現在は、本質問票を用いて、調査を実施している。また、日常の糞便状態や排便状況から腸内細菌叢の構成や多様性を推測するツールを開発するため、日常の糞便状態や排便状況を調査し、腸内細菌叢の多様性（ β diversity）との関連について、検討を行った。その結果、便の形状は腸内細菌叢の多様性と関連している可能性が示唆された。

これら、本研究で得られたデータは、糖尿病等の代謝性疾患の罹患者、その境界域者、健常者の約 600 名を肥満者と非肥満者に区分され、それぞれ様々な生活習慣等と腸内細菌叢のデータを収集してデータベース化される。収集するデータは多岐にわたり、身体組成、体力、体格などの生理学的指標、食事、栄養摂取、運動などの生活習慣、血液の生化学データ、メタボローム、免疫関連因子のプロファイル等、16S リボソーム RNA による腸内細菌叢のデータが含まれる。データベースは既存のデータベースに統合されるが、本研究により得られたデータを更に追加するため、本年度は、異なるコホートのデータを統合する仕組みを構築し、さらに対象者ごとに、どの研究に用いることができるかの情報を付加した。また、健常者と有疾患者等のグループ間の比較ができる仕組みも構築した。

This research is aimed at identifying a novel mechanism in the development of metabolic diseases (particularly diabetes) via factors such as diet and gut microbiome, and developing a disease control method focusing on the gut microbiome and its metabolites. In 2016, we achieved the following: (1) development of a questionnaire to understand lifestyle habits (conditions of dietary and nutritional intake and of physical activity) related to the gut microbiome conditions; (2) development of a stool evaluation sheet that reflects the gut microbiome conditions; (3) recruitment of participants and analysis of their gut microbiome and metabolites; and (4) extension and reinforcement of the pre-existing database.

Currently, in the Nutrition and Exercise Intervention Study (NEXIS cohort) conducted by our research team, we have been performing a yearly measurement of body composition, risk factors for life-style related diseases, lifestyle habits including diet and physical activity, or physical fitness in healthy people. Their gut microbiome has also been analyzed. Utilizing these research resources, this study is further extending its coverage to patients with metabolic diseases. In this year, the informed consent to participate in the study was obtained from 30 participants additionally and stool samples were totally obtained from 400 people. To analyze the gut microbiome, the optimization of all steps in the protocol, from sampling with guanidine solution to DNA extraction were performed. The results of this study was accepted by Scientific Reports and is published in the near future. DNA was extracted from all stool samples collected, and sequencing has been started. Analysis of blood samples has also been started, with the establishment of analysis systems such as ELISA or Bioplex for antibodies as well as cytokines and chemokines, or gas chromatography-mass spectrometry for metabolites. In addition, to build banks of the collected samples, the residual DNA and stool samples are stored at -30°C and residual blood samples at -80°C or in a liquid nitrogen tank.

To create a questionnaire that can enable comprehensive and appropriate understanding of the dietary or nutritional factors potentially affecting the composition and diversity of gut microbiome, a systematic review of the previous studies on diet and gut microbiome was conducted. The following dietary and nutritional factors were identified as those previously examined: high-fat diet, vegetarian meals, gluten-free diet, probiotics, oligosaccharide, polysaccharide/dietary fiber, wheat/grains, and polyphenols. Additionally, using pre-existing data from 369 participants, the associations between 55 dietary behaviors and gut microbiome diversity (β diversity) were examined by principal component analysis, and seven relevant dietary behaviors were identified. Based on these results, question items were created for the questionnaire related gut microbiome. This questionnaire is used in our study. To develop a research tool for enabling speculation on the composition or diversity of gut microbiome according to the daily conditions of stools or defecation, these daily conditions were investigated and their relationships with the diversity of gut microbiome (β diversity) were analyzed. The results suggest that the stool forms are associated with the diversity of gut microbiome.

The data is accumulated and made a database from approximately 600 participants who include healthy, borderline patients, and patients in this study. The participants are also categorized into obese or non-obese. Additionally, information can be collected on various lifestyle habits and gut microbiome in each category. There are a wide variety of data including physiological indices such as body composition, physical fitness, or physical constitution, lifestyle habits such as dietary and nutritional

intake as well as exercise, blood biochemical data, profiles of metabolomes or immune-related factors, or data on gut microbiome based on 16S ribosomal RNA. Because data obtained from this study were needed to integrate with pre-existing database, we built a structure for integrating data from different cohort studies in this year. Information was also added regarding the studies to which each participants data can be applied. A system allowing for the comparison of groups of healthy people and patients with diseases in this database was also developed.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 11 件、国際誌 8 件)

1. Hosomi K, Ohno H, Murakami H, Natsume-Kitatani Y, Tanisawa K, Hirata S, Suzuki H, Nagatake T, Nishino T, Mizuguchi K, Miyachi M, and Kunisawa J, Method for preparing DNA from feces in guanidine thiocyanate solution affects 16S rRNA-based profiling of human microbiota diversity. *Sci Rep* 2017 (in press)
2. Hirata S and Kunisawa J. Gut microbiome, metabolome, and allergic diseases *Allergol Int.* 2017 (in press)
3. Hosomi K and Kunisawa J. The specific roles of vitamins in the regulation of immunosurveillance, allergy, and inflammation in the gut. *Immune Netw.* 2017 (in press)
4. Tanaka NI, Murakami H, Ohmori Y, Aiba N, Morita A, Watanabe S, Miyachi M. Association of visceral fat area with abdominal skeletal muscle distribution in overweight Japanese adults. *Obes Res Clin Pract.* 2017 (in press)
5. 澤根健人、國澤純. 食用油を起点に形成される生体内脂質環境の構築とアレルギー疾患の制御. *実験医学増刊.* 2017 (印刷中) .
6. 粕淵真由、木村郁夫、國澤純. 腸内環境と腸管免疫・生体防御に関する新しいトピックス. *消化と吸収.* 2017 (印刷中) .
7. 細見晃司、國澤純. アジュバントのターゲットとしての粘膜免疫システム 次世代アジュバント開発のためのメカニズム解明と安全性評価 (監修、石井健) . シーエムシー出版. 2017 (印刷中)
8. Murakami H, Fuku N, Kawakami R, Gando Y, Iemitsu M, Sanada K, Miyachi M. MDRD2/ANKK1 gene polymorphism rs1800497 is associated with exercise habit in the period from childhood to adolescence in Japanese. *J Phy Fit Sports Med.* 2017, 6: 95-102.
9. Furushima T, Miyachi M, Iemitsu M, Murakami H, Kawano H, Gando Y, Kawakami R, Sanada K. Comparison between clinical significance of height-adjusted and weight-adjusted appendicular skeletal muscle mass. *J Physiol Anthropol.* 2017, 36(1):15.
10. Kunisawa J. Metabolic changes during B cell differentiation for the production of intestinal IgA antibody. *Cell Mol Life Sci.* 2017, 74(8):1503-1509.
11. Nyström-Persson J, Natsume-Kitatani Y, Igarashi Y, Satoh D, Mizuguchi K, Interactive Toxicogenomics: Gene set discovery, clustering and analysis in Toxygates. *Scientific Reports* 2017, 7, 1390.
12. 長竹貴宏、國澤純. 食物アレルギーの発症における食用油クオリティの影響 ～油の質がアレルギー体質を決める！？～. *化学と生物.* 2017, 55(1): 11-12.
13. 鈴木英彦、國澤純. ビタミンによる免疫応答の制御と疾患. *炎症と免疫.* 2017, 25(1): 29-33.

14. 夏目やよい, 水口賢司. 計算システム生物学による創薬: 分子、構造からネットワークへ. 日本薬理学雑誌, 2017, 149, 91-95.
15. 國澤純. 腸内環境を介した免疫制御とアレルギー・炎症との関連. Labcab. 2016, 17:5-7.
16. 平田宗一郎, 國澤純. 脂質を介した腸管免疫の制御と疾患・生体防御. 生体の科学. 2016, 67(3): 242-246.
17. 國澤純. 食事性脂質を介した腸管免疫ネットワークの形成. JATAFF ジャーナル. 2016, 4(5): 64.
18. 細見晃司, 國澤純. 腸内細菌と粘膜免疫. ヒトマイクロバイオーム研究最前線 (監修、服部正平). 2016, 119-128.
19. 細見晃司, 國澤純. マイクロバイオームとワクチン開発. ヒトマイクロバイオーム研究最前線 (監修、服部正平). 2016, 299-306.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 腸内環境を起点に進める創薬研究, 口頭, 國澤純, 日本薬学会 第 137 年会, 2017/3/26/, 国内
2. 腸が奏でる生体応答と健康科学への展開, 口頭, 國澤純, JCHM シンポジウム, 2017/3/23, 国内
3. 腸内環境データを活用した健康科学の推進, 國澤純, 仁生プロジェクトセミナー, 2017/3/22, 国内
4. 腸内細菌と食を介した腸内環境の形成と健康・疾患, 口頭, 國澤純, 第 90 回 日本細菌学会総会, 2017/3/20, 国内
5. 腸内環境から考えるヘルスサイエンスの最前線, 口頭, 國澤純, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017/3/19, 国内
6. 栄養と腸内フローラが織りなす腸管免疫環境の構築と健康科学への展開, 口頭, 國澤純, 大阪大学臨床栄養研究会, 2017/3/13, 国内
7. 生活習慣と連動した腸内細菌叢の形成と健康科学への新展開, 口頭, 國澤純, JSBi 関西地域部会 第 22 回バイオメディカル研究会, 2017/3/11, 国内
8. 腸内環境が導く生体応答の基礎的解明と健康科学への新展開, 口頭, 國澤純, 第 11 回 関西ライフサイエンスリーディングサイエンティストセミナー, 2017/3/9, 国内
9. セルフメディケーションにおけるサプリメント・健康食品の今後～科学的根拠の確立～, 口頭, 國澤純, セルフメディケーション学術フォーラム, 2017/3/5, 国内
10. Genetic Factor of Daily Physical Activity, Exercise behavior, and Physical fitness. Murakami H., 口頭, 国際学術シンポジウム, 2017/2/25, 国内
11. 腸内環境を介した免疫システムの構築とワクチン, 創薬, 機能性食品開発への展開, 口頭, 國澤純, 第 19 回藤田保健衛生大学小児科後期研修セミナー, 2017/2/4, 国内
12. 健康増進における腸内環境の重要性と Precision medicine & nutrition としての可能性, 口頭, 國澤純, 彩都産学官連携フォーラム 2017, 2017/1/25, 国内
13. Gut Environmental Factors Act as Natural Adjuvants in the Regulation of Intestinal Immune Responses against Oral Vaccines, 口頭, Jun Kunisawa, 10th Meeting of the Japanese Vaccine Adjuvant Research Consortium, 2017/1/24, 国内
14. 食と腸内フローラが奏でる腸内環境の構築と創薬・健康科学への新展開, 口頭, 國澤純, 創薬薬理フォーラム 第 61 回談話会, 2017/1/20, 国内

15. Computational systems approaches to drug discovery and development, 口頭, 水口賢司, International Conference on Bioinformatics and Biostatistics for Agriculture, Health and Environment, 2017/01/22, 国外.
16. 腸内環境を介した免疫制御と健康科学への新展開, 口頭, 國澤純, 第 20 回日本病態栄養学会 年次学術集会, 2017/1/15, 国内
17. 創薬の初期研究におけるデータベース構築とモデリング, 口頭, 水口賢司, 日本学術会議薬学委員会生物系薬学分科会シンポジウム IT と創薬の融合, 2017/01/13, 国内.
18. 腸内環境データを活用した健康科学と健康長寿社会の実現に向けた展開, 口頭, 國澤純, 第 1 回マイクロバイオームワークショップ, 2016/12/22, 国内
19. アレルギーの予防と改善を目指した腸内環境の理解と応用, 口頭, 國澤純, 第 3 回総合アレルギー講習会, 2016/12/17, 国内
20. 創薬インフォマティクスからの AI への期待, 口頭, 水口賢司, 日本オミックス医療学会シンポジウム, 2016/12/14, 国内.
21. Gut Environment in the Regulation of Host Immunity and Its Application to the Human Health Science, 口頭, Jun Kunisawa, 6th Investigative Commission of Ortho-Organogenesis, 2016/12/8, 国内
22. 創薬支援インフォマティクスシステム : 体内動態, 毒性の統合データベースと予測, 口頭, 水口賢司, 創薬等支援技術基盤プラットフォーム公開シンポジウム, 2016/12/7, 国内.
23. Critical Roles of Gut Environmental Factors in the Regulation of Immunosurveillance and Allergic Diseases, 口頭, Jun Kunisawa, The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2016/12/6, 国内
24. Nutrition and Microbiome in Human Health and Diseases, 口頭, Jun Kunisawa, The 2nd Osaka University Twin Research International Symposium, 2016/11/ 26, 国内
25. 食事や生活習慣と連動した腸内フローラの形成と生体応答, 口頭, 國澤純, 神戸大学農工連携次世代バイオプロダクション(iBioK)主催フォーラム, 2016/11/25, 国内
26. 消化管免疫と腸内環境から考える Precision Medicine & Nutrition の可能性, 口頭, 國澤純, 第 54 回小腸研究会, 2016/11/12, 国内
27. 腸内環境を介した免疫制御の基礎的解明と応用・実用化研究に向けた展開, 口頭, 國澤純, 第 12 回日本食品免疫学会, 2016/11/10, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 医薬基盤・健康・栄養研究所 2016年10月15日「国立健康・栄養研究所“オープンハウス2016”」
2. 医薬基盤・健康・栄養研究所 2016年11月19日「医薬基盤・健康・栄養研究所 一般公開 白衣を着てちびっこ博士になろうーうがい薬でビタミンCを探せー」
3. 医薬基盤・健康・栄養研究所 2017年2月18日「国立健康・栄養研究所セミナー：健康づくりのための身体活動」

(4) 特許出願

なし