

## 研究報告 2018 (KISTEC Annual Research Report, 2018)

### 【研究開発部】

#### 有望シーズ展開事業

##### 「腸内細菌叢」プロジェクト

##### 解析ツール開発グループ

- ◆総括..... 103

プロジェクトリーダー兼グループリーダー 大野 博司

- ◆業績..... 107

##### 腸内環境制御グループ

- ◆総括..... 109

腸内環境制御グループグループリーダー 福田真嗣

- ◆腸内環境制御基盤技術の開発に向けた難培養性腸内細菌の培養法確立および生体に与える影響の評価  
..... 112

中藤 学

- ◆業績..... 115

# 腸内細菌叢プロジェクト

解析ツール開発グループ

プロジェクトリーダー兼グループリーダー 大野 博司

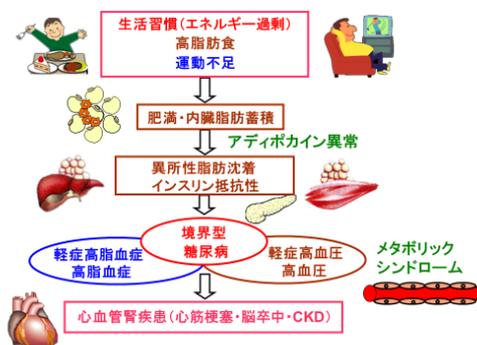
## 【基本構想】

我が国において糖尿病患者は増加の一途をたどり、高齢者における主要な疾患である。糖尿病に肥満・高脂血症・高血圧が合併するメタボリックシンドロームはその心血管合併症により日本人の健康寿命を短縮する最大の原因として、大きな社会的・経済的問題である。最近腸内細菌と肥満、2型糖尿病といった生活習慣病との関連が動物やヒトで報告され、これが肥満や2型糖尿病の誘因の1つとなっているのではないかと考えられている。従って摂取する栄養素やエネルギー状態によって変化する腸内細菌叢を捉えることができれば、肥満や2型糖尿病などの生活習慣病の発症予測や治療に役立つと考えられる。本研究では、摂取する栄養素やエネルギー状態の把握とメタゲノム解析による腸内細菌の菌種や機能といった包括的な解析に加え、遺伝的背景を加味し、そのデータを横断的に解析することにより、食習慣、腸内細菌叢、生活習慣病発症の相互関係を明らかにすることを目的とする。具体的には、東京大学附属病院の検診受診者で20歳から75歳までの男女から肥満者100名、耐糖能異常者100名、肥満も耐糖能異常もない者計100名の合計300名のボランティアを募集した。解析項目は、(1)簡易型自記式食事歴法質問票(BDHQ)を用いた食事調査と活動量計を用いた身体活動量の測定、(2)腹部エコーを含む臨床データ(3)血中アディポカインの測定、(4)腸内細菌叢の16S・メタゲノム解析、(5)血中・糞便中のメタボローム解析、(6)単核球を用いたトランスクリプトーム解析、(7)全ゲノムシーケンスによる遺伝子多型解析、であり、これらのデータをもとに、統合データベースの作成と解析ツールの開発を行う。これにより、どのような腸内細菌叢が生活習慣病発症に重要な役割をしているかが明らかになることが期待され、それを元にさらに新規バイオマーカーなどの開発や予防薬、個別化医療といった新しい予防法やリスク診断の実現を目指す。

## 1. 研究背景

我が国において糖尿病患者は増加の一途をたどり、罹患患者数は約950万人を数えるに到っている。糖尿病は高齢者における主要な疾患であり、糖尿病に肥満・高脂血症・高血圧が合併するメタボリックシンドロームは動脈硬化を促進し、心筋梗塞・脳卒中のリスク増大を介して日本人の健康寿命を短縮する最大の原因となっており(図1)、大きな社会的・経済的問題である。

図1 エネルギー過剰の生活習慣は内臓脂肪蓄積・インスリン抵抗性を介しメタボリックシンドローム・心血管疾患の原因となる



最近腸内細菌と肥満、2型糖尿病といった生活習慣病との関連が動物やヒトで報告され、高脂肪食などエネルギー過剰な状態では、通常より効率的にエネルギー源を獲得できる腸内細菌が増加し、増加した腸内細菌により慢性的な炎症などが惹起され、このことが肥満や2型糖尿病の誘因

の1つとなっているのではないかと考えられている。従って摂取する栄養素やエネルギー状態によって変化する腸内細菌叢を捉えることができれば、肥満や2型糖尿病といった生活習慣病の発症予測や治療に役立つと考えられる。

2型糖尿病と腸内細菌に関しては、2012年に中国から2型糖尿病に関わる約60,000種類の最近遺伝子マーカーが発見され、特に2型糖尿病患者で *Clostridium* 属や *Bacteroides* 属の細菌が優位であること、また2型糖尿病患者では、腸上皮バリア機能の保持に重要な役割を果たす酪酸の生合成に関わる細菌叢が減少しており、逆に酸化ストレスに対し保護的に働くカタラーゼなどの還元酵素と逆相関することが明らかとなっている<sup>1</sup>。2013年にはこのコホートにおいて70歳時の正常耐糖能者、耐糖能異常者、2型糖尿病の比較解析から *Clostridium* 属、*Ruminococcus* 属、*Faecalibacterium* 属が正常耐糖能者で優位に、*Lactobacillus gasseri* が2型糖尿病患者で優位であることが見出され、さらに酪酸を産生する腸内細菌の数が健康な女性に比べ減少していることが報告された<sup>2</sup>。また境界型糖尿病が正常耐糖能に近いグループと2型糖尿病に近いグループに分類できることが明らかとなった。さらにヨーロッパ人と中国人のコホートで糖尿病の同定につながるメタゲノムマーカーが異なることが示唆された。このように腸内細菌叢には民族差が認められ、同じアジア人でも健康者において中国と日本で異なる腸内細菌叢を有していることが報告されている<sup>3</sup>。腸内細菌は食事によっても大きな影響を受けることから、食事を加味した腸内細菌と

2型糖尿病の関連を明らかにしていくと同時に、その代謝産物や血中のRNAseqデータなどを加味した日本人の2型糖尿病における腸内細菌叢のプロファイルを明らかにしていくが重要である。我々はこれまでに腸内細菌叢、2型糖尿病発症メカニズム、メタボローム解析を用いた脂質代謝調節といったメカニズム解析を行ってきており十分な成果を見出してきており<sup>4-6</sup>、本研究を行うに辺り十分な素地が備わっている。

そこで本研究では、摂取する栄養素やエネルギー状態の把握とメタゲノム解析による腸内細菌の菌種や機能といった包括的な解析に加え、遺伝的背景、代謝産物データを加味し、そのデータを横断的に解析することにより、食習慣、腸内細菌叢、生活習慣病発症の相互関係を明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究では、摂取する栄養素やエネルギー状態の把握とメタゲノム解析による腸内細菌の菌種や機能といった包括的な解析に加え、遺伝的背景を加味し、そのデータを横断的に解析することにより、食習慣、腸内細菌叢、生活習慣病発症の相互関係を明らかにすることを目的とする。研究対象者は、東京大学付属病院の検診受診者で20歳から75歳までの男女の中から、肥満者100名、耐糖能異常者100名、肥満も耐糖能異常もない者計100名の合計300名のボランティアである。また2週間以内に何らかの抗生物質を投与あるいは内服した者、何らかの消化器系の薬を内服している者、糖尿病治療薬を内服している者、3ヶ月以内に体重が3kg以上増減した者は、腸内細菌叢に影響を与える可能性が大きいためリクルートから除外した。解析する項目は、(1)簡易型自記式食事歴法質問票(BDHQ)を用いた食事調査と活動量計を用いた身体活動量の測定、(2)腹部エコーを含む臨床データ、(3)血中アディポカインの測定、(4)腸内細菌叢の16S・メタゲノム解析、(5)血中・糞便中のメタボローム解析、(6)単核球を用いたトランスクリプトーム解析、(7)全ゲノムシーケンシスによる遺伝子多型解析である。本研究では、これらのデータを元に統合データベースの作成と解析ツールの開発を行う。これにより、どのような腸内細菌叢が生活習慣病発症に重要な役割をしているかが明らかになると期待され、さらにそこから新規バイオマーカーなどの開発や予防薬、個別化医療といった新しい予防法やリスク診断の実現を目指す。

## 3. 研究の成果

(1) 簡易型自記式食事歴法質問票(BDHQ)を用いた食事調査と活動量計を用いた身体活動量の測定  
 本年7月よりリクルートを開始した。現地点で131名をリクルートし、現在110名の同意を得ることができており、同意取得率83.9%と順調に経緯していると考えている(図2)。またBDHQと活動量計については、今後の食習慣や身体活動量の参考にしていただくために、その一部のデータを被験者に返却した。

(2) 腹部エコーを含む臨床データ

図2 食習慣と活動量のリクルート状況

Month	同意なし	同意あり	肥満も耐糖能異常なし	肥満者	耐糖能異常者	同意取得率(%)	Total/M
Jul/17	1	17	3	4	10	94.4	18
Aug/17	3	15	3	7	5	83.3	18
Sep/17	3	11	3	4	4	78.6	14
Oct/17	5	16	7	5	4	72.2	21
Nov/17	2	18	8	7	3	89.5	20
Dec/17	3	10	0	8	4	76.9	13
Jan/18	1	10	5	2	2	90.9	10
Feb/18	1	7	4	1	2	87.5	8
Mar/18	3	6	3	1	2	66.7	9
Total	22	110	36	39	36	83.9	131

同意撤回者/糞便未提出者/解析困難者が9名存在し、肥満も耐糖能異常もない者106名、肥満者97名、耐糖能異常者(肥満+非肥満者)100名のサンプル採取が終了するとともに、腹部エコーを含む臨床データを取得することが出来た。

### (3) 血中アディポカインの測定

303名分に対しAdiponectin, MCP-1, CRPといった血中のアディポカインの測定を終了した。

### (4) 腸内細菌叢の16S・メタゲノム解析

肥満も耐糖能異常もない者106名、肥満者97名、耐糖能異常者(肥満+非肥満者)100名の糞便検体を用いて、リゾチーム・アクロモペプチダーゼ・プロテイナーゼKの酵素処理による溶菌、フェノール・クロロホルムによるDNA抽出後、16S rRNA遺伝子のV1-2領域をPCRで増幅しシーケンシングを行った。その結果、 $\alpha$ 多様性には変化が認められなかったが、門レベルで肥満群でのBacteroidetesの増加、ならびに耐糖能異常群でのBacteroidetesの減少を認めた。更に肥満群ではActinobacteriaが増加傾向であった。Indicator species analysisにて菌種の比較を行ったところ、耐糖能異常群で*Lactobacillus mucosae*、*Prevotella sp.*などが増加していた。

### (5) 血中・糞便中のメタボローム解析

健康者(107人)、肥満者(99人)、耐糖能異常者(100人)の糞便から水溶性代謝物と短鎖脂肪酸を抽出しメタボローム解析を行った結果、全サンプルから237物質を同定した。代謝物の全体的な傾向を調べるため、主成分分析(PCA)による比較を行ったが、PCAのスコアプロットは各被験者のグループごとに分離されず水溶性代謝物の全体像は3群間で大きな違いはなかった。次にANOVAによる統計検定を行い、3群間で有意差のある代謝物を調べたところ22物質が3群間で違いが見られた。さらに、臨床データと水溶性代謝物との相関解析を行った結果、耐糖能異常者では空腹時血糖とヘモグロビンA1cが高い事が診断基準となるが、これらの数値と相関が高い代謝物はArginine、Glutamine、Hydroxylamine、Hydroquinone等であった。また、肥満者では体重、BMI、腹囲等が診断基準となるが、これらの数値と相関が高い代謝物には糖類やポリアミンが含まれていた。

短鎖脂肪酸以外の脂溶性代謝産物については、健常者(50人)、肥満者(50人)、耐糖能異常者(50人)の糞便から抽出しノンターゲット法によるメタボローム解析を行った。Peak alignmentにより測定に耐えうるサンプルのみをMS/MS解析したところ、693物質を同定した。さらに各群で2倍以上変化があり、P値が0.05を下回ったものは55物質であった。

(6) 単核球を用いたトランスクリプトーム解析

正常者、肥満患者、糖尿病予備群(IGT)を含む合計200名の末梢血単核細胞から、RNAを抽出しCAGE遺伝子発現解析を行い、疾患バイオマーカーの同定を行った。正常者に比べ肥満患者・糖尿病予備群で発現量が上昇した遺伝子には、免疫細胞のシグナル伝達に重要なPTPN6(SHP1)、2型糖尿病のリスク遺伝子であるTCF7L2など疾患との関連性が報告されているものが複数含まれていた。

(7) 全ゲノムシーケンスによる遺伝子多型解析

肥満も耐糖能異常もない者20名に対してイルミナ社TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep Kitを用いてライブラリーを作製後、イルミナ社のHiSeqXを使用して全ゲノムシーケンスを行った。ライブラリーの両側から配列を151bp、1サンプル当たり45Gbp以上を解読した。

(8) 統合データベースの作成と解析ツールの開発

臨床データとその解析から得られたデータをハードウェアレベルから分離し保存することができるようにし、緊急時に備えデータのセキュリティ問題に機敏に対応できるようにした。また、外部からのセキュリティの危険およびシステムトラブルにスムーズに対応できるようにOS(オペレーティング・システム)レベルでのサーバ仮想化を導入して各システムを分離して運営することができるように構成した。メインのウェブプラットフォームの構築前にデータ収集のため使用可能なウェブ基盤のファイルブラウザを構築してデータ収集に利用することができるように準備した。さらにデータに対しては約200人のアディポサイトカインデータおよび約100名分の臨床プロファイリングデータ収集を完了した(図3)。

図3 統合データベースのとそのを用いた解析のためのプラットフォームの構築(進行中)



4. 今後の研究計画

(1) 簡易型自記式食事歴法質問票(BDHQ)を用いた食事調査と活動量計を用いた身体活動量の測定

東京大学検診部や病態栄養治療部の現場スタッフと密に連携し、クレームへの対応を検討するとともにリクルート率の向上を図っていく。

(2) 腸内細菌叢の16S・メタゲノム解析

糞便からのDNA抽出効率を上げるとともに各群100名の検体を収集し腸内細菌叢を解析後、各種臨床パラメーターやメタボローム解析結果との相関解析やクラスター解析を行う。

(3) 血中・糞便中のメタボローム解析

血清中のアミノ酸や短鎖脂肪酸濃度についても測定していく。解析したデータについて、個々人の糞便中のアミノ酸や短鎖脂肪酸濃度との相関解析を行うとともに、腸内細菌叢との関連解析を行い、これらの代謝物の変化と関連する細菌を探索する。さらに脂溶性代謝産物に関しては、解析サンプル数を増加させるとともにノンターゲット法で候補になった物質に関して、ターゲット法を用いて精度を上げて測定していく。

(4) 単核球を用いたトランスクリプトーム解析

複数の遺伝子発現量の組み合わせ、さらにマイクロバイオーム、メタボロームデータを組み込むことで、より高い確率で正常者と肥満・糖尿病予備群を識別できるアルゴリズムの開発に取り組む。これらの遺伝子は、疾患メカニズムに関わっている可能性もあることから、今後ノックアウトマウスなどを用い疾患との因果関係を検証していく。

(5) 全ゲノムシーケンスによる遺伝子多型解析

統合データベースおよび解釈プラットフォームをそれぞれのサブパートに分けてモジュール化し、臨床データおよび解析データを安全に保存し便利な使用環境と融通性ある活用が可能となる統合データベースおよび解析プラットフォームの構築を行う。

5. 参考文献

1. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 49:55-60, 2012.
2. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, Nielsen J, Bäckhed F. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 498:99-103, 2013.
3. Nishijima S, Suda W, Oshima K, Kim SW, Hirose Y, Morita H, Hattori M. The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Res*. 2:125-133, 2016.
4. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y,

Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469:543-547, 2011.

5. Endo J, Sano M, Isobe Y, Fukuda K, Kang JX, Arai H, Arita M. 18-HEPE, an n-3 fatty acid metabolite released by macrophages, prevents pressure overload-induced maladaptive cardiac remodeling. *J Exp Med* 211, 1673-1687, 2014.

6. Kubota T1, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, Nishimura S, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Moroi M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K, Kadowaki T. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab*;13:294-307, 2011.

## 業 績

### 【原著論文】

なし

### 【総説】

1. 窪田哲也 肥満に伴う高インスリン血症がマクロファージの適応障害を誘導しインスリン抵抗性を惹起する。  
適応医学 20(2) 2-7

### 【書籍】

なし

### 【口頭発表】

1. 大野博司 腸内細菌叢と免疫について 日本動物用医薬品協会 第49回学術講習会 2017年9月22日 東京
2. 大野博司 腸内細菌叢と疾患・生体防御 第45回日本臨床免疫学会総会(合同シンポジウム1) 2017年9月28日 東京
3. 大野博司 腸内細菌叢と疾患・生体防御 第39回日本臨床栄養学会総会・第38回日本臨床栄養協会総会 第15回大連合大会ワークショップ 2017年10月14日 千葉
4. 大野博司 腸マイクロバイオームと疾患・生体防御・免疫 第49回日本小児感染症学会学術集会 特別講演 2017年10月21日 金沢
5. 大野博司 腸内細菌が健康と病気に及ぼす影響「長野ブランド郷土色」平成29年度第2回公開シンポジウム 2018年1月15日 長野
6. 窪田哲也 肥満におけるマクロファージ Irs2 の役割の解明 第32回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 2017年2月23日 名古屋

### 【特許】

- (1) 国内特許出願 0件
- (2) 国外特許出願 0件



# 腸内細菌叢プロジェクト

腸内環境制御グループグループリーダー 福田真嗣

## 【基本構想】

本プロジェクトは、近年増加傾向にある様々な疾患と関連が示唆されている腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に制御することにより、腸内環境のバランスの悪化が起因となる疾患の予防や治療につながる腸内環境制御システムの基盤構築を目的とする。

ヒトの腸管内にはおよそ 1,000 種類、100 兆個にも及ぶとされる腸内細菌が生息している。正常なバランスを保っている腸内細菌叢は外部から侵入する外来細菌の定着を防いだり、宿主免疫系を活性化したりする。しかし、腸内細菌叢のバランスの乱れは大腸炎や大腸がんといった腸管関連疾患のみならず代謝疾患、自己免疫性疾患などの発症にも関連することが報告されている。遺伝子解析技術の進歩により、腸管内に生息する細菌叢の構成、種類などが明らかになってきたが、生息する個々の腸内細菌が果たす役割もしくはその培養方法に関しては研究途上となっている。また、腸内細菌叢由来の代謝物質が宿主の健康維持や疾患に深く関与していることが示されてきたが、それらがどのような腸内細菌により産生されているかは不明な点が多い。

腸内細菌叢を含む、腸内環境を適切に制御するためには個々の腸内細菌の特性を理解し、腸内細菌叢由来の代謝物質や菌体自身が宿主へ与える影響を知ることが重要となる。腸内細菌が主に生息する大腸は嫌気性環境であり、腸内細菌叢を構成する細菌のほとんどは偏性嫌気性細菌に区分されている。これまで、専用の培養容器と脱酸素・炭酸ガス発生剤を組み合わせた簡易的な嫌気環境下やグローブボックスなどの嫌気培養装置を使用した腸内細菌の単離培養も進んでいる。また、腸内細菌の単離培養に使用することができる培地もいくつか市販されている。しかしながら、標的腸内細菌の培養が困難なケースが報告されるなど、腸内細菌の培養技術については改善が必要とされる部分も数多く残されている。ゆえに難培養性腸内細菌の培養技術の開発が最優先課題となる。そこで、本プロジェクトの鍵となる腸内環境制御システムの構築を行うために (1) 難培養性腸内細菌の新規培養方法の確立する (2) 難培養性腸内細菌単独定着マウスを作製し、それらが宿主に与える影響を解析する。これらの研究を遂行することで、腸内環境制御を行うための創薬やサプリメント、機能的食品の開発につながり、健康維持、疾患予防および新規治療方法開発に貢献できると考えている。

## 1. 研究目的

プロジェクト初年度となる平成 29 年度は以下の各項目を重点項目として定めた。

### (1) 腸内細菌基準株の安定的培養技術の確立

腸内細菌叢を構成している個々の腸内細菌を得るためには主に二つの方法がある。一つ目は、実際に腸内細菌叢が含まれているヒトやマウスの便試料を培地プレート上に播種し、コロニーを形成させ、単離する方法である。二つ目は微生物バンクに登録されている腸内細菌基準株を入手し、培養する方法がある。腸内細菌基準株はいくつかのバイオリソースセンターから入手することができるが、日本国内において腸内細菌を含む微生物基準株は理化学研究所バイオリソースセンター (以下理研 BRC とする) 内の微生物材料開発室に保管、登録されている (図 1, URL: <http://jcm.brc.riken.jp/ja/>)。

これらの登録されている微生物株は基準を満たす研究設備を備えた上で、必要な手続きを行うことで購入することが可能である。本プロジェクトを遂行するにあたり、先行研究において蓄積してきたヒトおよびマウスの腸内細菌

叢の解析データと過去の論文報告などを照らし合わせることで重要度が高い腸内細菌を選定してきた。本リストに含まれる入手可能な腸内細菌基準株は理研 BRC より購入し、今後の研究に向け嫌気チャンバー内にて安定的かつ容易に培養する方法を模索してきた。



図 1 理研 BRC 微生物材料開発室のホームページ  
微生物株の提供のみならず、寄託・譲渡も依頼することができる (URL: <http://jcm.brc.riken.jp/ja/>)。

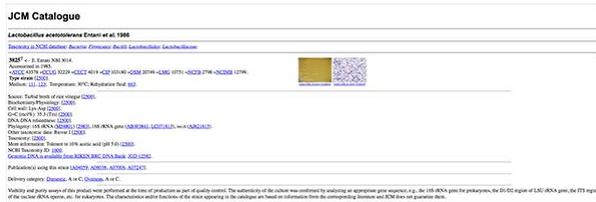


図2 腸内細菌基準株の検索結果の一例、個々の基準株の基本的情報を得ることができる

(2) 新規ヒト由来腸内細菌の単離、培養技術の確立

ヒトやマウスの腸内細菌叢において主要な割合を占める腸内細菌に関しては基準株として単離されているものが多い。その一方で、腸内細菌叢の中で割合が低く、数が少ない腸内細菌の単離、培養は難しく培養の工夫や新規培養法の開発が必要となってくる。腸内細菌の多くは偏性嫌気性細菌に分類され、培養中に酸素が混入してしまうと死滅することもある。このような腸内細菌を失わないためには単離、培養する際に、培養環境中の酸素を可能な限り除去することが必要となる。また、我々の体内には食物由来する多くの栄養素や未消化物が存在しており腸内細菌はそれらを栄養源として増殖している。そのため細菌の増殖に必要な栄養等を添加した新たな培地を作製することも重要となる。

腸内細菌の培養ノウハウを得るために腸内細菌叢解析の研究拠点である慶應義塾大学先端生命科学研究センターと協力し、嫌気性培地作成方法の確立および嫌気性チャンバーのセットアップを実施した。はじめに、理研 BRC より入手した腸内細菌基準株の中でも厳密な嫌気環境下でしか生育できない腸内細菌を用いて、実際に嫌気環境が構築できているか否かを検討する。嫌気環境下での培養条件が整ったところで、実際に健康人の便試料からの腸内細菌の単離を試みた。

(3) 腸内細菌単独定着マウスの構築に向けた共同研究契約の締結および共同実験の開始

先の項目でも記したように慶應義塾大学先端生命科学研究センターでは数多くの腸内細菌叢の解析やその代謝物の網羅的解析を実施している研究機関である。また、慶應義塾大学の湘南藤沢キャンパスでは実験動物を用いた機能性食品の評価を行っている。これらの研究ノウハウは本プロジェクトを円滑に進めていくための強力なツールと考え、共同研究契約を締結し、互いの研究ノウハウを融合させることで新規腸内細菌の分離培養技術の構築を試みることにした。

単離、培養方法が確立した腸内細菌が生体に与える影響を評価するためには、腸内細菌単独定着マウスを構築し、代謝物の網羅的解析や腸管上皮細胞、免疫細胞の組成や数を検討する必要がある。本プロジェクトの拠点である川崎生命科学・環境センター (LiSE) には実験動物の維持、繁殖、実験を実施するための施設が備わっていない。そこで隣接する公益財団法人 実験動物中央研究所 (以下 CIEA と

する) と連携して本プロジェクトを遂行することにした。CIEA は実験動物の維持、供給、個体復元を担い、実験動物に関するあらゆるノウハウを有する国内屈指の研究機関である。本プロジェクトの必要となる腸内細菌単独定着マウス作成に必要な無菌マウスの繁殖及び維持方法が確立されているため、共同研究を実施することにした。

2. 研究成果

平成 29 年度は以下に挙げる具体的な研究成果を得ることができた。実験方法、結果の詳細は研究員報告書に記載するため要点を示す。

(1) 腸内細菌基準株の安定的培養方法の確立

独自に作成した腸内細菌株のリストを元に、理研 BRC から入手可能な腸内細菌基準株 40 種類 (グラム陽性菌 25 種類、グラム陰性菌 15 種類) を入手した。本年度はそのうち 34 種類の腸内細菌基準株の培養を嫌気チャンバー内で試みた。はじめに嫌気性菌の一般的な培養に広く用いられている GAM ブイヨンを用いて寒天培地、液体培地を作成し、腸内細菌基準株の培養を実施した。検討を行った 34 種類の腸内細菌基準株のうち、18 種類のグラム陽性菌、9 種類のグラム陰性菌の安定的な培養に成功した。一方で、いくつかの腸内細菌基準株は GAM ブイヨン培地で増やすことができなかった。そこでより栄養素が豊富に含まれている YCFA 培地をベースにさらにいくつかの栄養素を加えた改良型 YCFA 培地を作製し、これらの培養を試みた。その結果、さらに 3 種の腸内細菌基準株の培養に成功し、平成 29 年度は合計 30 種類の腸内細菌基準株の安定的培養方法を確立できた (表 1)。

一方で、4 種類の腸内細菌基準株に関しては GAM 培地、改良型 YCFA 培地のどちらでも培養することができなかった。これらの腸内細菌基準株に関しては、引き続き組成の異なる培地を用いて安定的な培養方法の確立を目指していく。また、本年度内に培養検討ができなかった 6 種類の腸内細菌基準株に関しても、同様に培養の確立を試みる。

	基準株入手数	培養成功数	培養検討中
グラム陽性菌	25	20	5
グラム陰性菌	15	10	5

表 1 H29 年度の腸内細菌基準株の培養状況

(2) 新規ヒト由来腸内細菌の単離、培養技術の確立

嫌気培養に向けた準備のため、嫌気チャンバーおよび嫌気性培地の作成のための脱酸素ユニット装置のセットアップを行った。次に、脱酸素ユニットを用いて炭酸ガスを添加しながら嫌気性培地を作成し (図 3)、嫌気チャンバー内において厳密な嫌気環境下でしか生育できない腸内細菌基準株の培養を行った。その結果、培養 24 時間以降に腸内細菌基準株の増殖が目視でも確認され、嫌気環境が正常に構築されていることを確認することができた。

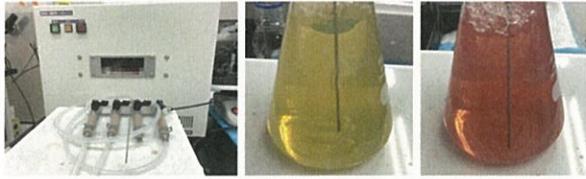


図 3 脱酸素ユニットの外観図および作成した嫌気培地の様子。指示薬が添加されており、酸素がない状態では培地は黄色を呈しているが、酸素の混入があると赤色を呈する。

次にヒト便試料からの腸内細菌を単離、培養するための方法の検討を実施した。便試料は腸内細菌叢のみならず食物の未消化物なども含まれている。いくつかのフィルターを通すことにより、腸内細菌叢のみを残す手法を確立した。夾雑物を取り除いた腸内細菌叢の懸濁液を嫌気培地プレート状に播種し、嫌気チャンバー内にてコロニーを形成させた。形成されたコロニー群から単コロニーを分取し、液体培地内にて培養を継続した(図4)。増幅が確認されたものはDNAを抽出し、その配列をシーケンス解析することで、菌種の同定を行った。本年度は本手法により2種類の腸内細菌をヒト便試料より単離できた。本年度は、ヒト由来試料の使用のための申請準備を進めている途中であったため、本実験は共同研究先である慶應義塾大学先端生命科学研究所にて実施した。次年度の早い段階での認可が得られる見通しであるため、双方の研究室で本実験を行うことにより、一つでも多くのヒト由来腸内細菌の単離を目指す。

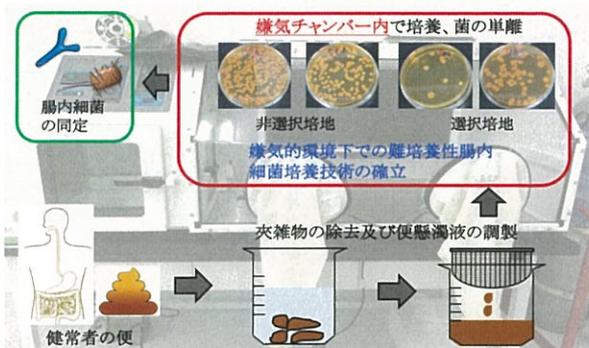


図 4 ヒト由来糞便試料からの腸内細菌叢の単離の流れ

(3) 腸内細菌単独定着マウスの構築に向けた共同研究契約の締結および共同実験の開始

本グループの研究室整備および研究に必要な各種申請書類の認可と並行して慶應義塾大学およびCIEAとの研究に必要な書類の準備を開始した。プロジェクト開始当初より定期的な打ち合わせを重ねることで両研究施設との共同研究契約を早急に締結することができた(図5)。共同研究締結後、CIEAにおいて動物実験に従事する本プロジェクトスタッフは教育訓練を受講し、実際に単独腸内細菌を維持するためのビニールアイソレーター内で動物飼育や実験手技の訓練を重ねることにより、単独腸内細菌定着マウス構築のための実験ノウハウの取得が完了している。次

年度以降からは、単独腸内細菌マウスの構築をはじめとする動物実験を実施していく。

共同研究先との綿密な連携はプロジェクトを推進していく上で重要な項目となる。CIEAは隣接しているため、研究ディスカッションも容易に行うことが可能である。一方で、慶應義塾大学の両研究施設は距離も離れており、互いの研究施設での打ち合わせをする機会が少なくなってしまう。そのため常時オンラインで互いの研究室を繋ぐことにより円滑にコミュニケーションを取れる環境を整備した。



図 5 本プロジェクトの研究協力体制

平成 29 年度は本プロジェクト初年度のため、各種手続きや研究設備が当初の予定よりも長くかかってしまったものの、共同研究先との綿密に連携をとることにより本年度に実施予定であった研究目標を概ね達成することが出来た。一部、達成できなかった項目に関しては次年度の早い時期に完了させ、来年度は研究目標以上の成果を達成できるように尽力していく。

# 腸内環境制御基盤技術の開発に向けた難培養性腸内細菌の 培養法確立および生体に与える影響の評価

中藤 学

## 1. はじめに

我々は生後すぐに外部の環境に触れることにより微生物との共生関係が始まる。体内にありながら外界とも繋がる消化管内も例外ではない。ヒトの腸管にはおよそ 1000 種類、100 兆個のも腸内細菌が生息しており、地球上のあらゆる環境の中で最も生物の生息密度が高い場所となっている。腸内細菌同士は互いに生存競争を続けながらも、一定のバランスを保つことで腸内細菌叢を形成している。食生活の変化が大きい乳幼児期では腸内細菌叢の変動も大きくなるが、成人になると日々の食事や生活様式により多少の変動はあるものの腸内細菌叢は安定した状態となる(参考文献 1)。

### 1. 1 腸内細菌叢が宿主に与える影響

共生関係を構築している腸内細菌叢は宿主に利益をもたらしている。我々は生存に必須な食事、呼吸により常に外来抗原が体内へと侵入するリスクを抱えている。腸内細菌叢は消化管内に侵入してくるこれらの外来性抗原の定着を防ぐ役割を果たしている。また、腸内細菌は食物由来の未消化物を栄養源として発酵分解し、その際に代謝産物として低分子を菌体外に放出する。腸内細菌由来代謝産物は腸管上皮細胞のエネルギー源となるだけではなく物理的バリアの構築に寄与し腸管上皮細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしている(参考文献 2)。更に、一部の腸内細菌由来代謝産物は宿主の免疫機能を活性化する。例えば、腸内細菌叢を構成するクロストリジウム目細菌群が食物繊維を代謝発酵し産生される酪酸は、炎症やアレルギーの起因となる過剰な免疫応答を抑制する T 細胞である制御性 T 細胞の増幅に重要な役割を果たしている(参考文献 3、4)。

その一方で、ストレスや生活習慣の乱れにより腸内細菌叢のバランスが崩れることが疾患につながることもある。実際に腸内細菌叢の乱れが大腸がんや大腸炎などの腸管関連疾患のみならず、糖尿病、動脈硬化、自閉症、アレルギー疾患など多岐にわたる疾患の発症にも関連することが報告されている(参考文献 5)。また、バランスの乱れた腸内細菌叢由来の代謝物質も、これらの疾患を引き起こす要因となっている(参考文献 6)。ゆえに、腸内細菌叢を含む腸内環境を正常に保つことは健康維持にとって重要な要素になる。

### 1. 2 個々の腸内細菌を対象とした研究の重要性

## と課題

次世代シーケンサーの急速な発展および解析方法の進歩により、個人個人の腸内細菌叢の構成、種類および経時的変化は明らかとなってきた。項目 1.1 で述べてきたように腸内細菌叢由来の代謝物質は宿主の健康維持に重要な要素となってくるのみならず、疾患とも深く関わるものが明らかとなってきた。しかしながら、それらの代謝物質が腸内細菌叢を構成するどの腸内細菌由来するものであるかの特定に関しては研究途上となっている。そのため個々の腸内細菌の特性や代謝物質を理解することが重要である。しかしながらこれらに関する研究報告数が少ない一番の理由は、腸内細菌の培養方法が十分確立されていないことが挙げられる。腸内細菌はその多くが偏性嫌気性細菌に分類されており、少量の酸素の混入により生育が阻害されてしまう。これまで嫌気ジャーと酸素吸収・炭酸ガス発生剤であるアネロパック・ケンキによる簡易的嫌気環境下やグローブボックスなどの嫌気培養装置を利用した腸内細菌の培養も進んでいる。しかしながら、標的としている腸内細菌の培養ができないなどの例もあり、腸内細菌の培養方法には改善すべき項目も多く残されている。

### 1. 3 腸内環境制御基板技術の構築に向けて

腸内細菌叢を含む腸内環境を意のままに制御できる基盤技術の構築は、我々の健康維持や疾患予防に有効な手段となる。このような基盤技術を構築するためには、以下に示す 3 つの課題に取り組む必要がある

1. 腸内細菌の安定的な大量培養方法の確立
2. 難培養性腸内細菌の新規培養技術の開発
3. 難培養性腸内細菌定着マウスを作製し、腸内細菌が生体に与える影響の評価

個々の腸内細菌に関する基礎データの蓄積は、腸内環境制御基盤技術に必要な創薬、栄養補助食品、機能性食品の開発にも繋がる。

## 2. 実験と結果

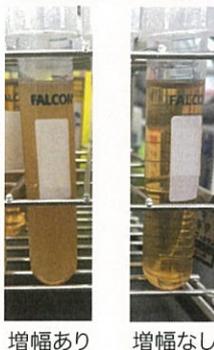
### 2. 1 腸内細菌基準株の安定的培養方法の確立

個々の腸内細菌の特性を理解するために微生物バンクの一つである理化学研究所バイオリソースセンターより腸内細菌基準株 40 種類(グラム陽性菌 25 種類、グラム陰性菌 15 種類)を入手し、平成 29 年度はこれらの腸内細菌基準株のうち 34 種類の培養方法の検討を実施した。これら

の腸内細菌基準株の情報を参照したところ、入手したほとんどの細菌の培養には特殊な処理を施した動物血液を添加した培地が使用されていた。しかし、動物由来の血液は入手まで時間がかかるうえに、今後の研究を進めていく上で腸内細菌基準株の大量培養が必要となるためコストも嵩んでしまう。また動物愛護の観点からも代用方法があればそちらを採用することが望まれる。

そこで、はじめに嫌気性菌の培養に一般的に用いられている GAM ブイヨン (日水製薬株式会社) を用いて、寒天培地および液体培地を作製し、嫌気チャンパー内にて腸内細菌基準株の培養を試みた。それぞれの培地に腸内細菌のストック溶液を添加し、嫌気性チャンパー内において 24-48 時間 37℃ に保ちながらプレート状でのコロニー形成および液体培地中の腸内細菌の増幅の検討を行った。その結果、18 種類のグラム陽性菌、9 種類のグラム陰性菌のコロニー形成および液体培地での増殖を確認することができた (図 1)。

液体培地による培養



寒天培地に形成されたコロニー



図 1 寒天、液体 GAM 培地による腸内細菌基準株の検討

しかしながら、7 種類の腸内細菌基準株に関しては GAM 培地による増殖が観察されなかったため、GAM 培地よりもビタミンやミネラル成分が多く含まれる YCFA 培地に更に数種類の栄養素添加した改良型 YCFA 培地による培養を試みた。改良型 YCFA 培地の使用により、更に 1 種類のグラム陽性菌、2 種類のグラム陰性菌の安定培養に成功した (表 1)。

	検討数	培養成功数
グラム陽性菌	21 種	20 種 (GAM18 種, 改良型 YCFA2 種)
グラム陰性菌	13 種	10 種 (GAM9 種, 改良型 YCFA1 種)

表 1 本年度に実施した腸内細菌基準株の培養状況

## 2. 2 安定培養後の腸内細菌基準株の検証

嫌気チャンパー内は安全キャビネットなどとは異なり、UV 照射等による滅菌が不可能である。専用の消毒剤を用いて実験の前後に清掃は行っているものの、他の菌体の混入のリスクを完全に防ぐことは難しい。他の菌の混入が起ってしまうと、正確な単独の腸内細菌の役割を解明する

ことができなくなる。このようリスクを排除するために、安定的な培養方法を確立したすべての腸内細菌基準株は、細菌類を染色する方法の一つであるグラム染色を実施することで単一の細菌のみしか存在しないことを確認した (図 2)。単一菌であることが確認できた腸内細菌基準株については、今後の実験の際に他の菌が混入した際にも対処できるように予備の凍結ストックを作製した。

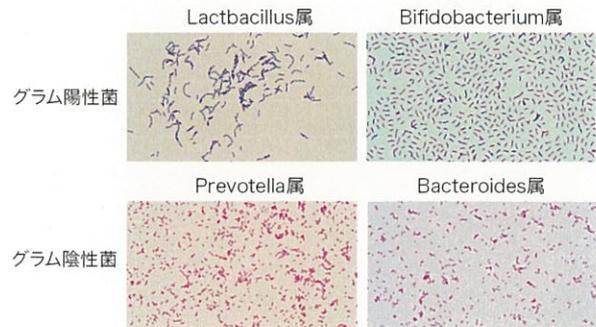


図 2 グラム染色による単一細菌の確認の例

## 2. 3 ヒト由来腸内細菌の単離および培養技術の確立

ヒトやマウスの腸内細菌叢において、主要な割合を占めるものは基準株として単離されているものが多いが、割合が低く、数が少ないマイナーポピュレーションの腸内細菌に関しては新たに単離、培養方法を検討する必要がある。偏性嫌気性菌である腸内細菌の分離のため、はじめに脱酸素ユニットを用いて培地中の酸素を完全に除くための方法を確立した。次に、嫌気チャンパーに使用するガスの組成をいくつか検討し、最適なガスの割合を見出した。これらの嫌気培養のための各種条件が整った後、厳密な嫌気環境下でのみしか生育できない腸内細菌基準株を用いて、培養の可否を検討した。その結果、24 時間後には細菌の増殖が確認され、嫌気環境が適切に維持出来ていることを確認できた。

ヒトやマウスの便試料には腸内細菌のみならず未消化物などの夾雑物も含まれている。夾雑物を取り除きつつ、腸内細菌のみを残す条件を、径の異なるフィルターを用いて検討を行い、最適なフィルターの組み合わせおよびフィルターを通す回数を決定した。確定した条件を適用し、健康人便試料より夾雑物を取り除いた腸内細菌叢の懸濁液を嫌気培地プレート状に播種し、嫌気チャンパー内にてコロニーの形成を検討した。24-72 時間後に形成されたコロニー群から単コロニーを分取し、液体培地内にて培養を継続した。増幅が確認されたものは DNA を抽出し、その配列を 16S rRNA 遺伝子増幅用ユニバーサルプライマーを用いて PCR を行い、シーケンス解析することで、菌種の同定を行った。その結果、グラム陽性菌、グラム陰性菌を一つずつ単離することができた (図 3)。これらの実験は共同研究先である慶應義塾大学先端生命科学研究所にて実施した。

## 2. 4 単独腸内細菌定着マウス構築に向けた手技の取得

通常の実験動物飼育環境下で飼育されているマウスとは異なり、単独腸内細菌定着マウスの作成にはビニールアイソレーター内における動物飼育や投与などの実験手技が必要となる。そのため、本年度は各種研修を受講した後に、実際に使用するビニールアイソレーターを用いて一連の基本的な操作の訓練を実施した。これらの実験は共同研究先である実験動物中央研究所にて実施した。

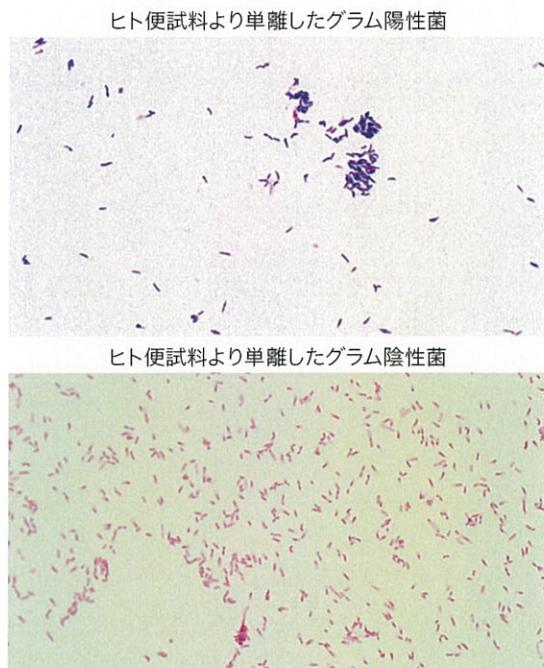


図3 健康人便試料より単離した腸内細菌のグラム染色

## 3. 考察及び今後の展望

本年度は 30 種類の腸内細菌基準株の安定的培養法の確立に成功した。一方で、4 種類の腸内細菌基準株に関しては GAM 培地、改良型 YCFA 培地のどちらでも培養することができなかった。これらの腸内細菌基準株に関しては、引き続き組成の異なる培地を用いた検討を行うが、必要に応じて動物血液を添加した培地による培養も実施する。本年度とりかかれなかった 6 種類の腸内細菌基準株に関しては、GAM 培地や改良型 YCFA 培地を用いて培養の検討を実施していく。ヒト便試料からの腸内細菌の単離は 2 菌株と少なかった。次年度の早い段階から本研究室でも同様の実験を実施する見通しが立っている。来年度は慶應義塾大学先端生命科学研究所と共に、一つでも多くのヒト由来腸内細菌の単離を目指す。

これまでに安定的な培養方法を確立した腸内細菌基準株や単離したヒト腸内細菌を無菌マウスに定着させることにより単独腸内細菌定着マウスの作製にも着手し、腸内細菌が生体に与える影響を、代謝産物の網羅的解析や、腸管上皮細胞や免疫細胞の変化を調べることにより検討する。

## 4. 謝辞

本実験の遂行にあたり、腸内細菌の分離、培養技術の構築では慶應義塾先端生命科学研究所の谷川直紀博士、楊佳約博士のご協力をいただきました。動物実験に関しては公益財団法人 実験動物中央研究所の高橋利一氏、小倉智幸氏、野津量子氏から単独腸内細菌定着マウス構築のためのご指導、ご協力を賜りました。厚く御礼申し上げます。

### 【参考文献】

- 1 Okadaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J.Z., Abe, F., Osawa, R., Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.* 25:16:90, 2016.
- 2 Okada, T., Fukuda, S., Hase, K., Nishiumi, S., Izumi, Y., Yoshida, M., Hagiwara, T., Kawashima, R., Yamazaki, M., Oshio, T., Otsubo, T., Inagaki, O. K., Kakimoto, K., Higuchi, K., Kawamura, Y. I., Ohno, H., Dohi, T. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat. Commun.* 4: 1654, 2013.
- 3 †Furusawa, Y., †Obata, Y., †\*Fukuda, S. (†co-first and \*corresponding author), Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N.N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., \*Hase, K., \*Ohno, H. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504: 446-450, 2013.
- 4 Atarashi, K., Tanoue, T., Suda, W., Oshima, K., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., Kim, S.W., Fritz, J.V., Wilmes, P., Ueha, S., Matsushima, K., Ohno, H., Olle, B., Sakaguchi, S., Taniguchi, T., Morita, H., Hattori, M., Honda, K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500: 232-236, 2013.
- 5 Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C., Finlay, B.B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010 Jul;90(3):859-904.
- 6 Schulz, M.D., Atay, C., Heringer, J., Romrig, F.K., Schwitalla, S., Aydin, B., Ziegler, P.K., Varga, J., Reindl, W., Pommerenke, C., Salinas-Riester, G., Böck, A., Alpert, C., Blaut, M., Polson, S.C., Brandl, L., Kirchner, T., Greten, F.R., Polson, S.W., Arkan, M.C. High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity. *Nature.* 514(7523):508-12, 2014

## 業 績

## 【原著論文】

1. †Mishima, E., †Fukuda, S. (†equally contributed), Kanemitsu, Y., Saigusa, D., Mukawa, C., Asaji, K., Matsumoto, Y., Tsukamoto, H., Tachikawa, T., Tsukimi, T., Fukuda, NN., Ho, HJ., Kikuchi, K., Suzuki, C., Nanto, F., Suzuki, T., Ito, S., Soga, T., Tomioka, Y., Abe, T.  
Canagliflozin reduces plasma uremic toxins and alters the intestinal microbiota composition in a chronic kidney disease mouse model.  
Am. J. Physiol. Renal Physiol. In press.

## 【総説】

1. 福田真嗣  
腸内環境に基づく個別ヘルスケアの必要性  
MEDCHEM NEWS 27 (4) 219-223, 2017
2. 中藤学  
腸管上皮とマイクロRNA  
臨床免疫・アレルギー科 69 (1) ;114-120, 2018

## 【口頭発表】

1. 福田真嗣  
腸内微生物生態系の制御による新たな疾患予防・治療戦略  
第31回日本バイオフィルム学会学術集会, 2017年7月, 筑波
2. 福田真嗣  
腸内細菌叢由来代謝物質がもたらす生体恒常性維持機構  
第42回日本医用マスメクトル学会年会, 2017年9月, 東京
3. 福田真嗣  
もう一つの臓器 腸内細菌叢の機能に迫る  
第62回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2017年10月, 京都
4. 福田真嗣  
腸内環境を標的とした新たな疾患予防・治療戦略  
第13回日本キレーション治療セミナー, 2017年11月, 東京

5. 福田真嗣  
腸内環境に基づく個別化ヘルスケアの必要性  
第22回日本フードファクター学会学術集会, 2017年12月, 神奈川
6. 福田真嗣  
腸内細菌由来代謝物質がもたらす宿主恒常性  
2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017年12月, 神戸
7. 福田真嗣  
もう一つの臓器、腸内細菌叢の機能に迫る  
第20回生命化学研究会, 2018年1月, 神奈川
8. 加齢がもたらす腸内環境変動は肥満型ディスバイオーシスを誘導する  
腸内細菌叢由来代謝物質がもたらす生体恒常性  
第95回日本生理学会, 2018年3月, 香川

## 【特許】

- (1) 国内特許出願 0件
- (2) 国外特許出願 0件

