

研 究 報 告 書

「構成要素の多様性が変化する系の数学理論構築と細菌群集の関わる疾患制御への応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 12 月～2020 年 3 月

研 究 者: 中岡 慎治

1. 研究のねらい

構成要素の多様性が変化する系は、生命現象で多くみられる。皮膚・腸の常在細菌叢（叢＝集まりを表す）で多様性が減少すると、免疫系による異常な炎症状態が持続するアトピー性皮膚炎や、腸炎を発症することがある。細菌叢の多様性減少を *dysbiosis* と呼ぶ。一方、進化によって多様性が増加するヒト免疫不全ウイルス（HIV）は、薬剤耐性能を獲得するため根治できない。

次世代シーケンサーによる遺伝子計測技術の発展により、ある環境中に存在する微生物群集（マイクロビオーム）を同定できるようになった。その結果、炎症性疾患発症に *dysbiosis* と免疫応答の異常が寄与しているという報告が近年増加している。また、細菌叢の多様性減少に伴い、ある特定の種が優先して増加することもわかってきた。たとえばアトピー性皮膚炎患者の皮膚では黄色ブドウ球菌、腸炎患者の腸ではクロストリジウム属菌といった病原体の増加が認められるが、*dysbiosis* に至る過程と機構は未だ不明である。一方、HIV が変異を繰り返して多様性を獲得し、薬剤耐性能を得て慢性感染を持続させることは知られているが、多様性増加と感染持続の関連は不明である。

多様性の維持に関わる研究分野である群集生態学は、マクロな動植物の観察と仮説形成を中心に発展してきた。一方、データ駆動で近年著しく発展している微生物生態学の間には乖離が存在する。また、多様性の減少は動的な過程であるため、細菌群集の破綻は、ダイナミクスの観点から捉える必要がある。ダイナミクスを取り扱うことのできる数理モデル研究に期待は高まっているものの、微生物群集生態系の生来的な複雑性も相まって、現状では数理モデル研究が常在細菌叢の多様性減少と炎症性疾患発症の解明に十分貢献できているとはいえない。理論や知識は豊富に存在するが再現性・定量性に乏しい観察研究と、データは取れるが解釈に難を要するデータ駆動型研究の双方をつなぐ新しい数理科学手法が必要とされている。

そこで本研究では、実証を念頭に置いた理論の構築と応用を進めるため、構成要素の多様性が変化する系に対する、汎用的かつ新しい数理研究を展開した。多様性増加・減少によって発症する疾患を仮説検証の対象として、数理実験融合研究を展開した。

2. 研究成果

(1) 概要

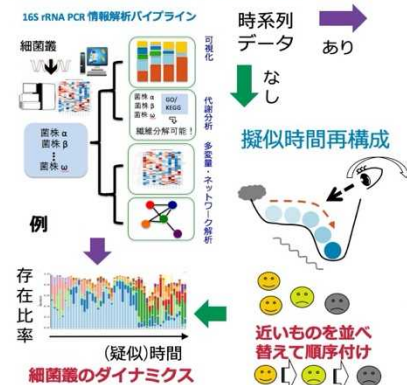
本研究では、構成要素の多様性が変化する系の数学理論を構築し、その応用として、皮膚や腸に常在する細菌叢の変動と疾患発症の関連性を明らかにする目的をもって研究を進めている。細菌叢のデータは直接数理モデルで利用できる形式ではないため、前処理として情報解

析が必要である。はじめに数理モデルを構築するために必要な細菌叢データの取得と、情報解析パイプラインの構築を中心に進めた。続けて、整備した情報解析パイプラインを具体的に運用し、数理モデル構築に必要な時系列データの解析を進めた。また、細菌叢の個体群ダイナミクスを記述した数理モデル構築とシミュレーションを進めた。特に、存在する種数が最大となる平衡点を求める問題を最適化問題として定式化する方法の開発を進めることで、ある解軌道の近傍に存在する平衡点を検出することができるようになった。開発手法で検出した平衡点の性質を更に調べることで、たとえば存続できずに消滅してしまう細菌種の候補をデータから推定することが可能になる。一方、時系列の細菌叢データはあまり取得されていないが非時系列データは大量に蓄積している現状を踏まえて、非時系列データからも発症時に経る典型的な経路を推定する手法（擬似時間再構成法）の開発と応用を進めた。また、構成要素の多様性減少を予測して制御する手段の一つとして、生物種が絶滅しないことを保証する概念であるパーマネンス理論に着目し、種が絶滅しない条件を数学的に明らかにした。以上の解析を組み合わせることで、たとえば腸内環境で起き得る大規模な摂動（食習慣の変化、抗菌剤服用、細菌叢移植）後に細菌叢の多様性が変化する過程で特に影響を受ける種を検出し、その種が存続し得るかを数理解析に基づく指標を用いて評価する理論的枠組みが整った（理論的枠組を構成する各要素は以下の図に概要を示す）。

研究のまとめ

これまでに進めてきた解析

細菌叢データ (塩基配列 ATGCT...) →
個体群データ (種A 5, 種B 3,...)



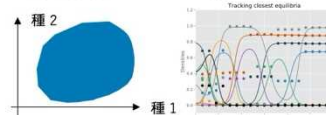
個体群モデルを利用 (微分方程式)

Lotka-Volterra 系を(改変して)利用

$$\frac{d}{dt}x_i(t) = x_i(t) \left(r_i + \sum_{j=1}^N a_{ij}x_j \right)$$

解軌道近傍の平衡点検出

$$\min_x \left\{ \frac{\epsilon}{\epsilon + \|x\|_1} + \gamma \|Ax + r\|_2 \right\} \text{ subject to } x \geq 0.$$

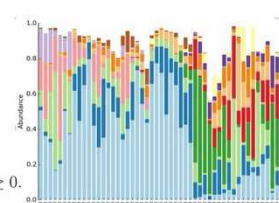


種の非絶滅 (パーマネンス) と侵入条件

$$\liminf_{t \rightarrow \infty} d(\Phi(t), \partial X_0) \geq \epsilon > 0.$$

細菌叢の多様性が変化する過程で特に影響を受ける種を検出し、その種が存続し得るかを数理解析に基づく指標を用いて評価する理論的枠組み

大規模摂動の例



食習慣の変化

高脂肪食摂取による肥満

抗菌剤投与

薬剤耐性菌の出現

細菌叢移植

ドナー (提供者) 由来の細菌叢を患者に移植することで、潰瘍性大腸炎など様々な疾患を治療

(2) 詳細

以下の課題 A) から D) に着手した。

A) 細菌叢データの取得、情報解析パイプライン構築と活用

【16S rRNA PCR アンプリコンデータの解析パイプライン構築と運用】皮膚や腸に常在する細菌叢のデータ (マイクロビームデータ) の多くは、公共データベースから取得可能である。ただし、データは延期配列で得られるため、膨大な塩基配列データから細菌叢の種構成や存在量を表す OTU (Operational Taxonomy Unit) テーブル (サンプル 1 中に細菌 A が 50 個

体、B が 20 個体、…、サンプル 2 中に細菌 A が 20 個体、…といった行列形式のデータ) に変換が必要である。研究の手始めとして、OTU テーブルを得るための情報解析パイプラインを構築し、数理解析が実施可能なデータを得るためのシステムを開発した。続けて、研究補助者の補助のもと、構築済みの情報解析パイプラインを用いて様々な細菌叢の公共データを取得・解析した(成果として、たとえば [1])。

【WSG メタゲノム情報解析パイプライン構築と運用】 上述の 16S rRNA PCR アンプリコンデータは、いわば細菌種それぞれのネームタグを用いて種構成や存在数を算出する方法である。しかしながら近年、ネームタグ(16S rRNA 領域)以外の全塩基配列を解読する(Whole Shot Gun: WSG) メタゲノム解析が普及しつつあり、ネームタグ以外の情報(たとえば食物繊維を分解できる酵素をもっているか等、細菌種の機能情報)に関するデータが得られるようになっていく。腸内細菌の複雑な相互作用に関する情報を取得して数理モデル構築に活用するため、WSG メタゲノム情報解析パイプラインの構築を行った。運用段階では、主にアレルギーとの関連が深い乳児期の細菌叢データを対象に多変量解析を実施し、たとえばアレルギー発症時に重要な役割を果たす因子(生物種もしくは代謝物)の候補選定を行った。

B) 細菌叢の個体群ダイナミクスを記述した数理モデル構築とシミュレーション

細菌叢の多様性が減少する過程を表現した数理モデルを構築するため、 N 次元の微分方程式系である一般化 Lotka-Volterra (LV) 方程式系の解析に着手した。一般化 LV 方程式系に対して、定常状態を表す平衡点は、相互作用行列 A 、内的自然増加率のベクトル r に対して、線形方程式 $Ax = -r$ (ただし $x \geq 0$) を解くことで得られる。一般に、LV 方程式系の平衡点は高々 $2N$ 個存在するが、細菌叢は N が 10^2 – 10^3 のオーダーであるため、全ての平衡点を求めるのは非現実的である。適切な生物学的解釈を導出できるようにするためには、細菌叢の動態も反映した平衡点を最適化問題の解として求められるような手法の提案が必要という結論に至った。そこで、微分方程式の数値解法を援用した最適化問題(Numerical Integration Guided ConVeX optimization: NIG-CVX)を提案することで、細菌叢の動態も反映した平衡点を最適化問題の解として求められるようになった。本課題と並行して、数理解析と数値シミュレーションを活用することで、細菌叢個体群数理モデルの解の定性的性質を調べる研究にも着手した。腸内細菌叢のデータが逐次的にモニタリング可能な場合、どのような制御が可能化かを時間遅れをもつ微分方程式系にて定式化し、数理解析を行った [2]。その他、微生物間の生態系相互作用の影響を考慮した時間遅れをもつ微分方程式系も考察し、数理解析を行った [3]。

C) 擬似時間再構成法の適用

皮膚や腸に常在する細菌叢の変動と疾患発症の関連性を明らかにするためには、細菌叢の状態が経時的に変化している状況を捉えた時系列データが必要である。しかしながら、現実的には時系列の細菌叢データはあまり取得されていない一方、非時系列データは大量に蓄積している。このような現状を踏まえた上で、膨大に蓄積している公共データの新たな活用方法を提案する必要性が生じた。そこで、一細胞レベルの計測データで活用されている手法から着想

を経て、現実的な問題の代替案となる打開策を検討することとした。具体的には、疾患状態や疾患進行中、もしくは健康な状態を反映した非時系列細菌叢サンプルを収集後、サンプルを類似性の近いものから順次並べることで、擬似的な疾患発症の時間発展を再構成する手法の検討と応用を進めた。TSCAN と呼ばれる擬似時間再構成法の1つを用いて、アレルギーとの関連が深い乳児期の細菌叢データを対象に解析を実施し、非時系列データ群からアレルギー発症時に想定される典型的な発症ルートの推定に活用した [4]。

D) 生物種の存続条件に関する数学的条件の検討

腸内環境で起き得る大規模な摂動（食習慣の変化、抗菌剤服用、細菌叢移植）後に細菌叢の多様性が変化する過程で特に影響を受ける種を検出するためには、該当種が摂動後に存続し続けるかどうかを調べることで理論上確認可能である。そこで、生物種が絶滅しないことを保証する概念であるパーマネンス理論に着目し、ある細菌種の存続に関して生物学的に解釈可能な数学的条件の導出に取り組んだ。その結果、ある平衡点に対して定義される線形化微分方程式の固有ベクトルの符号が、ある生物種が存続可能かどうかを決める重要な指標になることがわかった。具体的には、少なくとも1種が絶滅しているアトラクター（低次元の不変集合）がリペラーである条件と一致し、これを細菌種が存続し得るかの定量的指標として活用できることが明らかになった [5]。

3. 今後の展開

微生物群集を対象にした数理解科学的手法の開発を進めてきた本研究は、数理解科学に基づく新しい生命科学の研究として更に発展させていく。また、構築した理論研究の応用課題として、微生物が関わる医療、環境問題、農業分野と関連する基礎科学分野で役立つ理論フレームワークとして展開していく。具体的には、母子の健康に関わる腸内細菌を調べる取り組み（医療）、赤潮発生メカニズムの解明に向けた取り組み（環境問題）、受粉によって農業を支えるミツバチ個体数減少の原因を探る取り組み（農業）において、本研究で構築した理論フレームワークの活用を予定している。

4. 自己評価

本研究では、細菌叢の多様性が変化する過程で特に影響を受ける種を検出し、その種が存続し得るかを数理解析に基づく指標を用いて評価する理論的枠組みの構築を進めてきた。理論評価系を構成する各々の構成要素については完成したため、研究目的は概ね達成できたと考えている(研究成果 (2) 詳細参照)。

研究の進め方については、途中メンバー変更があったが、いずれの従事者も着実にデータ解析を中心とした補助業務を進めてくれた。腸内細菌叢の公共データの収集と解析が進み、手間がかかる本研究に必要な資材を得ることができた。研究費執行状況については、大きな費目間流用もなく、計画通りに執行した。以上、研究の進め方については順当な運用ができたと考えている。

微生物群集を対象にした数理解科学的手法の開発を進めてきた本研究成果は、数理解科学を用いた新しい生命科学の研究という位置づけに加えて、[3. 今後の展開]で紹介したように、微生物が関わる医療、環境問題、農業分野と関連する基礎科学分野においても、社会・経済

面でも波及効果が見込まれる。将来的に社会実装や経済へ貢献する点においても、十分な下準備ができたと考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Shinji Nakaoka, Detection of responding factors to external perturbation in a microbial community, *Proc. of International Symposium on Nonlinear Theory and Its Applications, NOLTA2017*, 116–119.
2. Yueping Dong, Moitri Sen, Malay Banerjee, Yasuhiro Takeuchi and Shinji Nakaoka, Delayed feedback induced complex dynamics in an *Escherichia coli* and *Tetrahymena* system, *Nonlinear Dynamics*, **94**(2), 1447–1466 (2018)
3. Yueping Dong, Yasuhiro Takeuchi, Shinji Nakaoka, Multiple delayed feedback regulation system of the gut microbiota – antibiotics injection controlled by measured metagenomics data, *Nonlinear Analysis RWA.*, Volume 43, 1–17 (2018).
4. 原 朱音, 中岡 慎治, 合原 一幸 (2018). アレルギー発症に関わる腸内細菌叢のビッグデータ解析, 生産研究 70 巻 3 号 p.141–144.
5. Shinji Nakaoka, Mathematical description for invasibility threshold and persistence of pathogenic bacterial species, *Proc. of International Symposium on Nonlinear Theory and Its Applications, NOLTA2018*.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件 (公開前の出願件名については件数のみ記載)
なし

(2) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表 (海外での招待講演)

- Shinji Nakaoka, Mathematical and informatics analysis of community composition change of the gut microbiota, INTERNATIONAL WORKSHOP ON MATHEMATICAL BIOLOGY, Cebu, Philippine, 2018.
- Shinji Nakaoka, Trajectory inference of disease onset from non-time series microbiome datasets, South Lake Workshop in Bioinformatics and System Biology, 武漢理工大学, 中国, 2018.

著作物

- Shinji Nakaoka, Data-driven mathematical modeling of microbial community dynamics, *Handbook of Statistics Vol.39 Part A*, pp.93–130 (2018).

プレスリリース

- ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の新しい感染維持機構を解明 – HTLV-1 による白血病の発症機序解明と発症予防への応用に期待 –
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2017/180123_1.html
- コア共生微生物で持続可能な農業生態系を設計する – 微生物叢の機能を最大化する

新たな科学的戦略を提案－

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2018/180501_2.html