

研究報告 2020 (KISTEC Annual Research Report,2020)

【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..... 117

プロジェクトリーダー兼グループリーダー 大野 博司

◆ 肥満者、または、耐糖能異常者に特有の腸内細菌と代謝物の探索..... 120

中西 裕美子

◆ 業績..... 123

腸内環境制御グループ

◆ 総括..... 125

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..... 128

中藤 学、大縄 悟志

◆ 腸内環境制御基盤技術の開発に向けた研究ツールの作成 131

大縄 悟志、中藤 学、井上 浄

◆ 業績..... 134

「腸内細菌叢」プロジェクト

プロジェクトリーダー兼解析ツール開発グループリーダー 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、罹患者数は約 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、大きな社会的・経済的問題となっている。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 型糖尿病発症といった生活習慣病の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。方法は、これまでの欧米人の論文をもとに東京大学付属病院の検診受診者で 20 歳から 75 歳までの男女含む肥満者 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 名を対象とした。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、(8) 統合データベースの作成と解析ツールの開発を行う。このことにより、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となり、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. 2019 年度の研究目的

解析ツール開発グループでは、食事・栄養摂取状況、身体活動量・エネルギー消費量などの生活習慣データ、炎症性サイトカインを含めた臨床データ、腸内細菌叢の 16S 解析・メタゲノム解析、水溶性や脂溶性のメタボローム解析、CAGE 手法を用いた RNAseq 解析を行うとともに、これらのデータを統合的・包括的に解析するためのデータベース化を図り、新しい解析ツールをモジュールした解析ソフトウェアの開発を行っている。さらに、この統合データベースと解析ソフトウェアを用いて、食習慣・身体活動量、腸内細菌叢、生活習慣病発症の相互関係を明らかにし、腸内細菌叢を介した未病改善やリスク診断の開発を行うことを目的としている。2019 年度は、下記の項目を重点的に取り組み、前年度に引き続き統合データベースを作成するための元となるデータの取得と、統合データベースとデータベースを参照するインターフェースの作成を行った。

- (1) 統合データベースの作成と解析ツールの開発
- (2) 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
- (3) 血中・糞便中のメタボローム解析
- (4) 各種データの相関解析
- (5) 腸内細菌叢のメタゲノム解析
- (6) 全ゲノムシーケンスの解析

2. 2019 年度の研究成果

(1) 統合データベースの作成と解析ツールの開発
臨床情報、腸内細菌叢、代謝物の情報のデータベースを作成し、被験者ごとに目的の情報を表示できるインターフェースを作成した。さらに、データ間の関連性を簡単に調べるため臨床情報と各データの相関解析を行うツールも実装した。

(2) 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

昨年度収集した 245 名分の BDHQ による食事調査について、栄養素について 90 項目、食事の項目として 70 項目について一日当たりの摂取量を解析した。また活動量については 600 時間以上計測できた 170 名について歩数と活動強度についてデータの抽出が完了した。

(3) 血中・糞便中のメタボローム解析

血液、及び、糞便から水溶性と脂溶性代謝物の抽出を行い、水溶性代謝物はガスクロマトグラフィー質量分析を用いて分析を行い、306 検体から糞便中から 124 種類、血清中から 102 種類の代謝物を同定した。また、脂溶性代謝物は液体クロマトグラフィー質量分析を用いて分析を行い、3 糞便中から 1927 種類、血清中から 625 種類の物質を同定した。

(4) 各種データの相関解析

代謝物データは相互の相関係数に応じてクラスターリングを行い代謝物クラスター（Co-abundance group; CAG）を作成した。次に、被験者の耐糖能異常や肥満の表現型とこれらの代謝物クラスターとの相関について解析した。本研究では、健常者、肥満者、耐糖能異常者からそれぞれ血清生化学検査、および血中のインスリン、アディポカインを測定している。これらの情報をもとに、糖尿病の指標として空腹時血糖（FBG）、HbA1c、HOMA-IR、肥満の指標として BMI など臨床データとして組み込み、相関解析を行った。その結果、糞便中の水溶性代謝物に関していくつかの代謝物クラスターと臨床データと有意な相関（Spearman 偏相関）、もしくは Wilcoxon rank-sum test による有意な増減を認めた。同様に、糞便中の脂質代謝物に関しても解析を行い、有意に関連する代謝物クラスターを同定した。

次に、腸内細菌叢データと代謝物クラスターの結果との相関解析を行い、耐糖能異常と関連のある代謝物と細菌の同定を試みた。その結果、水溶性代謝物に関しては単糖や糖代謝物のクラスター（CAG 05, 06）がインスリン抵抗性（HOMA-IR）、脂肪肝（NAFLD）、メタボリック症候群（MetS）やその他のパラメーターと強い正の関連を示していたため、まずこれらの代謝物と腸内細菌との相関解析を行った。その結果、インスリン抵抗性を示す被験者（HOMA-IR ≥ 2.5 ）の検体ではインスリン感受性（HOMA-IR < 1.6）の被験者の検体と比較して単糖（水色）およびその他の糖代謝物（青、紫）が増加していることが示された。また、これらの代謝物は *Dorea* 属、*Coprococcus* 属などの腸内細菌と正の相関を示す一方、*Bacteroides* 属、*Alistipes* 属などの細菌と負の相関を示した。

特に *Dorea* 属と *Coprococcus* 属は Lachnospiraceae 科に属する細菌種であり、過去の報告でも肥満や糖尿病との関連が示唆されている[1]。また、単糖や糖代謝物の増加は、腸内環境において多糖の分解が亢進している可能性を示唆している。過去の報告ではマウスにおいて多糖の分解亢進による宿主への過剰なエネルギー供給が肥満に関与する可能性が指摘されているが[2]、ヒトにおいては未だ実証されておらず、今回の結果はその仮説を証明する重要な知見となる可能性がある。

同様の手法を用いて脂質代謝物クラスターと腸内細菌との関連も検討したところ、顕著な所見としてリゾホスファチジルコリン（LPC）がインスリン抵抗性の高い被験者の検体で増加していたこと、またこれらの代謝物は *Alistipes* 属や *Parabacteroides* 属と負の相関を示すことがわかった。腸管内での LPC の増加と腸内細菌によって生成されるその代謝物は動脈硬化性疾患との関連が示唆されており[3]、今回の結果は糖尿病患者において動脈硬化性疾患が増加する一つの機序を示唆している可能性がある。

(5) 腸内細菌叢のメタゲノム解析

上記で認めた代謝産物を産生する腸内細菌叢を明らかにするため、メタゲノム解析に必要な DNA 量が採取でき

た 271 検体の糞便から DNA を再抽出し、ショットガンシーケンシング法によるメタゲノム解析を行った。その結果、7G のシーケンシングリードが得られ、そこから約 6M の遺伝子を同定した（図 2）。本研究のデータは過去に報告されていた日本人のメタゲノム解析から得られた遺伝子数（約 4.8M）[4]よりも多く、本研究から新規遺伝子を含むより多数の日本人の腸内細菌の遺伝子カタログを得ることができた。

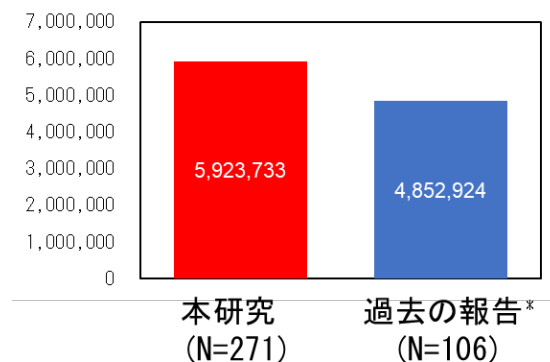


図 2 メタゲノム解析から推定された糞便中の腸内細菌の遺伝子数

(6) 全ゲノムシーケンスの解析

313 名分の DNA 抽出が終了し、疾患感受性遺伝子を同定するために約 150 人の全ゲノムシーケンス解析が終了した。

3. 今後の研究計画

1. 統合データベースについては、引き続きデータベースの充実化と解析ツールの実装等を進める。
2. BDHQ で得られた栄養素や食事の項目について、腸内細菌叢や代謝産物との関連性について検討するとともに、活動量のデータについて解析を行う。
3. 既に解析が終了している血清代謝物解析と前述の糞便代謝物解析の統合解析を行い、糞便代謝物が実際に宿主の代謝や肥満・高血糖などの表現型に影響を与えているかを検討する。
4. 2019 年度はメタゲノム解析のシーケンシングが終了したところであり、詳細な解析を 2020 年度行う。メタゲノム解析により、表現型と関連する種レベルのより細かい細菌種を同定が可能になるとともに、腸内細菌の機能的な側面の解析も可能になることが期待できる。また、上記で表現型および代謝物との関連性が示された細菌種についていくつか選択し、高脂肪食誘発性糖尿病モデルマウスに投与することで、細菌と肥満・高血糖・インスリン
5. ヒトゲノムの全ゲノムシーケンス解析について順次行っていく。
6. 解析したデータについては順次統合データベースに集約し充実をはかるとともに、共分散構造分析や全ゲノムシーケンスなどを用いた層別化・個別化に向けた解析システムを構築していく。

【参考文献】

1. K. H. Allin, V. Tremaroli, R. Caesar, B. A. H. Jensen, M. T. F. Damgaard, M. I. Bahl, T. R. Licht, T. H. Hansen, T. Nielsen, T. M. Dantoft, A. Linneberg, T. Jørgensen, H. Vestergaard, K. Kristiansen, P. W. Franks, T. Hansen, F. Bäckhed and O. Pedersen, *Diabetologia*, **61**, 810-820, (2018)
2. P. J. Turnbaugh, R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis and J. I. Gordon, *Nature*, **444**, 1027-1031, (2006)
3. Z. Wang, E. Klipfell, B. J. Bennett, R. Koeth, B. S. Levison, B. Dugar, A. E. Feldstein, E. B. Britt, X. Fu, Y. M. Chung, Y. Wu, P. Schauer, J. D. Smith, H. Allayee, W. H. Tang, J. A. DiDonato, A. J. Lusis and S. L. Hazen, *Nature*, **472**, 57-63, (2011)
4. S. Nishijima, W. Suda, K. Oshima, S. W. Kim, Y. Hirose, H. Morita and M. Hattori, *DNA Res*, **23**, 125-33, (2016)

肥満者、または、耐糖能異常者に特有の 腸内細菌と代謝物の探索

中西 裕美子

1. はじめに

近年、肥満や2型糖尿病（T2D）といった生活習慣病と腸内細菌との関連が動物やヒトで報告されている。肥満のヒトでは Firmicutes 門の細菌と Bacteroidetes 門の細菌の比（Firmicutes/Bacteroidetes [F/B] 比）が高く、細菌種の多様性は低いことなどが報告されている。さらに肥満や T2D の患者の腸内細菌を無菌マウスに移植すると同様の病態を生じることから、異常な菌の組成そのものが病態の原因の1つであることが証明されている。従って、肥満や T2D に伴う異常な腸内細菌叢を改善することで病態の治療や予防に役立つことが期待されている。本研究では、肥満や T2D の発症に関連する腸内細菌やその代謝物を探索し、また、それらの機能解析を行うことで、肥満や T2D の発症や悪化に関与する腸内細菌のメカニズムを解明する。

1. 1 肥満や T2D と腸内細菌との関わり

近年、世界中で増加の一途をたどっている肥満や糖尿病が腸内細菌と密接な関わりがあると多数報告されている。まず、2006 年に Gordon らのグループが肥満の患者や肥満モデルマウスにおいて、Firmicutes 門が増加し、Bacteroidetes 門が減少することを報告した[1, 2]。その後、肥満のヒトや肥満モデルマウスにおいて、Verrucomicrobia 門の *Akkermansia muciniphila* の割合が減少していることが明らかとなり、同菌をマウスに経口投与したところ、インスリン抵抗性や脂肪の蓄積といったメタボリックシンドロームの病態を改善できたことが報告された[3]。一方、T2D の発症には遺伝的要因と環境要因が関与すると考えられているが、これまでの研究から遺伝学的要因の寄与は小さく、環境要因の影響の方が大きいことが示唆されている[4]。そのため、環境要因の1つとして近年、腸内細菌の重要性が注目されており、実際に、中国やヨーロッパにおいて T2D 患者の大規模コホート研究が行われた[5, 6]。中国人の T2D 患者の腸内細菌叢のメタゲノム解析（細菌のゲノム情報すべてを読み、どのような遺伝子を持つかを解析する手法）結果から、T2D 群に特徴的な腸内細菌の遺伝子群を用いて T2D 発症リスクを判別することが可能であることが報告されている[5]。また、ヨーロッパでも同様のコホートが行われたが、2つコホート研究を比較するとヨーロッパ系コホートと中国人コホートでは T2D を識別するメタゲノムマーカーが異なっていたことから、メタゲノムによる T2D 予測法は、研究の対象集団の年齢や居住場

所に応じて作成する必要があると提唱されている。

1. 2 日本における肥満や T2D を対象とした腸内細菌研究

前述のように、海外ではヒトを対象とした肥満や T2D の対規模なコホート研究が行われているが、日本人における肥満や T2D の腸内細菌叢の研究例は少ない。肥満に関しては 2015 年に発表された健康者 23 名と肥満者 33 名の糞便中の腸内細菌叢を T-RFLP（Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism）法で比較した結果では、Bacteroidetes 門の細菌が肥満者で有意に低かったことを報告している[7]。また、T2D に関しては健康者 50 名と2型糖尿病患者 50 名の糞便中の腸内細菌を RT(Real time)-PCR 法で比較した結果、T2D 患者で *C. coccoides* group、*Atopobium* cluster、*Prevotella* 属が有意に減少し、*Lactobacillus* 属が有意に増加していた。また、*C. coccoides* group、*Atopobium* cluster は T2D 患者の血中でも検出された。T2D 患者では糞便中の酢酸、プロピオン酸が有意に減少していたことも報告している[8]。これらの研究では、症例数が少ないこと、また、腸内細菌叢を解析する手法として、T-RFLP 法や RT-PCR 法を用いているが、これらの方法では腸内細菌叢の一部分を解析することしかできないことが問題であり、症例数を増やし網羅的な解析法による腸内細菌叢解析を行い、日本人における肥満や糖尿病の発症に関わる腸内細菌を探索することが重要である。

1. 3 腸内細菌叢の性差について

腸内細菌叢には性差があり[9]、腸内細菌叢の違いが性別特有の免疫システムに関与することが報告されている[10]。また、日本人の男性では心筋梗塞の発症率が高く、心筋梗塞は糖尿病や高脂血症、高血圧などの結果として起こるため、男性に多い疾患は生活習慣と深い関係があることがわかる。そこで、肥満や T2D と腸内細菌叢との関係を調べる上で、性別による差異も調べ、性別特有の腸内細菌や代謝物が肥満や T2D の発症に関与するか解析を行う。

2. 1 実験方法

2. 1. 1 ヒト試験の概要

本研究では、東京大学附属病院予防医学センターと共同で、健康診断の受診者うち、空腹時血糖が 110 mg/dL もしくはヘモグロビン A1c が 6.0%以上の受診者を耐糖能異常

（Impaired glucose tolerance :IGT）群、また、BMI が 25 以上で正常血糖の受診者を肥満群とし、これらの受診者に加え、同数の非肥満で非 IGT の受診者を健常者群として本研究にリクルートし、通常の検診項目に加えて便や血液を採取した。リクルートした人数はそれぞれ約 100 名である。

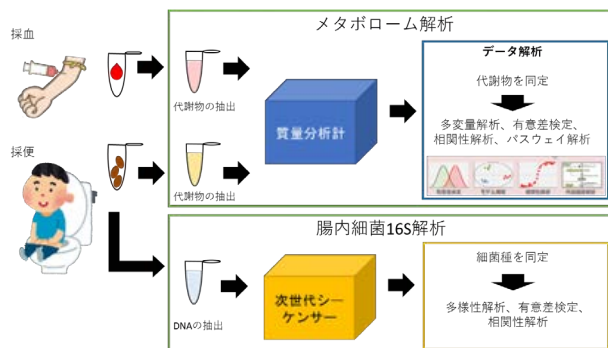


図 1. 分析の概要

2. 1. 2 腸内細菌叢解析

採取した糞便から DNA 抽出し、16S rRNA 遺伝子の V1-2 領域を PCR で増幅した後、Miseq (Illumina) によりシーケンスを行った (図 1)。得られた遺伝子配列から 97% 以上の類似性をもつ配列を Operational taxonomic unit (OTU) と設定した。OTU の系統分類は、理化学研究所内で保有している腸内細菌のゲノム DNA 情報をリファレンスとして種レベルまで分類した。

2. 1. 2 メタボローム解析

腸内細菌叢解析に用いた糞便検体から水溶性代謝物と短鎖脂肪酸を抽出し、それぞれの抽出サンプルを GCMS-TQ8030 (島津製作所) を用いて、測定を行った (図 1)。水溶性代謝物の抽出と誘導体化は、糞便に水 : MeOH : クロロホルムを 5 : 5 : 2 の比率で加え、上層の水溶性画分を凍結乾燥した後に、Methoxyamine を加えオキシム化後に N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide を加えてトリメチルシリル化を行った。また、短鎖脂肪酸の抽出と誘導体化は、水 : HCl : ジエチルエーテルを 2 : 1 : 4 の比率で加え、上層の脂溶性画分を採取し、N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide を加えて誘導体化を行った。それぞれの誘導体化したサンプルは BPX-5 カラムを用いて、GCMS-TQ8030 の MRM モードで測定を行った。

2. 2 結果

2. 2. 1 腸内細菌叢解析の結果

昨年度報告したように、腸内細菌叢の全体的な変化の指標である β 多様性と α 多様性は健常者、肥満者、IGT で有意差は見られなかった。細菌の系統的な種類ごとに比較を行ったところ、肥満群では Bacteroidetes 門の細菌が有意に減少していた。これは過去の研究の結果とも一致していた。また、肥満群では Actinobacteria 門の細菌も有意に増加していた。細菌の分類を属レベルで比較を行ったところ、Collinsella 属が肥満群と IGT 群で有意に増加し、

Bacteroides 属が肥満群で有意に増加していることが分かった。また、性別の違いについても比較を行ったところ、 α 多様性は女性がやや低い傾向にあるものの、男女で有意な差は見られなかった。腸内細菌の構成を比較したところ、Prevotella 属、Coprococcus 属が男性で多く、Veillonella 属、Faecalibacterium 属、Streptococcus 属は女性で多い特徴が見られた。さらに、健常者、肥満者、IGT について性別ごとに違いを調べたところ、女性では Collinsella 属が肥満群と IGT 群で有意に増加していたが男性で有意な差は見られなかった。また、Bacteroides 属についても、男性では肥満群で有意に増加しているが、女性ではその違いは見られなかった。以上のことから、性別ごとに肥満や IGT に特有な腸内細菌が異なることが考えられた。

2. 2. 2 メタボローム解析の結果

昨年度報告したように、血漿と糞便のメタボローム解析を行ったところ、血漿中代謝物は IGT 群が他の 3 群と比較し全体的に代謝物が異なる結果であった。一方で糞便中代謝物については 3 群で全体的な傾向に違いは見られなかった。多群検定を行い 3 群間で有意に異なる代謝物を調べた結果、血漿中代謝物では 64 化合物に有意差 (P 値が 0.05 以下) が見られた。血漿中ではアミノ酸や単糖が IGT 群で多く、短鎖脂肪酸が健常者で多いことが分かった。糞便中代謝物では 34 化合物に有意差が見られた。糞便中代謝物では肥満群でアミノ酸や単糖が多い傾向にあり、血漿中と糞便中では異なる傾向にある事が分かった。

性別の違いについても比較を行ったところ、プロピオン酸やアミノ酸の一部が男女で有意に異なる事が分かった。さらに、健常者、肥満者、IGT について性別ごとに違いを調べたところ、多くの代謝物は男女の違いに関係なく、3 群で有意に異なる代謝物が一致していた。しかし、IGT の女性では男性と比較し、糞便中の糖類がより増加していることが分かった。

2. 2. 3 LC-MS を使用したメタボローム解析の構築

これまでガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) を使用したメタボローム解析を行ってきたが、一部の代謝物は GC/MS での分析系では測定することが難しい。そこで、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS) を使用し計測する代謝物を増やし解析するため、新たな LC-MS の分析系を構築した。

LCMS-8040 (島津製作所) を用いて、カラムは Discovery HS F5 (Sigma) を使用し移動相 A 液 (0.1% 酢酸)、B 液 (0.1% 酢酸/アセトニトリル) をグラジエント溶出し代謝物の分離を行い、MRM モードで測定を行う系を構築した。このシステムを使用し、アミノ酸系代謝物を 14 物質、ビタミン 6 物質、また、腸内細菌由来の代謝物であり動脈硬化を誘発する Trimethylamine oxide とその代謝物である Trimethylamine を新たに計測することが可能となった。

以上より、現在までに GC/MS のシステムで 310 物質、LC-MS のシステムで 22 物質を計測することが可能となっ

た。

3. 考察及び今後の展望

糞便中の腸内細菌叢と代謝物解析の結果から、性別ごとに肥満や IGT に特有な腸内細菌が存在する一方で、代謝物では量的な違いは見られたものの、多くの代謝物は男女の違いに関係なく、3 群で有意に異なる代謝物が一致していた。すなわち、健常者、肥満者、IGT に着目した場合、男女間で腸内細菌叢は異なるが代謝物は近いプロファイルを示すことから、男女間で異なる細菌種が近い代謝を行っている可能性が考えられた。本研究では、糞便中のメタゲノム解析も行っているため、異なる細菌種でも近い代謝酵素の遺伝子を持つかどうかをメタゲノム解析の結果から調べる事ができる。今後はメタゲノムデータを用いて男女間の比較を行い、代謝物データとの関連性を調べ、健常者、肥満者、IGT に特有の細菌種とその代謝遺伝子について明らかにする。

メタボローム解析については、今年度は LC-MS を使用した新たな分析計を構築した。今後も LC-MS を活用して、計測できる代謝物を増やしていく予定である。

【参考文献】

1. R. E. Ley, P. J. Turnbaugh, S. Klein, J. I. Gordon, Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023 (2006).
2. P. J. Turnbaugh et al., An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031 (2006).
3. H. Plovier et al., A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature medicine* 23, 107-113 (2017).
4. C. Fuchsberger et al., The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature* 536, 41 (2016).
5. J. Qin et al., A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490, 55-60 (2012).
6. H. K. Pedersen et al., Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* 535, 376-381 (2016).
7. C. Kasai et al., Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol* 15, 100 (2015).
8. J. Sato et al., Gut dysbiosis and detection of "live gut bacteria" in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* 37, 2343-2350 (2014).
9. Bolnick, D.I., et al., Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota. *Nature Communications*, 2014. 5(1): p. 4500.
10. Fransen, F., et al., The Impact of Gut Microbiota on Gender-Specific Differences in Immunity. *Frontiers in Immunology*, 2017. 8(754).

業 績

【原著論文】

1. Miyauchi E, Kim S-W, Suda W, Kawasumi M, Onawa S, Taguchi-Atarashi N, Morita M, Taylor TD, Hattori M, Ohno H. Gut microbes act in concert to exacerbate inflammation in spinal cords. *Nature* in press (IF: 40.070)
2. Shimokawa C, Kato T, Takeuchi T, Ohshima N, Furuki T, Ohtsu Y, Suzue K, Imai T, Obi S, Oia A, Izumi T, Sakurai M, Arakawa H, Ohno H, Hisaeda H. CD8⁺ regulatory T cells are critical in prevention of autoimmune-mediated diabetes. *Nat Commun*. 2020;11(1):1922. (IF: 11.878)
3. Satoh-Takayama N, Kato T, Motomura Y, Kageyam T, Taguchi-Atarashi N, Kinoshita-Daitoku K, Duroda E, Di Santo JP, Mimuro H, Moro K, Ohno H. Bacteria-Induced Group 2 Innate Lymphoid Cells in the Stomach Provide Immune Protection through Induction of IgA. *Immunity* 2020;52(4):635-649. (IF: 21.522)
4. Wakabayashi T, Yamaguchi K, Matsui K, Sano T, Kubota T, Hashimoto T, Mano A, Yamada K, Matsuo Y, Kubota N, Kadowaki T, Iwatsubo T. Differential effects of diet- and genetically-induced brain insulin resistance on amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2019;14:15. (IF: 8.274)
5. Hara S, Sasaki T, Satoh-Takayama N, Kanaya T, Kato T, Takikawa Y, Takahashi M, Tachibana N, Kim KS, Surh CD, Ohno H. Dietary Antigens Induce Germinal Center Responses in Peyer's Patches and Antigen-Specific IgA Production. *Front Immunol*. 2019;10:2432. (IF: 5.511)
6. Sasaki T, Moro K, Kubota T, Kubota N, Kato T, Ohno H, Nakae S, Saito H, Koyasu S. Innate Lymphoid Cells in the Induction of Obesity. *Cell Rep*. 2019;28:202-217. (IF: 7.815)

【総説】

1. Ohno H. The impact of metabolites derived from the gut microbiota on immune regulation and diseases. *Int. Immun.* in press (IF: 4.168)
2. 對田 尚、大野博司 炎症性腸疾患と抗体医薬 臨床免疫・アレルギー科 Vol.74 No.1 2020s
3. 宮内栄治、大野博司 多発性硬化症における腸内細菌と免疫系の役割 メディカル・サイエンス・ダイジェスト 2020
4. 竹内直志、中西裕美子 腸内細菌叢と肥満・2型糖尿

病 ヒトマイクロバイオーム Vol.2 2020

5. 中西裕美子、大野博司 老化と腸内細菌 実験医学増刊 Vol.37 No. 2 2019
6. 中西裕美子、大野博司 腸内細菌叢が宿主の生理機能へ及ぼす影響 感染症 Vol.49 No.4 2019
7. 中西裕美子、大野博司 腸内細菌と健康長寿 老年医学 Vol.57 No.8 2019
8. 窪田哲也、窪田直人、門脇孝：TLR4 は飽和脂肪酸に対する受容体ではないが、マクロファージの代謝をリプログラミングすることによって脂質誘導性の炎症を惹起させる *Cardio-Renal Diabetes* Vol.7 40-44, 2019, 01
9. 窪田哲也、窪田直人、門脇孝：肥満に伴う高インスリン血症によるマクロファージの Irs2 低下は IL-4 誘導性の M2a-subtype マクロファージの活性化を障害する *DIABETES UPDATE* 8(2) 2-3, 2019.4

【招待講演】

1. 大野博司 出生コホートによる小児アトピー性皮膚炎と腸内細菌叢解析 第 119 回日本皮膚科学会総会 2020.6, 京都 (Web 講演)
2. Hiroshi Ohno, Chikako Shimokawa, Eiji Miyauchi, Hajime Hisaeda Gut microbiota and host diseases, especially autoimmune diseases. The 8th Global Network Forum on Infection and Immunity 2020.1, Chiba, Japan
3. Hiroshi Ohno, Chikako Shimokawa, Eiji Miyauchi, Hajime Hisaeda Gut microbiota and autoimmune diseases. 第 48 回日本免疫学会学術集会 2019.12, 浜松
4. 大野博司 腸内細菌と 2 型糖尿病 第 44 回日本比較内分泌学会及びシンポジウム 2019.11, さいたま市
5. 大野博司、柴田亮平、中西裕美子、加藤完、池田和貴、須田互、Weng Sheng Kong、山出史也、中野泰至、服部正平、菅野雅元、有田誠、下条直樹 腸内細菌叢と小児アトピー性皮膚炎：出生コホートによる解析 第 56 回日本小児アレルギー学会 2019.11, 千葉
6. Hiroshi Ohno Gut microbiota and autoimmune diseases. Block Symposium : Mucosal Immunology and Microbiota KAI International Meeting 2019 2019.10, Seoul, 大韓民国
7. 大野博司 腸内細菌叢研究と疾患、特に腸疾患に関して 第 74 回日本大腸肛門病学会学術集会 2019.10, 東京
8. 大野博司 知っていますか？腸内環境と免疫系・生体防御や病気との関わり 千葉県医師会市民公開講座 2019.10, 千葉
9. 大野博司 宿主-腸内細菌叢相互作用 第 37 回日本ヒト細胞学会学術集会 2019.10, 東京

10. Hiroshi Ohno Gut microbiota and autoimmune diseases. 17th International Congress of Immunology 2019.10, 北京、中華人民共和国
11. 大野博司 宿主・腸内細菌叢相互作用：腸内細菌叢の解析手法と医療・産業への応用の可能性 情報機構セミナー 2019.9, 東京
12. 大野博司 腸内細菌叢と疾患の発症・病態との関わり 第 84 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2019.8, 神戸
13. 大野博司 腸内細菌叢と自己免疫疾患：多発性硬化症と 1 型糖尿病 動物共生科学の創生による、ヒト健康社会の実現に関する国際シンポジウム 2019.7, 相模原
14. Hiroshi Ohno Impact of small intestinal bacteria on the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology International Conference, 2019.6, 済州、大韓民国
15. Hiroshi Ohno Impact of small intestinal bacteria on the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. 3th International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health IPC2019, 2019.6, Prague, Czech Republic
16. 大野博司 宿主・腸内細菌叢相互作用：腸内細菌叢の解析手法と医療・産業への応用の可能性 情報機構セミナー、2019.9, 東京
17. 窪田哲也 肥満に伴う M2a-subtype マクロファージ活性化障害の分子機構 第 62 回日本糖尿病学会 2019. 5, 仙台
18. 窪田哲也 The novel mechanisms of adiponectin secretion DESIRE Conference 2019, 2019.2.28, 東京

【受賞講演】

1. 窪田哲也 病態発症における臓器内・臓器間のインスリン作用失調メカニズムの解明-IRS-1/IRS-2 を中心とした解析- 第 22 回日本臨床分子医学会 学会賞 2019, 4, 名古屋

【口頭発表】

1. Takashi Taida, Eiji Miyauchi, Yumiko Nakanishi, Hiroshi Ohno Cigarette smoking facilitates intestinal colonization of oral bacteria in patients with inflammatory bowel disease. 第 48 回日本免疫学会学術集会 2019.12, 浜松
2. Naoko Satoh-Takayama, Hiroshi Ohno Identification of stomach ILC2-inducible commensal bacteria belonging to S24-7 family of order Bacteroidales. 第 48 回日本免疫学会学術集会 2019.12, 浜松
3. 竹内直志、宮内栄治、島本周、松山彰収、大野博司 腸内細菌代謝物酢酸は IgA の反応性を変化させ細菌叢を制御する 第 56 回日本消化器免疫学会総会 2019.8, 京都
4. 窪田哲也、窪田直人、林高則、相原允一、山内敏正、門脇孝：血管内皮細胞の IRS-2 は動脈硬化抑制に働く、第 62 回日本糖尿病学会年次学術集会、2019. 5、仙台

5. 窪田哲也、窪田直人、井上真理子、林高則、相原允一、山内敏正、門脇 孝：マクロファージ Irs2 を介した慢性炎症とインスリン抵抗性発症メカニズム、第 92 回日本内分泌学会学術総会、2019. 5 仙台

【ポスター発表】

1. Takashi Ito, Yumiko Nakanishi, Tamotsu Kato, Toshi Jinnohara, Fumiya Yamaide, Naoki Shimojo, Hiroshi Ohno Exploring asthma onset factors in the intestinal environment with a human children birth cohort. 第 48 回日本免疫学会学術集会 2019.12, 浜松
2. Tadashi Takeuchi, Keishi Kameyama, Eiji Miyauchi, Yumiko Nakanishi, Takashi Kanaya, Hiroshi Ohno Lipid-reactive bacteria exacerbates metabolic disorders via impairment of the gut integrity. 第 48 回日本免疫学会学術集会 2019.12, 浜松
3. Eiji Miyauchi, Tomoyo Taniguchi, Alex Olia, Eiji Nagayasu, Katuru Osbert, Kazutomo Suzue, Takashi Imai, Chikako Shimokawa, Risa Onishi, E.I. Odongo-Aginya, Nirianne Palacpac, Haruhiko Maruyama, Eisaku Kimura, Toshihiro Mita, Toshihiro Horii, Hajime Hisaeda, Hiroshi Ohno. Altered gut microbiota composition in patients with Plasmodium falciparum malaria. 第 42 回 日本分子生物学会年会 2019.12, 福岡
4. 中西裕美子、竹内直志、水野由子、山道信毅、須田互、服部正平、窪田直人、窪田哲也、大野博司 2 型糖尿病や肥満の発症に関わる腸内細菌と代謝物の探索 第 62 回日本糖尿病学会 2019 5, 仙台

【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リーダー 福田 真嗣

【基本構想】

本プロジェクトは、様々な疾患との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、40 兆個にも及ぶとされる腸内細菌が生息する。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ぎ、宿主免疫系を活性化する。一方で、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、種類に関しては多くの情報が得られているが、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である。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。

腸内細菌叢をはじめとした、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。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法が構築され、腸内細菌の単離培養に使用する培地もいくつか市販されている。しかしながら、現段階の技術では培養できない難培養性腸内細菌も報告されるなど、腸内細菌の培養技術については改善の余地が数多く残されている。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は難培養性腸内細菌を含む腸内細菌を安定的に単離・培養する方法を構築し、標的とする腸内細菌の特性を理解し、自在に操るためのツールの開発が必要となる。そこで本研究では以下の研究課題に取り組む（１）難培養性腸内細菌の新規培養方法の確立（２）難培養性腸内細菌単独定着マウスを用いた表現型解析（３）標的となる腸内細菌を選択的に取得するためのツールの開発、の３つを実施する。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ツール、有用菌を利用したサプリメント、機能性食品の開発、病原性細菌に対する予防の検討、治療薬の開発など多方面へ応用可能とすることで、健康維持や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. 平成 31 年/令和元年度の研究目的

プロジェクト三年目となる平成 31 年/令和元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

腸内細菌叢を構成する個々の腸内細菌を得るには二つの方法がある。一つ目は、腸内細菌叢が含まれているヒトやマウスの便試料懸濁液を直接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。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（URL: <http://jcm.brc.riken.jp/ja/>）。

プロジェクト当初より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から重要性が高いと考えられる細菌の中から、入手可能な腸内細菌基準株を理研 BRC より購入した。入手した腸内細菌基準株は、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た。

(2) 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菌は基準株として単離されているものが多い。一方で、腸内細菌叢の中における割合が低く、数が少ない菌の単離、培養は困難であり、単離・培養するための培地の工夫や既存の方法とは異なった新たな培養法の開発が必要不可欠である。多くの腸内細菌は偏性嫌気性細菌に分類され、単離、培養中に少量の酸素が混入するだけで死滅することもある。このような特徴を持つ腸内細菌を失うことなく単離、培養するには、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に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。これらのこ

とを踏まえ、昨年度に引き続き慶應義塾大学先端生命科学研究所や森下仁丹株式会社と協力し、新たな培地作製や昨年度構築した新規培養装置を使用した難培養性腸内細菌の培養方法の改良を試みた。

また新規培地を用いて、健康人の便試料からの腸内細菌の単離、培養を試みた。

(3) 腸内細菌が生体に及ぼす影響の評価

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、(1)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。(2) 安定培養した腸内細菌の投与による免疫系の変化や、薬剤マウス誘導腸炎モデルにおける炎症応答への感受性を評価する。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研究設備が備わっていない。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）と連携し腸内細菌単独定着マウスの解析や腸内細菌投与実験を実施した。これまでに安定培養方法を確立した腸内細菌の数もプロジェクトの進捗とともに増加しており、腸内細菌単独定着マウスを構築するためのスペースを確保が課題となっていた。そこで、一つでも多くの腸内細菌の機能を明らかにするため、大型実験動物施設を有する筑波大学との共同研究を締結し、同施設において単独腸内細菌定着マウスに関連する研究を進めた。

(4) 標的腸内細菌を単離するためのツールの開発

腸内細菌叢を構成する腸内細菌の中には、ビフィズス菌や乳酸菌などを代表とする宿主の健康維持や免疫系の亢進にはたらく有用菌が存在する一方、病原性大腸菌などの腸管関連疾患や代謝疾患・自己免疫疾患に関与する腸内細菌などのいわゆる病原性細菌が存在している。多種多様な腸内細菌により構成される腸内細菌叢から特定の腸内細菌を単離するには先に述べたように便試料懸濁液を直接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。選択培地や培地に特定の物質を添加することによりある程度の選択をすることは可能であるものの、標的となる細菌のみを単離する効率は高くない。そこで本年度は標的腸内細菌を効率よく単離するためのツールの開発に着手した。

2. 平成 31 年/令和元年度の研究成果

平成 31 年/令和元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、結果の詳細は各研究員報告書に記載しており本項では要点のみを示す。

(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、本年度は理研 BRC から入手可能な腸内細菌基準株 16 種類を入手した。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。表 1 は本プロジェクトにお

いて検討した腸内細菌基準株の現段階における培養状況をまとめたものである。大半の腸内細菌基準株は GAM 培地を用いて安定培養することができた。その一方で、一部の腸内細菌基準株は GAM 培地のみでは培養できなかったが、GAM 培地に特定の基質を追加することで安定培養することができた。

しかしながら、6 種類の腸内細菌基準株に関してはこれまで検討してきた培養方法では培養することができないことが明らかとなっており、これらに関しては、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。

	基準株入手数	培養成功数	培養検討中
グラム陽性菌	47	45	2
グラム陰性菌	16	12	4

表 1 本年度終了時の腸内細菌基準株の培養状況

(2) ヒト由来腸内細菌の単離、培養技術の確立

これまで構築してきた嫌気培養方法を用いて、ヒト便試料からの腸内細菌を単離、培養を試みた。便試料に含まれる食物由来未消化物をフィルターにより除去し、残った腸内細菌懸濁液を様々な非選択培地/選択培地に播種、嫌気チャンバー内にてコロニーを形成させた。プレート上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 種類グラム陰性菌 (2 名分、各個人から 1 株ずつ) をヒト便試料より単離した (表 2)。

	グラム陽性菌	グラム陰性菌
本年度	－	2 種 (4 菌株)
累計	2 種 (6 菌株)	4 種 (6 菌株)

表 2 本年度終了時の腸内細菌単離株の状況

多くの腸内細菌の培養が難しい理由として考えられる一つの要因は、腸内細菌同士の共生関係がお互いもしくは片方の生存に必須となる場合が想定される。腸内細菌叢を構成する個々の腸内細菌同士は生存競争を繰り広げる一方で、互いに助け合い共生する細菌も存在していると考えられている。すなわち、ある腸内細菌が産生する代謝産物が他の腸内細菌の増殖に重要である可能性がある。このような状況を擬似的に再現するために、二槽式透析培養器を用いた腸内細菌の培養を試みた。本培養装置は細菌を通さずに特定の成分のみを通す特殊な膜を中央部に配置しており、腸内細菌叢を含む培地で産生された代謝産物などの成分が膜を通して反対側に供給される仕組みとなっている。始めに本培養装置の有用性を検証するために、左側に培地と難培養性腸内細菌基準株を添加し、右側に腸内細菌叢を含む培地を加え、嫌気チャンバー内にて培養を試みた。その結果、本透析培養器を用いることで難培養性腸内細菌基準株を培養することができた。本年度はこれまで確立し

てきた二槽式透析培養器の小型化や使用する腸内細菌叢を含む培地の至適条件の検証を行った。

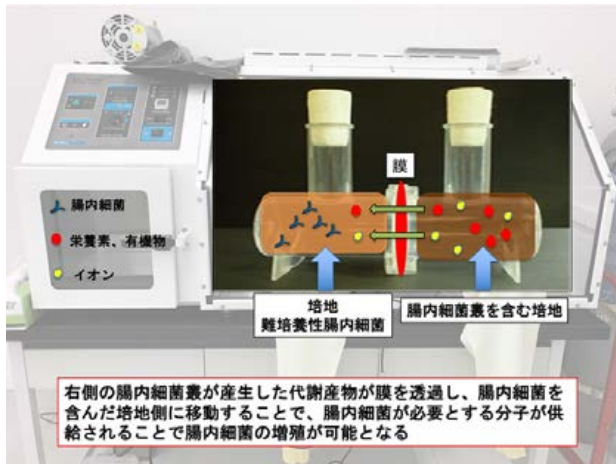


図2 二槽式透析培養器を用いた腸内細菌の培養

(3) 腸内細菌が生体に及ぼす影響の評価

これまでグラム陰性常在腸内細菌の一つを投与するとマウスの生存には影響しないものの、脾臓が肥大し、炎症に関する免疫応答が強く惹起されることを見出している。本年度は炎症の応答を惹起する成分を特定するために細菌分画を投与した。その結果、グラム陰性常在腸内細菌膜分画を投与すると投与後12時間で脾臓の重量の増加、免疫細胞の増加が認められた。一方で、骨髓の細胞を検討したところ造血幹細胞や骨髓系前駆細胞の減少が見られた。これらの結果から、グラム陰性常在腸内細菌の膜成分が炎症の引き金となり、造血幹細胞および多能性前駆細胞が脾臓に移行し、免疫細胞を増やしていることが示唆された。

さらにグラム陰性常在腸内細菌の定着が粘膜免疫系に及ぼす影響を評価するため無菌マウスおよび単独グラム陰性常在腸内細菌定着マウスにおける脾臓での免疫細胞の検討を行った。その結果、脾臓の重量や免疫細胞数に大きな変化は生じておらず、菌の定着のみでは脾臓における炎症を惹起しないことを明らかにした。

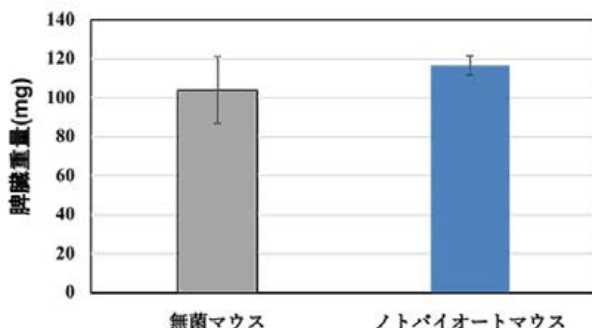


図3 同週齢の無菌マウスとグラム陰性常在腸内細菌定着マウス（ノトバイオートマウス）の脾臓重量の検討

(4) 標的腸内細菌単離に向けたツールの開発

多種多様の腸内細菌から構成される腸内細菌叢から標的となる細菌を単離するには選択培地や特定の基質した

培地による培養など経る必要がある。そこでより効率よく標的細菌のみを単離・濃縮する方法の検討を行った。そこで抗体に着目した。抗体は免疫細胞が賛成する糖タンパク分子で特定の分子を認識して結合する働きを担う。実際に生体内に侵入した外来抗原を認識し、排除する機構にも抗体は関与している。一方で、腸内細菌を認識する抗体の作製は過去にも報告はあるが、近い種族の腸内細菌も認識してしまうという課題がある。そこで本プロジェクトでは標的抗原に対する特異性の高い抗体の作製が可能な手法を用いて、特定の腸内細菌を標的とする抗体の作製を試みた。グラム陽性腸内細菌の一つを標的とする抗体作製を行い、同種族の腸内細菌に対して様々な反応様式をとる抗体産生細胞が得られた。その中の一つは、標的となるグラム陽性細菌特異的な結合がありながら、同種族の腸内細菌には結合を示さなかった。また、標的細菌を含む複数の腸内細菌基準株を混合した疑似腸内細菌叢から本抗体を用いることで効率よく標的細菌を単離・濃縮する系の構築に成功した。

3. 研究協力体制に関して

本プロジェクトでは研究を円滑に進めていくために様々な研究機関との共同研究を実施している。そのため、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、筑波大学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活用している。また、森下仁丹株式会社および熊本大学とは定期的に進捗状況を報告する機会を設け、プロジェクトの成果や課題の共有を行い、共同研究の進め方を議論している。

図4 本プロジェクトの研究協力体制

4. 総括

プロジェクト3年目となる本年度は、研究計画に沿った研究項目に取り掛かり、概ね予定通り研究を進めることができた。来年度以降も引き続き研究目標以上の成果を生み出せるように尽力する。

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、大縄 悟志

1. はじめに

ヒトを含む哺乳類は、生後すぐに外部の環境に曝さ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、40 兆個もの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息密度が高い場所の一つとなっている。腸内細菌同士は互いに生存競争を繰り広げたり、互いに支えあったりしながら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

宿主と共生関係を構築している腸内細菌叢は宿主に有益な効果をもたらしている。我々は呼吸や飲食などにより、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、その際に代謝物質として低分子を菌体外に放出する。腸内細菌叢由来代謝物質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も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物質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主要な細菌群の一種であ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する酪酸は、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 細胞の分化誘導を促進するといった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知られている。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、腸内細菌叢をはじめとする腸内環境を正常に保つことは健康維持にとって重要となる。

1. 2 個々の腸内細菌を対象とした研究の重要性和課題

これまでの研究から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。また、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事が明らかとなってきた。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、それらの代謝物質が腸内細菌叢を構成するものの腸内細菌由来するものであるかについては、不明な点が多い。また、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に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。脱酸素剤などを利用した簡易的嫌気環境の構築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ものの、依然として単離、培養ができない腸内細菌も数多く残されているのが現状である。

1. 3 腸内環境制御基盤技術の構築に向けて

腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に制御す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. 腸内細菌単独定着マウスを作製や腸内細菌の投与が生体を与える影響の評価する

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となる創薬、栄養補助食品、機能性食品の開発にも直結することが期待される。

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 16 種類を入手した。これらの腸内細菌基準株に加え、これまで安定培養法が確立できていない 6 種類の腸内細菌基準株を加えた合計 22 種類の基準株の安定培養方法の確立を試みた。

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、嫌気チャンバー内にて腸内細菌基準株の培養を試みた。本年度入手した腸内細菌基準株のうち12種類に関しては安定培養方法を確立できた。残りの4種類に関してはGAM培地単独では培養できなかった。そこで、理化学研究所バイオリソースセンター（BRC）の情報をもとに特定の基質をGAM培地に添加したものを使用して、培養を試みた。その結果、残りの4種類についても安定培養法を確立することに成功した。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であることを確認した。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。

	検討数	培養成功数
グラム陽性菌	16種	16種 (GAM12種, 改良型GAM4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 ヒト由来腸内細菌の単離、培養

これまでに確立してきた嫌気培養方法を用いて、ヒト便試料からの腸内細菌の単離、培養を試みた。本年度は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(mYCFA)を用いてヒト便試料より腸内細菌の単離、培養を試みた。はじめに便試料から未消化物などを含む夾雑物をフィルターにて除去したのちに、mYCFA液体培地で一晚培養した。次に培養液をmYCFA寒天培地に播種し、培養プレート上から単コロニーを分取、培養した後にコロニーPCRにより目的となるコロニーを選択した。その後、シークエンス解析により菌株の同定を実施し、今後の研究のためグリセロールストックの作成を行った。本年度は、2種類のグラム陰性菌を合計4株単離、培養することに成功した(図1)。

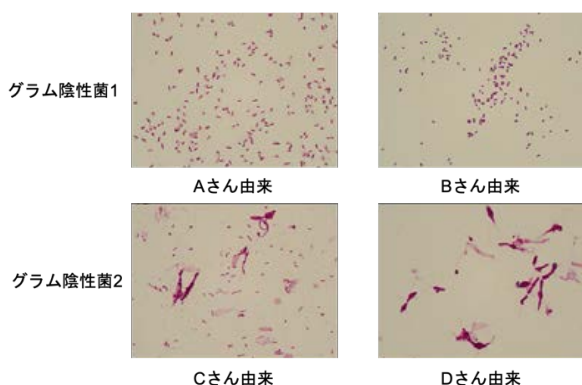


図1 健康人便試料より単離した腸内細菌のグラム染色

2.3 ヒト由来腸内細菌単離に向けた新規培養技術の確立

腸内細菌同士は生存競争をすることにより宿主の消化管内の限られた生存領域を確保しているが、一方で、互い

に共生関係を持つ腸内細菌も存在している可能性が示唆されている。このような腸内細菌は互いの利益になるような代謝物質を産生、利用することで増殖していることが推察される。そこで微生物共生系を検討するために、二槽式透析培養器を用いた培養方法を構築した。本年度は装置の小型化および栄養素供給側の使用培地の至適条件の検討を実施した。はじめに装置の小型化に関する検討を行なった。現在使用しているガラス製二槽式透析培養器は片側に12-15 mlの培地が必要となる。栄養素供給側の使用培地する培地の量も多くなってしまう。近年、プラスチック製の類似した構造を有する培養器(Uniwells、図2)が購入可能となった。本プラスチック製共培養器は最大容量が1.0-1.5 mlと少なく、使用する培地を減らすことが可能である。そこでUniwellsを用いて難培養性腸内細菌基準株の培養を試みた。培養後24時間以降、菌の増殖が開始される様子が確認された。しかしながら96時間培養後にグラム染色により便懸濁液を用いて増幅された菌を確認したところ標的細菌以外にも複数の菌が増殖していることが確認された(図2)。複数回実験を繰り返し実施したが目的の菌のみの培養することは出来なかった。これらの結果から、装置を小型化するには現状使用しているガラス製培養機器自体を小型化する必要であると考えられる。

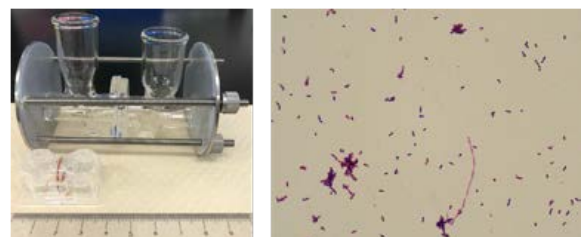


図2 小型透析培養器の検証、左図はガラス器具との大きさの違い、右図は小型装置で培養した後のグラム染色画像

次に、栄養供給側に使用する培地の検証を行なった、様々な物質を含む培地を用意し、難培養性腸内細菌基準株の培養を行なった。その結果、いくつかの培地で難培養性腸内細菌基準株を培養することが出来た。興味深いことに、培養した同じ腸内細菌基準株の形態が使用した培地により異なることを見出した(図3)。これは供給培地側から入り込む栄養素が異なり、腸内細菌自体の増殖効率や環境ストレスが変化することにより生じていることが示唆される。

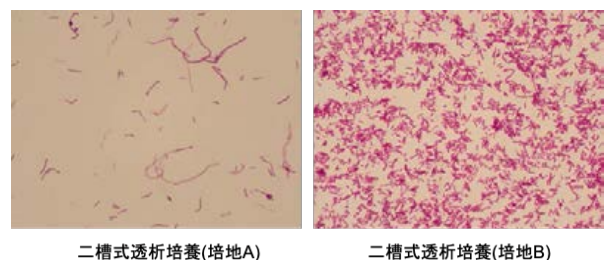


図3 二槽式透析培養器を用いた難培養性腸内細菌基準株の培養検討、培地Aの形態がBRCに掲載されているグラム染色像に近い。

2. 4 腸内細菌が生体に与える影響の評価

本プロジェクトはこれまでに 40 種類を超える腸内細菌基準株の安定培養方法を確立してきた。それらを用いることにより、昨年度にグラム陰性常在腸内細菌の一つが脾臓において強い炎症応答を引き起こし、各種免疫細胞の増加を引き起こすことを明らかにしてきた。本年度はさらに詳細な機構を解明するために炎症を引き起こすグラム陰性常在細菌側の因子および様々な組織に対する影響を検証した。その結果、細菌の膜成分を投与すると、細菌を投与した際と同様の炎症が引き起こされることを新たに見出した。また新たに、骨髄において造血幹細胞や骨髄系前駆細胞の減少が見られた。これらの細胞サブセットの減少は脾臓やリンパ節などの全身に細胞が移行したことによるものであると推測される。これらの結果からグラム陰性常在腸内細菌の膜成分が炎症の引き金となり、造血幹細胞および多能性前駆細胞が脾臓に移行し、免疫細胞を増やしていることが示唆された。

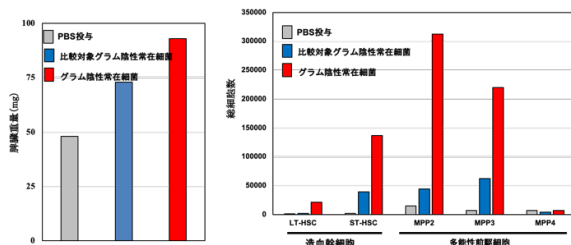


図 4 細菌膜成分投与後 12 時間における脾臓の重さ（左図）および骨髄における各細胞数（右図）

グラム陰性常在腸内細菌の定着が生体に与える影響を評価するため無菌マウスおよび単独グラム陰性常在腸内細菌定着マウスにおける脾臓での免疫細胞の検討を行なった。その結果、脾臓の重量や免疫細胞数に大きな変化は生じておらず、菌の定着のみでは脾臓における炎症を惹起しないことが明らかとなった。以上のことから、グラム陰性常在腸内細菌は恒常性が保たれた状態では生体内に侵入できないため炎症を惹起できないことを示唆するものであった。今後炎症時における本グラム常在腸内細菌が及ぼす影響を明らかにするには実験腸炎モデルによる検証が必要である。

3. 考察及び今後の展望

本年度は 16 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、安定培養法の確立出来ていない腸内細菌基準株に関しては引き続き二槽式透析培養器を用いた培養による培養を検討していく。常在グラム陰性腸内細菌の免疫感作により引き起こされる強い炎症応答に関しても引き続き詳細なメカニズムの解明を進めていく。共同研究先とも連携しつつ、一つでも多くの腸内細菌単独定着マウスを構築し、代謝物の網羅的解析、腸管上皮細胞や免疫細胞の変化を検討する。

4. 謝辞

本実験の遂行にあたり、腸内細菌の分離、新規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、筑波大学トランスボーダー医学センターの尾

花望博士、森下仁丹株式会社の河野麻美子博士を始め多くの方々のご協力を賜りました。腸内細菌が生体に与える影響の評価では熊本大学 滝澤仁教授、林慶和博士のご協力を賜りました。ま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、何裕遥氏、野津量子氏から腸内細菌単独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 Odamaki, 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

腸内環境制御基盤技術の開発に向けた研究ツールの作成

大縄 悟志、中藤 学、井上 浄

1. はじめに

ヒトの腸管内に共生する腸内細菌は食物由来の未消化物を発酵分解することで代謝物質を産生し、腸管上皮細胞の恒常性維持や粘膜免疫系の構築に寄与している。中には腸内環境改善効果を有する菌も存在しており、それらを含む製品や食品はプロバイオティクスと呼ばれ、腸内環境を整え、宿主に良い影響をもたらす。その一方で、生活習慣の乱れなどのストレスにより腸内細菌叢が攪乱されると、腸内細菌叢より産生される代謝物質が疾患の発症に関与することも知られている。機能性食品やプロバイオティクスの開発や、疾患に関連する腸内細菌を標的とした創薬を効率よく進めるには、標的となる腸内細菌を宿主の腸内細菌叢から効率よく分離するツールの開発が必要不可欠である。

1. 1 腸内環境を整える方法と課題

腸内細菌叢を含む腸内環境を整える方法として、ヨーグルトや発酵食品等の機能性食品の摂取が一般に浸透しており、これは日常的に実施可能という観点から予防的アプローチとして広く利用されている。しかしながら、機能性食品を摂取している間は便中から機能性食品に含まれる有用菌が検出されるものの、摂取していない期間は体内から有用菌は検出されなくなるため（参考文献 1）、機能性食品の効果は一時的であることが示唆されている。一方で、人から分離した有用菌を人に摂取することで 200 日間経過しても摂取した有用菌が検出されるという報告もある（参考文献 2）。また、臨床的見知からは、潰瘍性大腸炎などの特定疾患に指定されている炎症性腸疾患治療において「便細菌叢移植療法」が一定の効果を示すことが報告されている（参考文献 3、4）。しかしながら、これらの方法は同一個人由来の細菌叢ではなく他人の細菌叢のため、投与した腸内細菌群が患者の腸内に定着できないなどの問題も残る。そこで我々は腸内環境を調整する一つの手法として、外来性細菌ではなく宿主由来の腸内細菌を利用し、再度体内に戻すことにより、持続的な腸内環境改善が期待できると考えた。このような腸内環境制御基盤技術の開発を行うには宿主由来の特定の腸内細菌を多種多様な腸内細菌が存在する腸内細菌叢の中から効率よく標的細菌のみを単離するツールの開発が重要となってくる。

1. 2 標的細菌特異的抗体の作製意義

抗体は免疫細胞の一つである B 細胞から産生される糖タンパク質で、抗原と呼ばれる免疫応答を引き起こす物質に特異的に結合する能力を持っている。抗原の中には細菌も含まれており、特定の細菌を認識することのできる抗体

も報告されている。例えば、有用菌の一つである *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) に対する抗体作製の報告がある。本抗体は *B. longum* を認識するものの、他の *Bifidobacterium* 属細菌にも広く交差性を示すため腸内細菌叢などの集団から標的となる *B. longum* を特異的に単離・濃縮するために利用することは困難であることが示唆される（参考文献 5）。*B. longum* に対する抗体以外にも市販の細菌に対する抗体も多くのもが標的細菌以外の細菌に反応するという問題がある。そのため、腸内細菌叢を構成する多種多様な腸内細菌の中から標的となる細菌のみを単離するにはより特異性の高い抗体の使用が求められる。

1. 3 腸内環境制御基盤技術の構築のための研究ツール作成

腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に制御す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。プロバイオティクスのような基盤技術を構築するため以下に示す 2 つの課題に取り組んだ

1. 特異性の高い腸内細菌特異的抗体の取得
2. 作製した腸内細菌特異的抗体を用いた標的細菌の分離・濃縮法の検討

2. 実験と結果

2. 1 標的腸内細菌特異的抗体の作製

本研究室で安定培養方法を確立した菌の中から、腸内細菌 A（以後、菌 A）を選択し、菌 A に対する抗体の作製を試みた。はじめに従来の抗体の作製方法と本研究室で確立した免疫不全マウスを使用した新規抗体作製方法（以降、新規法と記載する）を比較し、抗原感作後における血清中の抗体価の確認を ELISA 法により検討した。最終抗原感作が終了した時点で、血清を採取し、抗体価を検討したところ従来法に比べ、新規法では有意な抗体価の上昇が確認された（図 1）。

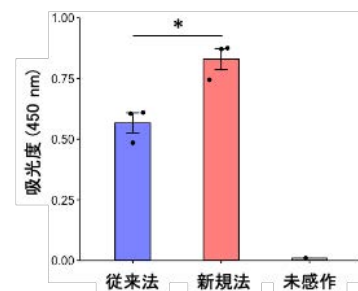


図 1 最終抗原感作後の血清中の菌 A に対する抗体価の比

較、青は従来法、赤は新法、グレーは未感作をそれぞれ示す。
* $p < 0.05$

2. 2 菌 A に対する特異的な抗体の選抜

抗体価の上昇が確認されたマウスの脾臓を用いて、抗体産生細胞（ハイブリドーマ）の構築を行なった。得られた 48 クローンのハイブリドーマの中から菌 A に対する反応性が高いものを選択し、以後の解析に用いた。はじめに、菌 A に対する特異性を検証するために、菌 A および菌 A と同属の腸内細菌に対する抗体の反応性の検証を行なった。フローサイトメータを用いて、各菌と抗体との反応を検討したところ菌 A 以外の同属の菌に対して反応性を示さなかった（図 2）。次に作製した抗体と腸内細菌叢を構成する代表的なグラム陰性菌、グラム陽性菌との反応性の検証を行なった。2 種類のグラム陰性菌、3 種類のグラム陽性菌に対する抗体の反応性を検証したところ全ての菌に対して結合は見られなかった（図 3）。これらの結果から、新法を用いた抗体作製方法は標的細菌に対して高い特異性を有する抗体を作製するための有効な手法であることが明らかとなった。

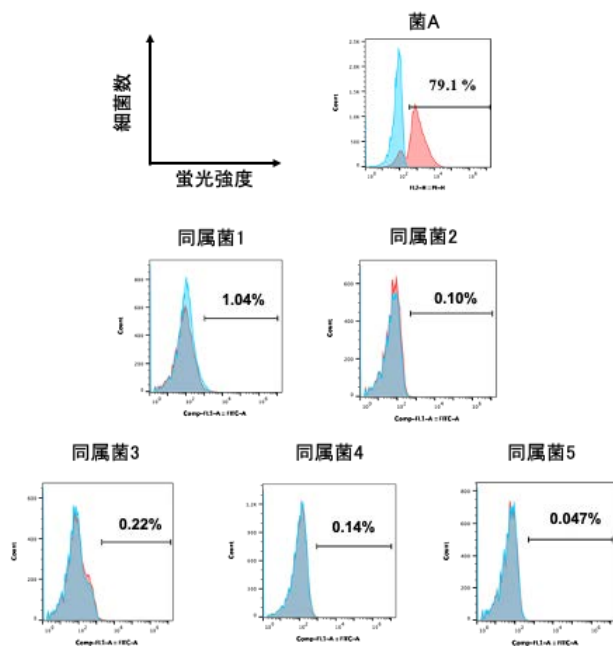


図 2 フローサイトメータによる抗体と菌 A および同属菌への結合の検証。赤色は菌 A に対する抗体、青はアイソタイプコントロール抗体をそれぞれ示している。

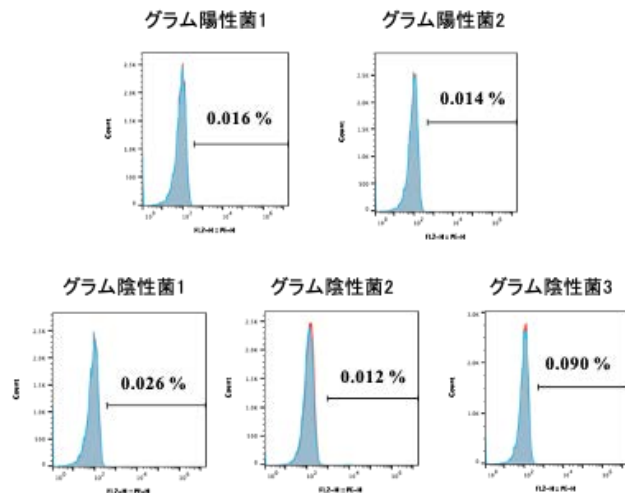


図 3 フローサイトメータによる抗体と代表的な腸内細菌への結合の検証。赤色は菌 A に対する抗体、青はアイソタイプコントロール抗体をそれぞれ示している。

2. 3 抗体を使用したアプリケーションの検討

標的となる腸内細菌を特異的に認識する抗体が得られたため、次に腸内環境制御基盤技術へと応用するためのツールとしての有用性を検証した。まず、作製した抗体を用いて以下の点についての評価を行った。

1. 抗体が結合した標的細菌が再培養できるか
2. 複数の腸内細菌が存在する中から標的細菌のみを単離・濃縮することが可能か

一般的に抗体を用いた標的の分取方法としてはフローサイトメトリーを使用した分離方法が使用されている。しかしながら、酸素濃度に過敏な腸内細菌を扱うためには可能な限り嫌気環境下において作業をする必要が生じる。そこで、本プロジェクトでは抗体、磁気ナノ粒子、カラムを使用して標的を分離することが可能な、Magnetic-activated cell sorting (MACS) を使用することとした。MACS 機材は嫌気チャンパーに入れ込むことが可能であり、嫌気環境下で作業をすることが可能である。

項目 1 の検討のため標的細菌に特異的な抗体および MACS に必要な各種試薬を反応させたサンプルをカラムに通したのちに、標的分画を寒天培地に撒種し、コロニーが形成されるかどうかの検討を行なった。未処理の状態と MACS 工程を経たサンプルの双方においてコロニー形成が確認された。このことから MACS 試薬は標的細菌の生育を阻害しないことが明らかとなった（図 4）。

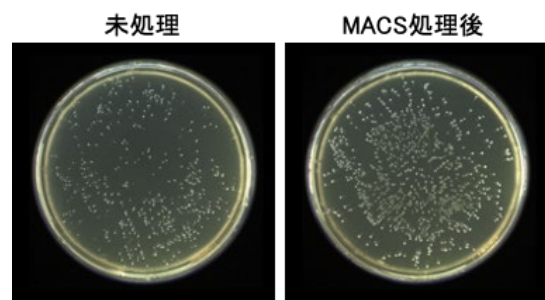


図 4 未処理と MACS 処理した後の菌 A を寒天培地に播種したのち 24 時間後のコロニー形成の様子

最後に菌 A および 5 種類の腸内細菌 B から F までを混合した、擬似腸内細菌叢から作製した抗体を用いた MACS により菌 A の単離・濃縮を検討した。作製した抗体を擬似腸内細菌叢に反応させたのち、MACS による分離・濃縮を検証した。MACS 前後の試料をそれぞれフローサイトメータにて解析したところ、標的細菌を含まない分画であるフロースルー分画では菌 A が含まれず、標的分画の方にのみ菌 A のシグナルが観察された。より詳細な解析を実施するため MACS 後のフロースルー分画と標的分画からそれぞれ DNA を抽出し、菌 A を検出するプライマーおよび腸内細菌 B を検出するプライマーを利用した定量 PCR を実施した。その結果、フローサイトメータの結果と同様の結果を得ることができた。これらの結果から本プロジェクトで作製した抗体を用いることで効率よく標的細菌を分離・濃縮するツールとして利用できる可能性を示せた（図 5）。

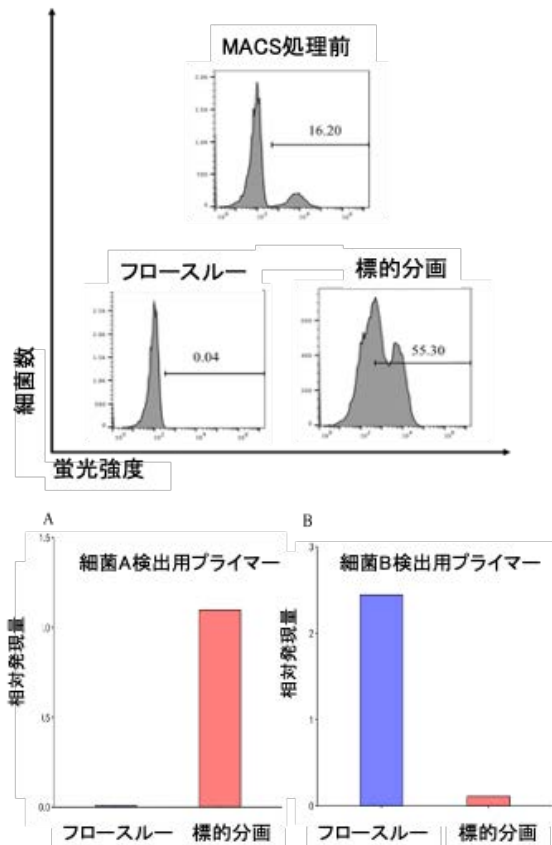


図 5 MACS 前後におけるそれぞれの試料の FACS の結果（上段）、菌 A 検出用プライマーおよび菌 B 検出用プライマーを用いた q-PCR（下段）

3. 考察及び今後の展望

本年度は腸内環境制御基盤技術の構築に向けたツールの作成として腸内細菌特異的抗体の作製に着手し、新規法を利用することで標的細菌のみを認識する抗体の作製に成功した。それらの抗体を利用して、擬似腸内細菌叢からの標的細菌の分離・濃縮法を構築することができた。来年度以降の課題としては、多種多様な腸内細菌で構成される腸内細菌叢からの標的細菌の単離・濃縮法の検証が必要とな

る。また、これまでに蓄積した腸内細菌の基礎データの中から機能性食品への応用や創薬の標的になりうる腸内細菌に対する抗体の作製を進めていく予定である。

4. 謝辞

本実験の遂行にあたり、慶應義塾大学の井上ひかる氏、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、何裕遥氏、野津量子氏にご協力を賜りました。厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

- 1 Kim, S., Suda, W., Kim, S., Oshima, K., Fukuda, S., Ohno, H., Morita, H., Hattori, M., Robustness of Gut Microbiota of Healthy Adults in Response to Probiotic Intervention Revealed by High-Throughput Pyrosequencing. *DNA Res.* Jun;20(3):241-53, 2013
- 2 Maldonado-Gomez, M.X., Martinez, S., Bottacini, F., O'Callaghan, A., Ventura, M., van Sinderen, D., Hillmann, B., Vangay, P., Knights, D., Hutkins, R.W., Walter, J. Stable Engraftment of *Bifidobacterium Longum* AH1206 in the Human gut depends on individualized features of resident microbiome. *Cell Host Microbe.* Oct 12; 20(4):515-526, 2016.
- 3 Ishikawa, D., Sasaki, T., Osada, T., Kuwahara-Arai, K., Haga, K., Shibuya, T., Hiramatsu, K., Watanabe, S. Changes in intestinal microbiota following combination therapy with fecal microbial transplantation and antibiotics for Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis.* Jan;23(1):116-125, 2017.
- 4 Paramsothy, S., Kamm, M.A., Kaakoush, N.O., Walsh, A.J., van den Bogaerde, J., Samuel, D., Leong, R.W.L., Connor, S., Ng, W., Paramsothy, R., Xuan, W., Lin, E., Mitchell, H.M., Borody, T.J. Multidonor intensive fecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet.* Mar 25;389(10075):1218-1228
- 5 Amrouche, T., Boutin, Y., Moroni, O., Kheadr, E., Fliss, I. Production and characterization of anti-bifidobacteria monoclonal antibodies and their application in the development of an immune-culture detection method. *J Microbiol Methods* Apr;65(1):159-70, 2006

業績

【原著論文】

1. Nanto-Hara F, Kanemitsu Y, *Fukuda S, Kikuchi K, Asaji K, Saigusa D, Iwasaki T, Ho HJ, Mishima E, Suzuki T, Suzuki C, Tsukimi T, Matsuhashi T, Oikawa Y, Akiyama Y, Kure S, Owada Y, Tomioka Y, Soga T, Ito S, *Abe T.
The guanylate cyclase C agonist linacotide ameliorates the gut-cardio-renal axis in an adenine-induced mouse model of chronic kidney disease.
Nephrol. Dial. Transplant. 2020 Feb 1;35(2):250-264.
doi: 10.1093/ndt/gfz126.
2. Erawijantari PP, Mizutani S, Shiroma H, Shiba S, Nakajima T, Sakamoto T, Saito Y, Fukuda S, Yachida S, Yamada T.
Influence of gastrectomy for gastric cancer treatment on faecal microbiome and metabolome profiles.
Gut 2020 Jan 16. pii: gutjnl-2019-319188.doi: 10.1136/gutjnl-2019-319188. [Epub ahead of print]
3. Kitamoto S, Alteri CJ, Rodrigues M, Nagao-Kitamoto H, Sugihara K, Himpls SD, Bazzi M, Miyoshi M, Nishioka T, Hayashi A, Morhardt TL, Kuffa P, Grasberger H, El-Zaatari M, Bishu S, Ishii C, Hirayama A, Eaton KA, Dogan B, Simpson KW, Inohara N, Mobley HLT, Kao JY, Fukuda S, Barnich N, Kamada N.
Dietary L-serine confers a competitive fitness advantage to Enterobacteriaceae in the inflamed gut.
Nat. Microbiol. 5: 116-125, 2020.
4. Yang J, Tsukimi T, Yoshikawa M, Suzuki K, Takeda T, Tomita M, *Fukuda S.
Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) 16S rRNA genotyping of microbial samples from possessions contributes to owner identification.
mSystems 4: e00594-19, 2019.
5. Jo R, Nishimoto Y, Umezawa K, Yama K, Aita Y, Ichiba Y, Murakami S, Kakizawa Y, Kumagai T, Yamada T, *Fukuda S.
Comparison of oral microbiome profiles in stimulated and unstimulated saliva, tongue, and mouth-rinsed water.
Sci. Rep. 9: 16124, 2019. (IF=4.122)
6. Tanaka K, Watabe T, Kato K, Tsukimi T, Sato MP, Odamaki T, Tomita M, *Fukuda S.
Draft genome sequences of Enterococcus faecalis strains isolated from healthy Japanese individuals.
Microbiol. Resour. Announc. 8: e00832-19, 2019.
7. Aw W, *Fukuda S.
Protective effects of bifidobacteria against enteropathogens.
Microb Biotechnol. 2019 Jul 8.
8. Yachida S, Mizutani S, Shiroma H, Shiba S, Nakajima T, Sakamoto T, Watanabe H, Masuda K, Nishimoto Y, Kubo M, Hosoda F, Rokutan H, Matsumoto M, Takamaru H, Yamada M, Matsuda T, Iwasaki M, Yamaji T, Yachida T, Soga T, Kurokawa K, Toyoda A, Ogura Y, Hayashi T, Hatakeyama M, Nakagama H, Saito Y, Fukuda S, Shibata T, Yamada T.
Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer.
Nat Med. 2019 Jun;25(6):968-976.
9. Kikuchi K, Saigusa D, Kanemitsu Y, Matsumoto Y, Thanai P, Suzuki N, Mise K, Yamaguchi H, Nakamura T, Asaji K, Mukawa C, Tsukamoto H, Sato T, Oikawa Y, Iwasaki T, Oe Y, Tsukimi T, Fukuda NN, Ho HJ, Nanto-Hara F, Ogura J, Saito R, Nagao S, Ohsaki Y, Shimada S, Suzuki T, Toyohara T, Mishima E, Shima H, Akiyama Y, Akiyama Y, Ichijo M, Matsuhashi T, Matsuo A, Ogata Y, Yang CC, Suzuki C, Breeggemann MC, Heymann J, Shimizu M, Ogawa S, Takahashi N, Suzuki T, Owada Y, Kure S, Mano N, Soga T, Wada T, Kopp JB, Fukuda S, Hozawa A, Yamamoto M, Ito S, Wada J, Tomioka Y, Abe T.
Gut microbiome-derived phenyl sulfate contributes to albuminuria in diabetic kidney disease.
Nat Commun. 2019 Apr 23;10(1):1835.

【口頭発表】

（招待講演）

1. 福田真嗣
腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアがもたらす未来
第35回日本臨床栄養代謝学会学術集会, 京都府, 2020年2月27日
2. 福田真嗣
もう一つの臓器腸内細菌叢の機能に迫る 微生物の個・集団・共生が支える持続可能な社会
茨城県つくば市, 2020年2月10日
3. 田中一己, Aw Wanping, 鈴木健大, 尾花望, 楊佳約, 木村彰宏, 冨田勝, 福田真嗣.
米ぬか摂取による大腸炎抑制効果は腸内細菌叢由来トリプトファン代謝物質がもたらす
第42回日本分子生物学会年会, 福岡県博多市, 2019年12月6日
4. 福田真嗣

腸内環境を標的とした新たな疾患予防・治療基盤技術の創出

第 23 回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 愛媛県松山市, 2019 年 12 月 6 日

5. 中藤学
私たちと腸内細菌:腸内環境を整えて、健康寿命を延ばそう
健康に働くための腸内細菌セミナー 神奈川県川崎市, 2019 年 10 月 28 日
6. 福田真嗣
微生物叢に基づく層別化医療・ヘルスケアがもたらす未来
第 3 回大型医療研究推進フォーラム 歯科医師会館(東京)、2019 年 5 月 25 日
7. 福田真嗣
第 3 の液性因子:腸内細菌叢由来代謝物質がもたらす機能
第 92 回日本内分泌学会学術集会 仙台国際センター(宮城)、2019 年 5 月 10 日

(口頭発表)

1. Haruno Takahashi, Kazuki Tanaka, Nao Takeuchi, Nozomu Obana, Masaru Tomita, Shinji Fukuda
Investigating the relationships between gut microbiota and obesity onset in androgen receptor knockout mice
Miami Winter Symposium 2020 Molecular Mechanisms Linking the Microbiome and Human Health, Miami, Florida, 2020 年 1 月 27 日
2. Hikaru Inoue, Gaku Nakato, Masaru Tomita, Joe Inoue, Shinji Fukuda
Development of target bacterial isolation method using anti-bacterial species specific monoclonal antibody
Miami Winter Symposium 2020 Molecular Mechanisms Linking the Microbiome and Human Health, Miami, Florida, 2020 年 1 月 27 日
3. Kazuki Tanaka, Wanping Aw, Kenta Suzuki, Nozomu Obana, Jiayue Yang, Akihiro Kimura, Masaru Tomita, Shinji Fukuda
Gut microbiota-derived tryptophan metabolites from rice bran dietary intervention ameliorate colonic inflammation
Miami Winter Symposium 2020 Molecular Mechanisms Linking the Microbiome and Human Health, Miami, Florida, 2020 年 1 月 27 日
4. Nao Takeuchi, Kazuki Tanaka, Wanping Aw, Nozomu Obana, Masaru Tomita, Shinji Fukuda
Understanding the anti-obesity molecular mechanisms of rare sugar, D-psicose, intake via gut microbiota modulation
Miami Winter Symposium 2020 Molecular

Mechanisms Linking the Microbiome and Human Health, Miami, Florida, 2020 年 1 月 27 日

5. 田中一己, Aw Wanping, 鈴木健大, 尾花望, 楊佳約, 木村彰宏, 富田勝, 福田真嗣
米ぬか摂取による大腸炎抑制効果は腸内細菌叢由来トリプトファン代謝物質がもたらす
日本農芸化学会 2019 年度関東支部例会, 東京都世田谷区, 2019 年 12 月 7 日
6. 竹内奈穂, 田中一己, Aw Wanping, 尾花望, 富田勝, 福田真嗣
希少糖摂取がもたらす腸内細菌叢を介した抗肥満効果の分子機構の解明
第 42 回日本分子生物学会年会, 福岡県博多市, 2019 年 12 月 6 日
7. 高橋春乃, 田中一己, 竹内奈穂, 尾花望, 富田勝, 福田真嗣
アンドロゲン受容体欠損マウスにおける腸内細菌叢を介した肥満発症機構の解明
第 42 回日本分子生物学会年会, 福岡県博多市, 2019 年 12 月 6 日
8. 井上ひかる, 中藤学, 富田勝, 井上浄, 福田真嗣.
腸内細菌標的抗体を用いた標的腸内細菌分離技術の開発
第 42 回日本分子生物学会, 2019 年 12 月 4 日
9. 田中一己, Aw Wanping, 鈴木健大, 尾花望, 楊佳約, 富田勝, 福田真嗣
米ぬか摂取による大腸炎抑制効果は腸内細菌由来トリプトファン代謝物質がもたらす
第 23 回腸内細菌学会, 東京都江戸川区, 2019 年 6 月 18 日 最優秀発表賞 受賞

【共同研究成果】

(口頭発表)

1. Hayashi Y, Sezaki M, Sheoran S, Morishima T, Nakato G, Fukuda S, Takizawa H.
Microbial signal instructs early hematopoiesis upon intestinal tissue damage
48th Annual Scientific Meeting of International Society of Experimental Hematology, Brisbane, Australia, 2019 年 8 月 24 日
2. Takizawa H, Hayashi Y, Sezaki M, Sheoran S, Morishima T, Nakato G, Biswas S, Fukuda S.
Early hematopoiesis translates microbial signals to intestinal tissue repair
24th Congress of the European Hematology Association, Amsterdam, Netherlands, 2019 年 6 月 16 日

【特許】

- (1) 国内特許出願 1 件
- (2) 国外特許出願 0 件