

研究報告2021 目次

【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	99
◆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	103
◆業績	106

腸内環境制御グループ

◆総括	107
◆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培養法の確立	110
◆腸内環境制御基盤技術の開発に向けた研究ツールの開発	113
◆業績	116

「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／グループリーダー 大野 博司

【基本構想】

我が国において2型糖尿病患者は増加の一途をたどり、罹患者数は約1000万人を数えるに到っている。2型糖尿病は高齢者における主要な疾患であり、肥満・脂質異常症・高血圧などメタボリックシンドロームの病態に関与する諸疾患とともに動脈硬化を促進させる。更には心筋梗塞・脳卒中などの合併症のリスク増大を介して日本人の健康寿命を短縮する重大な原因となっており、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型糖尿病の病態に関与す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. 研究目的

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110mg/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、同数の非肥満で非耐糖能異常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。被験者の食事・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うことを目的とした(本研究における調査項目を下記に示す)。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(図1)。

<調査項目>

- 1) 通常の検診項目
身長、体重、腹囲、体脂肪率、血圧、脈拍、総蛋白、アルブミン、AST (GOT)、ALT (GPT)、 γ -GTP、総ビリルビン、ALP、LDH、コリンエステラーゼ、血清アミラーゼ、Na、K、Cl、Ca、P、Fe、総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪、LDLコレステロール、BUN、クレアチニン、尿酸、空腹時血糖値、ヘモグロビンA1c、赤血球数、白血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、尿蛋白、尿糖、腹部エコー
- 2) 食事・栄養調査
簡易型自記式食事歴法質問票(BDHQ)を用いた食事調査、活動量計
- 3) 血中サイトカインの測定
Adiponectin, MCP-1, CRP, Adipsin, Leptin, Resistin, SerpinE 1, TNFa, NGF, IL-6, Insulin, IL-8, HGF
- 4) ヒトゲノムDNAを用いた遺伝子多型解析
- 5) 便を用いたメタ16S解析、メタゲノム解析
- 6) 血液・便を用いたメタボローム解析
- 7) 単核球(PBMC)から抽出したRNAを用いたCAGE解析

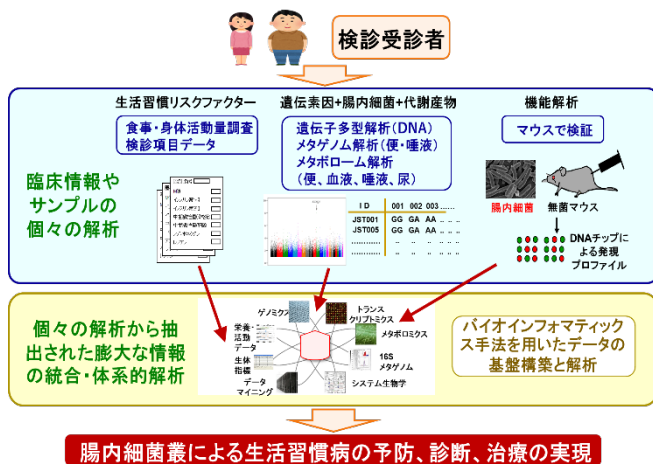


図1. プロジェクト概要



図2. 統合データベースの作成

2. 研究成果

(1) 被験者のリクルートと臨床情報の収集

2017年7月より生活習慣データのリクルートを開始し311名(健康者111名、肥満者100名、耐糖能異常者100名)のリクルートが終了した。簡易型自記式食事歴法質問票(BDQ)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については、219名分のBDQ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解析を完了した。

(2) 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(図2)。さらにデータベースの機能として、データベースとして利用する際に、研究者側の興味のある被験者のデータを取り出せるようにデータマート機能を実装した(図3)。取得したい臨床情報やオミクスデータを選択し、被験者の背景(年齢、性別、BMIなど)の設定値を入力して被験者の絞り込みを行い、出力することが可能となった。



図3. 統合データベースのデータマート機能

(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検体の糞便中から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) 腸内細菌叢解析

健康者、肥満者、耐糖能異常者の糞便検体を用いて、DNA抽出し、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い、菌種の同定を試みた。門レベルにおいて肥満者で Bacteroidetes が健康者、耐糖能異常と比較し有意に減少していた。更に肥満者では健康者と比較し Actinobacteria が有意に増加していた。以前の日本人の肥満

者と非肥満者の腸内細菌叢を比較した研究から、*Bacteroidetes* が肥満者で減少しており[1]、今回の研究結果と一致していた。

属レベルで有意差検定を行った結果、*Collinsella* 属のみが肥満群と耐糖能異常群で有意に増加していることがわかった。*Collinsella* 属の基準株である *C. aerofaciens* はヒトの主要な腸内細菌の1つとして知られている。*Collinsella* 属が肥満者で増加し、食物繊維摂取量の低下により増加するという報告[2]があるため、*Collinsella* 属は肥満により増加する細菌である可能性が考えられた。

(5) 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リングを行い代謝物クラスター (Co-abundance group; CAG) を作成した。まず、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、健康者、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 (インスリン抵抗性指数: 早朝空腹時の血中インスリン値と空腹時血糖値から算出され、インスリン抵抗性の簡便な指標として臨床によく使用される)、肥満の指標として BMI などを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は、単糖や糖代謝物のクラスターが 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。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、単糖や糖代謝物のクラスターは *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[3]。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[4]、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代謝物は動脈硬化性疾患との関連が示唆されており[5]、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。

(6) 腸内細菌叢のメタゲノム解析

上記で認められ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 290 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 6.5M の遺伝子を同定した (図 4)。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) [6]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。

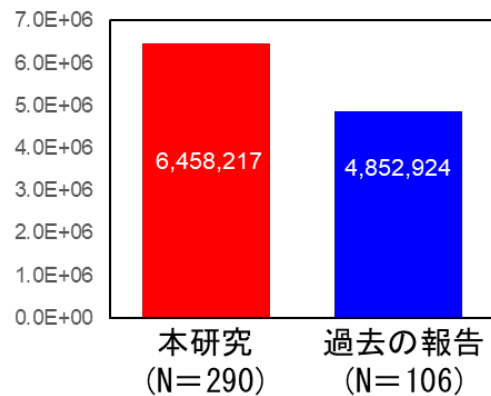


図 4. メタゲノム解析から推定された糞便中の腸内細菌の遺伝子数

メタゲノム解析の結果、糞便糖代謝物は Phosphotransferase system や Starch and sucrose metabolism など糖代謝に関わる KEGG pathway に含まれる遺伝子と強く相関しており、またこれらの遺伝子は HOMA-IR、中性脂肪などの代謝異常マーカーとも関連していた。以上の結果から、糞便代謝物と腸内細菌の機能変化が関連していることが示された。

(7) マウス試験によるインスリン抵抗性に関わる腸内細菌の評価

相関解析により、*Dorea* 属、*Coprococcus* 属などの腸内細菌はインスリン抵抗性の指標と正の相関を示し、*Bacteroides* 属、*Alistipes* 属などの細菌は負の相関を示した。このヒトのデータから示唆された細菌とインスリン抵抗性との因果関係を解析するため、高脂肪食誘発性肥満モデルマウスを用いて上記の腸内細菌を投与したマウスのインスリン抵抗性の評価を行った。C57BL/6N マウスに高脂肪食 (HFD) 負荷を行い、3 週間、計 6 回腸内細菌を経口投与した。その結果、体重増加には影響はなかったものの、インスリン負荷試験ではヒト由来検体の結果と同様の結果が得られた。

(8) PBMC の CAGE 手法による遺伝子発現解析

PBMC の CAGE 解析 (理化学研究所が開発した mRNA の 5'末端から約 20 塩基をタグとして切り出す技術で、高

速シーケンシング技術と組み合わせることによりゲノムワイドな遺伝子発現プロファイルを得ることができる)が完了した。この PBMC の遺伝子発現データと血漿中のサイトカインやアディポネクチンのデータとの相関解析を行ったところ、炎症性サイトカインやアディポネクチンと有意な相関のある遺伝子を明らかにした。また、その中でインスリン抵抗性 (IR) と有意な相関が見られた遺伝子は特に炎症に関わる遺伝子であることが分かった。この結果から、インスリン抵抗性の被験者は全身性の炎症状態にあることが推察された。

(9) メタデータを使用した IR と MetS 予測

取得した便中の腸内細菌メタ 16S データ、メタゲノムデータ、メタボロームデータを使用し、IR と MetS の診断の予測精度について ROC (receiver operating characteristic) 曲線を作成し、曲線下の面積 (AUC : area under the curve) から評価した。鑑別能力が高いデータであれば AUC の値は 1 に近づく。IR と MetS の診断において、メタ 16S データだけでは AUC は 0.6 前後で予測精度は低い結果であった。メタゲノムデータとメタボロームデータの AUC は 0.8 前後であり中程度の予測精度が得られた事がわかった。また、最も高い AUC はメタボロームデータであった事から、便中のメタボロームデータが最も IR や MetS の状態を反映していると考えられた。

3. 今後の展望

統合データベースについてはこれまでにリクルートした健常者、肥満者、耐糖能異常者のサンプルから、臨床情報、簡易型食事頻度アンケート(BDHQ)、CAGE 手法を用いた血中単核球の RNA-Seq データ、糞便中と血中の代謝物データ、糞便中の腸内細菌叢とメタゲノムデータの取得を完了しており、これらのデータを順次統合データベースに集約している。さらに、データ公開や提供に向けたインターフェース構築や運用方法について、現在、研究者から意見を聞き、運用にあたり必要なツールを実装するように開発を進めている。さらに、それぞれオミクス階層における単回帰分析や多重ロジスティック解析、腸内細菌解析特有の α 多様性、 β 多様性などの解析ツールを上記の統合データベースに組み込むとともに、横断的解析である相関解析、主成分解析、クラスター解析やランダムフォレストなどの機械学習のアルゴリズムなどの解析手法を取り入れる。また、被験者の全ゲノムシーケンスの解析を進め、個別化に向けた解析システムを構築する。

横断的解析ツールを用いて解析した結果、インスリン抵抗性やメタボリックシンドロームに関与する腸内細菌や代謝物を同定しており、インスリン抵抗性に関してはマウスモデルへの腸内細菌投与によりインスリン抵抗性の悪化、もしくは、インスリン感受性の改善を証明することができた。これらの結果について論文を投稿中である。

今後、本プロジェクトにより作成したデータベースや解析ツールを公開することにより、健常者、及び、生活習慣病発症に関する日本人特有の腸内細菌叢の変化、代謝物デ

ータ、臨床データ等を他の疾患と比較することも可能となり、他の疾患に対する新規バイオマーカーなどの探索や予防薬等の開発につながる事が期待できる。

【参考文献】

1. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, 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.* 2015;15:100.
2. Gomez-Arango LF, Barrett HL, Wilkinson SA, Callaway LK, McIntyre HD, Morrison M, et al. Low dietary fiber intake increases *Collinsella* abundance in the gut microbiota of overweight and obese pregnant women. *Gut Microbes.* 2018;9(3):189-201.
3. Allin KH, Tremaroli V, Caesar R, Jensen BAH, Damgaard MTF, Bahl MI, et al. Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. *Diabetologia.* 2018;61(4):810-20.
4. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444(7122):1027-31.
5. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011;472(7341):57-63.
6. Nishijima S, Suda W, Oshima K, Kim SW, Hirose Y, Morita H, et al. The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA research* 2016;23(2):125-33.

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

腸内細菌叢プロジェクト 解析ツール開発グループ

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。

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110mg/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の受診者を健康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。2017年7月よりリクルートを開始し311名(健康者111名、肥満者100名、耐糖能異常者100名)をリクルートした。

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. 3 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ガスクロマトグラフィー質量分析計 (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 を加え誘導化を行った。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。

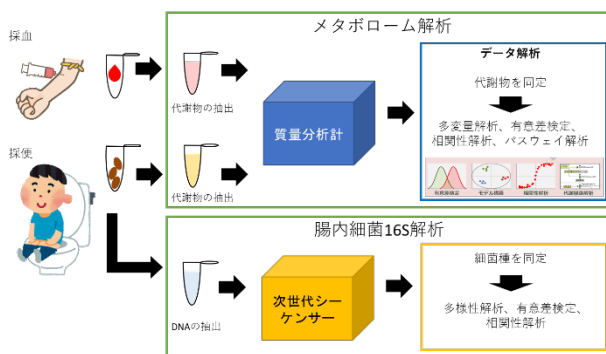


図 1. 分析の概要

2. 2 結果

2. 2. 1 腸内細菌叢解析の結果

腸内細菌叢の全体的な変化を比較するため、データのグループ間の距離の指標である Weighted unifracs distance を計算し Principal coordinate analysis (PCoA) プロットを行ったところ、3 群は分かれることはなかったため、全体的な細菌叢において変化は見られなかった。また、腸内細菌叢の多様性の低下が疾患に関連するなどの報告があるが、多様性についても 3 群では変化がなかった。次に、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 群で有意に増加していることが分かった。

2. 2. 2 メタボローム解析の結果

血液、及び、糞便から水溶性代謝物を抽出し、水溶性代謝物は GCMS を用いて分析を行い、306 検体の糞便中から 124 種類、血清中から 102 種類の代謝物を同定した。まず、代謝物に関しても全体的な傾向を調べるため、主成分分析 (Principal component analysis: PCA) を行った結果、血漿中代謝物は IGT 群が他の 2 群と比較しクラスターが分離しており、全体的に代謝物に変化がみられた。一方で糞便中代謝物についてはあまり 3 群が分離しておらず、全体的な傾向に違いは見られなかった。次に、血漿中代謝物について、多群検定を行い 3 群間で有意に異なる代謝物を調べた。その結果、64 化合物に有意差 (P 値が 0.05 以下) が見られた。有意差が見られた血漿中代謝物の種類について着目するとアミノ酸や単糖が IGT 群で多く、短鎖脂肪酸が健常者群で多いことが分かった。

糞便中代謝物についても、多群検定を行い 3 群間で有意に異なる代謝物を調べた。その結果、34 化合物に有意差 (P 値が 0.05 以下) が見られた。血漿中代謝物ではアミノ酸や単糖が IGT 群が多かったが、糞便中代謝物では肥満群で特にそれらの物質が多い傾向にあり、血漿中と糞便中では異なる傾向にある事が分かった。

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 GCMS 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 GCMS 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 (LCMS) を使用し計測する代謝物を増やし解析するため、新たな LCMS 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%ギ酸)、B 液 (0.1%ギ酸/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、腸内細菌が介在し動脈硬化を誘発する報告がある代謝物 4 物質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 GCMS のシステムで 310 物質、LCMS のシステムで 22 物質を計測することが可能となった。

2. 2. 4 動脈硬化関連代謝物と HOMA-IR との関連性

LCMS で計測した動脈硬化を誘発する代謝物について、健常者群、肥満群、IGT 群で比較した結果、血漿中の代謝物 A が健常者群と比較し IGT 群で有意に増加していた (P=0.0008, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test)。その他の関連代謝物は IGT 群で高い傾向にあるものの有意差はなかった。次に、HOMA-IR (インスリン抵抗性指数: 早朝空腹時の血中インスリン値と空腹時

血糖値から算出され、インスリン抵抗性の簡便な指標として临床上よく使用される)を用いて、HOMA-IR と動脈硬化関連物質の相関解析を行った。その結果、血漿中と糞便中の代謝物 A、糞便中代謝物 B が HOMA-IR と有意な相関を示す事がわかった (図 2)。

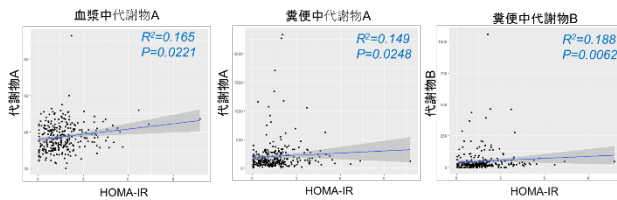


図 2. 血漿中と糞便中の代謝物 A、糞便中代謝物 B と HOMA-IR との相関プロット (代謝物 A、及び、B は動脈硬化に関連する報告がある代謝物)

3. 考察及び今後の展望

糞便中の腸内細菌叢解析の結果から、門レベルでは肥満者で *Bacteroidetes* が減少し、*Actinobacteria* が増加していた。属レベルでは *Collinsella* 属が肥満者と IGT で有意に増加していた。肥満者で *Bacteroidetes* 門の細菌が減少することは過去の報告と一致していた。*Actinobacteria* や *Collinsella* 属の変化についてはあまり報告がないため、日本人特有の腸内細菌叢の変化を示していると考えられる。

血漿メタボロームの結果からは、IGT 群ではアミノ酸の増加や糖類の増加が見られ、血中アミノ酸の増加は 2 型糖尿病のヒトで増加しているという過去の報告[9]と一致していた。また、肥満者と IGT の血漿で短鎖脂肪酸が減少していた。短鎖脂肪酸はインスリン感受性や代謝機能を上げる報告があるため、そのような有用な代謝産物が減少していることが、肥満や糖尿病の発症や悪化に関与している可能性がある。糞便メタボローム解析の結果からは、血漿の結果と比較し、グループ間に違いはあまりみられず、血漿中とは異なる代謝物の変動をしていた。腸内の低分子代謝物の多くは吸収され血中に入り、肝臓等で代謝を受けるため、糞便中で変化していた代謝物が血中においても同じ変動がみられなかったことが考えられた。

動脈硬化関連代謝物の分析からは、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR と代謝物 A、及び、B が有意な相関を示すことが分かった。これらの結果から、インスリン抵抗性の高い被験者では代謝物 A または B などの動脈硬化を誘発する代謝物が増加し、動脈硬化のリスクが高いことが示唆された。これ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考えられた。今後はメタゲノム解析の結果を統合し、代謝物産生に関わる腸内細菌群を特定する。また、簡易型自記式食事歴法質問票(BDHQ)を用いた食事調査の結果と比較し、食事と動脈硬化関連代謝物の比較も行っていく予定である。

【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. R. Liu et al., Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nat Med* 23, 859-868 (2017)

業 績

【原著論文】

1. Zhu Y, Cui G, Miyauchi E, Nakanishi Y, Mukohira H, Shimba A, Abe S, Tani-Ichi S, Hara T, Nakase H, Chiba T, Sehara-Fujisawa A, Seno H, **Ohno H**, Ikuta K. Intestinal epithelial cell-derived IL-15 determines local maintenance and maturation of intra-epithelial lymphocytes in the intestine. *Int Immunol*. 32(5):307-319 (2020)
2. Beck K, **Ohno H**, Satoh-Takayama N. Innate Lymphoid Cells: Important Regulators of Host-Bacteria Interaction for Border Defense. *Microorganisms*. 8(9):E1342, (2020)
3. **Ohno H**, Satoh-Takayama N. Stomach microbiota, *Helicobacter pylori*, and group 2 innate lymphoid cells. *Exp Mol Med*. doi: 52(9):1377-1382 (2020).
4. **Ohno H**. The impact of metabolites derived from the gut microbiota on immune regulation and diseases. *Int Immunol*. 32(10):629-636 (2020)
5. Satoh-Takayama N, **Ohno H**. Unraveling the Heterogeneity and Specialization of ILCs. *Immunity*. 53(4):699-701 (2020)
6. Akama Y, Park EJ, Satoh-Takayama N, Gaowa A, Ito A, Kawamoto E, Darkwah S, Appiah MG, Myint PK, **Ohno H**, Imai H, Shimaoka M. Sepsis Induces Deregulation of IL-13 Production and PD-1 Expression in Lung Group 2 Innate Lymphoid Cells. *Shock*. 2020 Aug 20. doi: 10.1097/SHK.0000000000001647. Online ahead of print.

【総説】

1. 宮内栄治、**大野博司**、二種類の腸内細菌が相乗的に中枢神経系炎症を促進する、*実験医学* Vol.39 No.3, 2021
2. **中西裕美子**、**大野博司**、腸内細菌分野へのメタボロミクスの応用、*実験医学別冊 メタボロミクス実践ガイド*、2021

【招待講演】

1. **窪田哲也**、窪田直人、門脇孝 肥満における M2 マクロファージ活性化障害機構 第 41 回日本肥満学会 2021.03 富山

【口頭発表】

1. Takeuchi T., **Nakanishi Y.**, Mizuno Y., Yamamichi N., Suda W., Hattori M., Kubota N., **Kubota T.**, **Ohno H.** Gut Microbial Fermentation of Polysaccharides Impacts Insulin Resistance in Humans. American Diabetes Association 80th Scientific Meeting. 2020, 6, Online meeting
2. 對田尚、宮内栄治、内山幹、小井戸薫雄、荒川廣志、大草敏史、**大野博司**、喫煙は炎症性腸疾患患者において口腔内細菌の腸管定着を促進し免疫応答を誘導する、第 6 回 Gut Microbiota 研究会 2020, 9、京都
3. **Nakanishi Y.**, **Ohno H.** Omics analysis revealed aging-related alterations in the intestinal environment. *MBSJ2020*. 2020, 11, Online meeting

【記者発表・取材】

1. **大野博司**、「腸内細菌が中枢神経系炎症を促進する仕組みを解明—多発性硬化症の予防・治療に新たな可能性—」2020.8.27

【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】

本プロジェクトの目的は、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である。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、代謝疾患やアレルギー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や種類につい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、もしくはその培養法につい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唆されてきたが、それらがどのような腸内細菌により産生されているかなど不明な点が多い。

腸内細菌叢をはじめとする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。これらの腸内細菌を培養するために、グローブボックスなどの嫌気環境を構築する装置や、これらを用いた嫌気培養による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基盤技術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・培養することで、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開発が必要となる。そこで、本研究では、(1) 難培養性腸内細菌の新規培養法の確立、(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つの研究課題に取り組んだ。これらの課題に取り組むことで、腸内環境を適切に制御するための基盤技術を確立し、将来的には腸内環境の乱れが素因となるような疾患の新たな予防法や治療法開発への貢献が期待できる。

1. 2020年度の研究目的

プロジェクト最終年度となる2020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主に二つの方法がある。一つ目は、ヒトやマウスの便に含まれる複数の腸内細菌を寒天培地プレートで培養し、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、培養する方法である。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 と記載する）内の微生物材料開発室に保管・登録されており、入手できる(URL: <http://jcm.brc.riken.jp/ja/>)。プロジェクト計画段階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、健康や疾患に関与することが想定される細菌種の基準株を理研 BRC より購入した。入手した腸内細菌基準株は、次項以降に示す研究にて使用するため、嫌気チャンパー内にて安定的かつ容易に培養する方法を模索した。

(2) ヒトもしくはマウス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、腸内細菌叢の中でその割合が低く、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る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である。加えて、われわれの体内には食物由来の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な課題となっている。これらのことを踏まえ、新たな培地作製や新規培養装置を使用した難培養性腸内細菌の培養法の検討を行なった。開発した培地や培養法の検証をするために、健康人の便試料から腸内細菌の単離・培養を試みた。

(3) 標的腸内細菌を単離するためのツール開発

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に代表される宿主の健康維持や免疫系の亢進に作用する有用菌が存在する。その一方、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も存在する。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に播種し、コロニーを形成させ単離する方法がある。選択培地や培地に特定の物質を添加することで、ある程度の選択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、標的腸内細菌を効率よく単離するためのツールの開発を実施した。

2. 2020 度の研究成果

2020 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からの報告書に記載しているため、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法の確立

プロジェクト計画段階およびプロジェクト中に蓄積したヒトおよびマウスの腸内細菌叢の解析データから独自に腸内細菌株のリストを作成し、理研 BRC から入手可能な腸内細菌基準株を取得した。はじめに嫌気性細菌の一般的な培養に広く用いられている GAM プイオン培地（以下 GAM）を用いて寒天培地および液体培地を作製し、腸内細菌基準株の培養を実施した。本年度入手した 2 種類の腸内細菌基準株は GAM により安定培養することができた。

しかしながら、昨年度までに安定培養法が構築できなかった 6 種類の腸内細菌基準株については、本プロジェクトで培ってきた嫌気培養法を用いても安定培養することはできなかった。表 1 はこれまでに本プロジェクトで安定培養法を検証した腸内細菌基準株の数および安定培養の可否をまとめたものである。

	基準株 入手数	培養 成功率	要培養条件 検討
グラム陽性菌	48	46	2
グラム陰性菌	17	13	4

表 1 安定培養法を構築した腸内細菌基準株の数

(2) ヒトもしくはマウス便由来の腸内細菌の単離・培養

これまで蓄積してきた嫌気培養法のノウハウを用いて、ヒト便試料からの腸内細菌の単離・培養を試みた。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、残った腸内細菌叢懸濁液を様々な非選択培地/選択培地に播種し、嫌気チャンパー内にてコロニーを形成させた(図 1)。プレートに形成されたコロニー群からシングルコロニーを釣菌し、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。

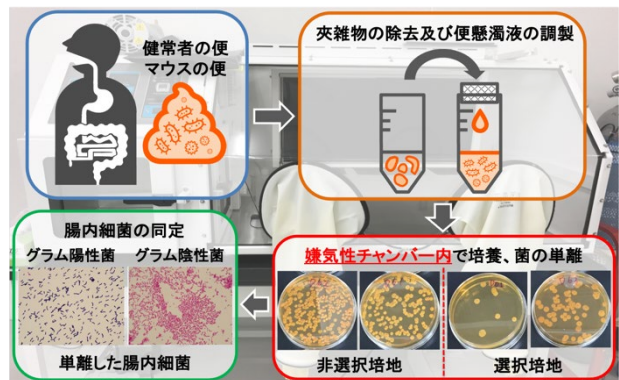


図 1 ヒトもしくはマウス由来便試料からの腸内細菌の単離・培養の流れ

本年度はヒト便試料より 3 種類のグラム陰性菌の単離・培養に成功した。またマウスの便試料を選択培地に播種し、グラム陽性菌を 1 種類単離した。表 2 は本プロジェクト期間中にヒトもしくはマウスの便試料より単離した腸内細菌の数を示したものである。

	グラム陽性菌	グラム陰性菌
単離数	3 種 (7 菌株)	9 種 (15 菌株)

表 2 単離したヒトもしくはマウス便由来のグラム陽性菌とグラム陰性菌の数

難培養性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双方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返している一方で、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物質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物質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(図 2)。昨年度までに、本培養装置を用い、難培養性

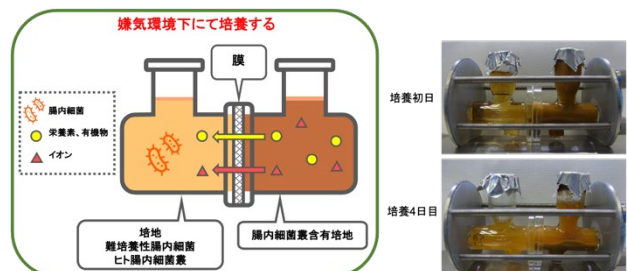


図 2 本プロジェクトで使用した二槽式透析培養法(左図)およびヒト由来腸内細菌叢を培養した培養初日と培養 4 日目の装置の様子(右図)

腸内細菌基準株の培養に成功している。そこで本年度は、ヒト由来腸内細菌叢の培養を試みた。その結果、単独培地を用いた培養法では増やすことが出来ない、もしくは単独培養よりも効率よく増える菌を複数見出すことができた。

(3) 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を添加した培地による培養を経る必要がある。そこで、より効率良く標的細菌のみを単離・濃縮する方法を検討するツールとして抗体に着目した。抗体は抗体産生細胞が産生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。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、その特異性は低く分類学的に類似の腸内細菌も認識してしまうという課題があった。このような課題を解決するために本プロジェクト独自の抗体作製法を用い、腸内細菌に対する抗体の作製を試みた。本手法により昨年度、グラム陽性細菌に対する特異性の高い抗体の作製に成功した。そこで本年度はグラム陰性細菌に対する抗体の作製を行った。様々な腸内細菌との交差反応を検証し、標的となるグラム陰性細菌特異的な結合がありながら、同種異株の腸内細菌には結合を示さない抗体を作出することができた。また作製した抗体を用い、標的細菌を含む複数の腸内細菌基準株を混合した腸内細菌混合液から効率よく標的細菌を単離・濃縮することができた(図3)。

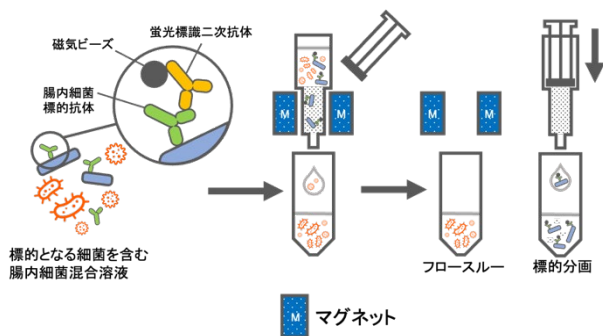


図3 Magnetic-activated cell sorting と作製した腸内細菌特異的抗体を用いた、腸内細菌混合液からの標的細菌分離の概念図

3. 研究体制

本プロジェクトでは、研究を円滑に進めるために様々な研究機関との共同研究を実施してきた。共同研究先との綿密な連携はプロジェクトを推進する上で重要な項目となる。本プロジェクトではオンラインを活用し、常時研究室同士を繋ぐ環境を構築していた。そのため、COVID-19 による制限下においても、共同研究先とも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することができた。

4. 総括

本プロジェクトでは、腸内環境制御基盤技術の構築のための礎となる腸内細菌に関する新たな知見の取得、制御技術・ツールの開発を4年間実施してきた。特に個々の腸内細菌の特性を理解するため、一つでも多くの腸内細菌を単離・培養するための手法の開発に注力した。さらに既存の腸内細菌培養法を基にした新たな腸内細菌用培地などの開発により、59種類の腸内細菌基準株の安定的培養法を確立し、嫌気チャンパー並びに様々な種類の選択培地や、市販の培地をベースとして独自に栄養素などを追加した培地であるmYCFAを組み合わせることによりヒトまたはマウス由来腸内細菌を12種類単離することができた。また、新規難培養性腸内細菌の培養法の検討を行い、二槽式透析培養法を用いた独自の培養法にてヒト腸内細菌叢を培養することで、これまで見出せなかった難培養性腸内細菌を増やすことに成功した。安定的な培養法を確立した腸内細菌については、腸内細菌単独定着マウスの構築や、腸内細菌の投与実験により、腸管常在細菌についての新たな知見を得ることができた。本プロジェクトでは数多くの腸内細菌基準株やヒト由来腸内細菌の単離・培養に成功したが、腸内細菌の特性や宿主に及ぼす影響の解析は動物試験を伴うため時間を要する。今後も、引き続き共同研究先と連携しつつ、重要性が高いと考えられる腸内細菌の腸内細菌単独定着マウスを構築し、代謝物質の網羅的解析、腸管上皮細胞や免疫細胞の変化を検討することで、腸内細菌の特性を理解し、腸内環境制御基盤技術開発のための知見を深める。

腸内環境制御基盤技術構築に向けたツールの一つとして、腸内細菌特異的抗体の作製に着手し、独自に見出した作製法を利用することで、標的細菌に対して高い特異性を有する抗体の作製に成功した。本抗体は、数種類の腸内細菌を混合した腸内細菌混合液から標的細菌を濃縮することが可能である。次の課題としては、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だが、本抗体を活用することで、標的細菌を効率良く単離・濃縮するための技術開発に繋がることが期待される。本プロジェクトを通じて作製した抗体は、これまで作製されてきた既報・販売されている細菌に対する抗体とは異なり、標的細菌に対する特異性が高い。そのため、本プロジェクトで使用した新規抗体作製法は標的細菌に特異性の高い抗体を作出する上で優れた方法であり、今後は、これまでに蓄積した腸内細菌の基礎データの中から、機能性食品開発への応用や創薬の標的として活用することができる腸内細菌に対する抗体の作製を進め、腸内環境制御基盤技術開発ツールとして活用する。

今後は、プロジェクト実施中に蓄積したデータやツールを活用することで、腸内環境制御を目指した有用菌を用いたサプリメントや機能性食品の開発、病原性細菌や疾患に対する予防・治療薬の開発など、医療やヘルスケア産業への応用を実施する。最終的には腸内環境を「意のままに」制御するための基盤技術を構築し、健康寿命の延伸を目指す。

腸内環境制御基盤技術の開発に向けた 難培養性腸内細菌培養法の確立

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返したり、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

宿主と共存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と課題

これまでの研究から各個人の腸内細菌叢の構成、種類および経時的変化が明らかとなってきた。また、項目 1.1 で述べ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いるのみならず、疾患とも深く関わることが明らかになってきた。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などの腸内細菌由来によるものであるかについては、不明な点が多い。また、これらについての研究報告数が少ない一番の理由は、腸内細菌の培養法が十分に確立されていないことが挙げられる。腸内細菌の多くが偏性嫌気性細菌に分類されており、わずかな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存在し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の作製や腸内細菌の投与が生体に与える影響の評価

個々の腸内細菌についての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 標的腸内細菌特異的抗体の作製

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 2 種類を入手した。これらの腸内細菌基準株に加え、昨年度までに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 8 種類の腸内細菌基準株の

安定培養法の確立を試みた。

嫌気性菌の培養に一般的に用いられている GAM ブイヨン培地 (GAM、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本年度入手した腸内細菌基準株の培養を行った。その結果、2 種類の腸内細菌基準株については、GAM を用いた嫌気培養により安定培養することができた(図 1)。残り 6 種についてはこれまでに本プロジェクトにて確立した様々な嫌気培養法もしくは培地を用い、安定培養する方法を検討したが、培養することができなかった。

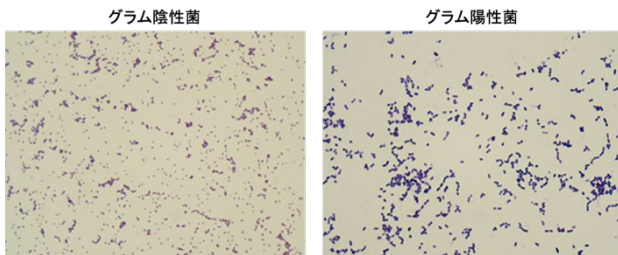


図 1 安定培養法を確立した腸内細菌基準株のグラム染色

2. 2 ヒトもしくはマウス由来腸内細菌の単離・培養

昨年度に引き続き、ヒト便試料からの腸内細菌の単離を試みた。これまでに蓄積したノウハウを用い、複数の培地を選択することにより、腸内環境制御基盤技術への応用が期待される腸内細菌の単離培養を行なった。

はじめに径の異なるフィルターを組み合わせ、そこにヒト便懸濁液を通すことで夾雑物を除いたヒト腸内細菌叢溶液を調製した。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を添加した本グループ独自の改良型 YCFA 培地 (mYCFA) を用いてヒト腸内細菌叢溶液を嫌気環境下において一晚培養した。前培養した培養液を様々な選択培地プレートに播種し、嫌気環境下でコロニー形成させた。24-72 時間後に形成されたコロニー群からシングルコロニーを分取し、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 用ユニバーサルプライマーで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、3 種類のグラム陰性菌の単離・培養に成功した (図 2)。またマウスの便試料を選択培地に播種し、グラム陽性菌を 1 種類単離した (図 2)。

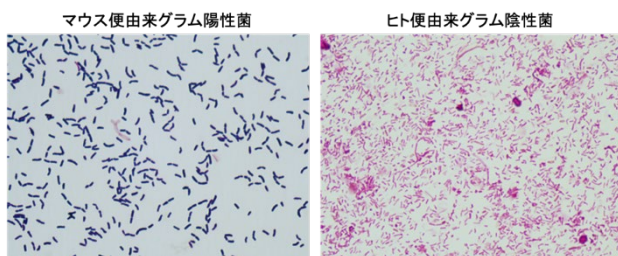


図 2 便試料より単離した腸内細菌のグラム染色

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使用される、二槽式透析培養器をベースとした新規腸内細菌培養法の確立を行なってきた。これまで、構築した二槽式透析培養法を使用することで、難培養性腸内細菌基準株の培養に成功している。そこで本年度は、ヒト由来腸内細菌を継時的に培養し、市販培地のみで培養した場合と二槽式透析培養法を比較して有用性を検討した。

フィルターを用いてヒト便に含まれている未消化物を除去し、ヒト腸内細菌叢を調製し、二槽式透析培養器の一方に添加した。供給側培地に mYCFA もしくは腸内細菌含有培地を加えた。嫌気環境下にて培養を行い、経時的にヒト腸内細菌叢培養液を回収した。比較解析用のために GAM、mYCFA にそれぞれヒト腸内細菌叢を加えたもの (以下、単独培地培養法と表記する) を同様に培養し、継時的に培養液を回収した。各時点における培養液から DNA を抽出、16S-rRNA 遺伝子アンプリコンを網羅的に解析し、二槽式透析培養法と単独培地培養法との比較解析を実施した。その結果、培養前のヒト腸内細菌叢に一番近い種類の腸内細菌を培養するのに適した培養法は、mYCFA を用いた単独培地培養法であることが明らかとなった (図 3)。

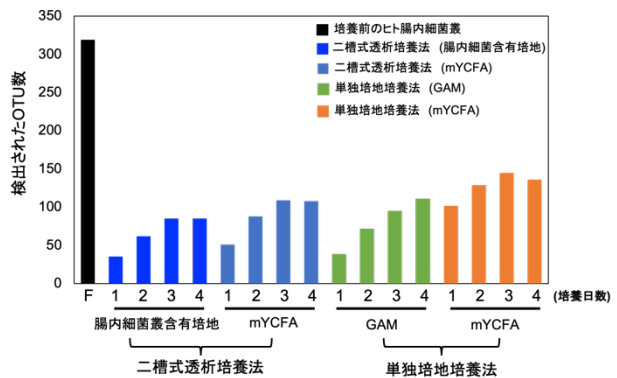


図 3 二槽式透析培養法と単独培地培養法によるヒト腸内細菌叢の Operational taxonomic unit (OTU) の比較。F は培養前のヒト腸内細菌叢を示す

検出された細菌組成をより詳細に解析したところ、二槽式透析培養法では検出される腸内細菌の種類は減少するものの、単独培地培養法では増やせない菌を複数見出した。これらの菌は供給培地側に mYCFA を用いた場合よりも腸内細菌含有培地を用いるの方がより効率よく増加することを見出した (図 4)。

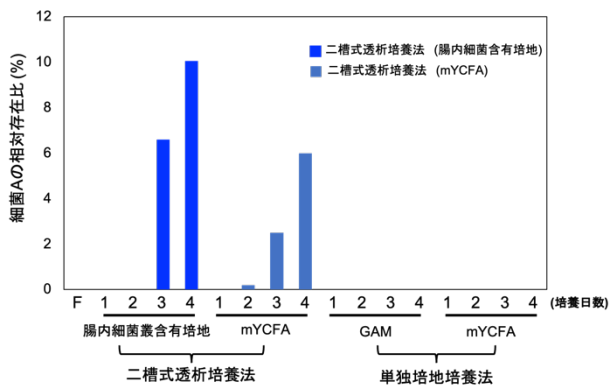


図 4 二槽式透析培養法を用いることで、効率よく増やすことができる細菌の一例

3. 考察及び今後の展望

プロジェクト期間中に 59 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 6 種類の腸内細菌基準株については増殖に必要な因子が足りていないことが予想された。これらの腸内細菌基準株については、引き続き二槽式透析培養器を用いた培養もしくは増殖に必要な増殖因子の探索を続ける。本年度はこれまでに培ってきた嫌気培養法を用い、ヒト便由来のグラム陰性菌 3 種類およびマウス便由来のグラム陽性菌を 1 種類単離・培養することに成功した。これらの中には、有用な作用をもたらす細菌や疾患に関与する可能性のある細菌も含まれているため、引き続き単離できた細菌の詳細な機能解析を実施する。腸内細菌が生体に与える影響の評価では、これまでに、グラム陰性常在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を見出した。炎症を引き起こす因子やメカニズムの一旦は明らかとなってきたが、腸管内に存在しているグラム陰性常在細菌がどのような働きを担っているのかについては明らかになっていないことが多い。今後は、より詳細にノトバイオートマウスを調べることによりグラム陰性常在細菌が生体にどのような影響を及ぼすのか検討する。

本プロジェクトでは数多くの腸内細菌基準株やヒト由来腸内細菌の単離・培養に成功した。今後は、これらの腸内細菌の機能や宿主に対してどのような影響を与えるのか検討することが重要となる。今後も共同研究先と連携しながら、一つでも多くの腸内細菌単独定着マウスを構築し、代謝物質の網羅的解析、腸管上皮細胞や免疫細胞の変化を検討することで腸内細菌の特性を理解し、腸内環境制御基盤技術開発に繋げる。

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実子博士をはじめ多くの方々の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.* Jul;90(3):859-904. (2010).
- 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開発

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細菌も存在しており、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、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、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。注目すべきこととして、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、ヒトから分離した有用菌をヒトが摂取することで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* のみを単離・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の多くが他の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の構築に向けて、特異性の高い腸内細菌特異的抗体の取得、作製した腸内細菌特異的抗体を用いた標的細菌の分離・濃縮法の検討を行った。

2. 実験と結果

2. 1 標的腸内細菌特異的抗体の作製

昨年度、本プロジェクト独自の抗体作製方法を用いることでグラム陽性菌に対する特異性が高い抗体の作製に成功した。そこで本年度は、安定培養法を確立した細菌の中からグラム陰性菌(以下、細菌 X と表記する)に対する抗体の作製を行った。はじめに一般的に使用されている抗体の作製方法(従来法)と本プロジェクト独自の抗体作製法(新規法)を比較し、抗原感作後における血清中の細菌 X に対する抗体価の上昇を 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)。

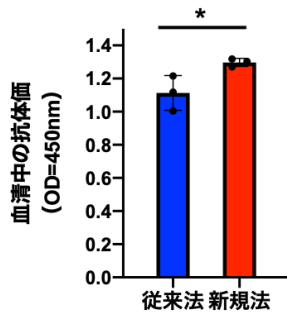


図1 最終抗原感作後の血清中の細菌 X に対する抗体価の比較、青は従来法、赤は新規法を示す。* p<0.05

2. 2 細菌 X 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25クローンのハイブリドーマの中から細菌 X 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、細菌 X に対する特異性を検証するために、細菌 X および細菌 X と同種異株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ーを用いて、各細菌と抗体との反応を検討したところ細菌 X 以外の同種異株の細菌に対して反応性を示さなかった(図2)。

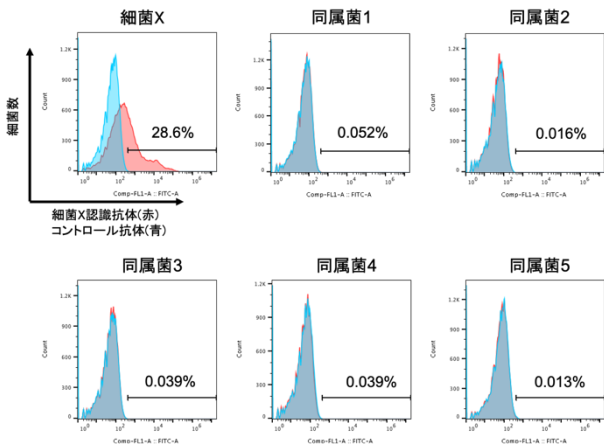


図2 フローサイトメーターによる抗体と細菌 X および同種異株への結合の検証。赤色は細菌 X に対する抗体、青はアイソタイプコントロール抗体をそれぞれ示している。

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。4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細菌に対して結合は見られなかった(図3)。これらの結果は、新規法を用いることで標的となるグラム陰性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段であることを示唆するものであった。

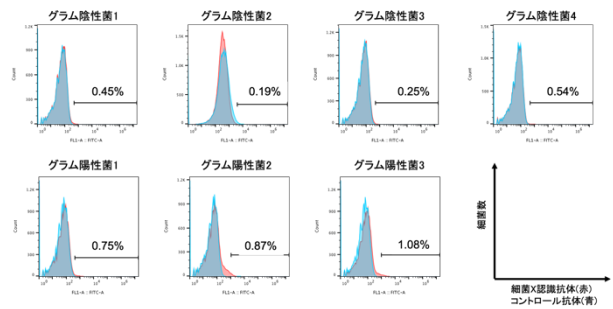


図3 フローサイトメーターによる抗体と代表的な腸内細菌への結合の検証。赤色は細菌 X に対する抗体、青はアイソタイプコントロール抗体をそれぞれ示している。

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. 抗体の結合した標的細菌の再培養は可能か
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・濃縮することができるか

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 機材は嫌気チャンバ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。MACS 工程を経たサンプルにおいてコロニー形成が確認された(図4)。これらの結果は、作製した抗体と MACS を用いることで標的細菌を生きのまま単離・濃縮することが可能であることを示すものであった。

MACS処理後



図4 MACS 処理した後の細菌 X 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

最後に細菌 X を含む 5 種類の腸内細菌を混合した、腸内細菌混合液から作製した抗体を用いた MACS により細菌 X の単離・濃縮を検討した。作製した抗体を腸内細菌混合液に反応させたのち、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ー (FACS) 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細菌 X が含まれず、標的分画において細菌 X の割合が増加していた。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、細菌 X を検出するプライマーを利用した定量 PCR を実施した。フロースルーと比較した結果、標的分画において細菌 X の濃縮が見られた。(図 5)。

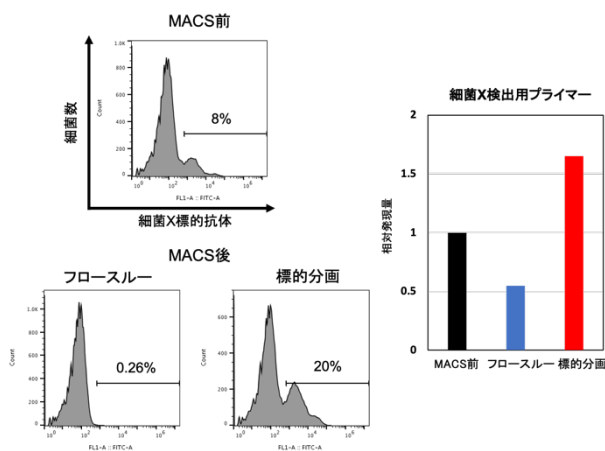


図 5 MACS 前後におけるそれぞれの試料の FACS の結果 (左)、細菌 X 検出用プライマーを用いた q-PCR (右)

3. 考察及び今後の展望

腸内環境制御基盤技術の構築に向けたツールの一つ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。作製した抗体は既存の細菌に対する抗体とは異なり特異性が高いものであった。本結果は、プロジェクト独自の新規抗体作製法が、標的細菌に特異性の高い抗体を作出するための優れた方法であることを示唆するものであった。また作製した抗体を利用して、標的細菌を含む腸内細菌混合懸濁液からの標的細菌の分離・濃縮法を構築することにも成功した。次の課題としては、作製した抗体を使用し、多種多様な腸内細菌で構成される腸内細菌叢から標的細菌の単離・濃縮の可否を検討する必要がある。今後は、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開発への応用や創薬の標的として活用することができる腸内細菌に対する抗体の作製を進める。

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、富山香代氏、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 (2017).
- 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. Wu CJ, Lu, M, Feng X, Nakato G and Udey MC. Matriptase cleaves EpCAM and TROP2 in Keratinocytes, destabilizing both proteins and associated claudins. *Cells Apr*; 9(4): 1027 (2020).
2. Seo K., Tanaka K., Fukuda S., Arakawa K. Complete Genome Sequences of Two *Cutibacterium acnes* Strains Isolated from an Orthopedic Surgical Site. *Microbiology Resource Announcements Apr*; 9(17):e00290-20 (2020).
3. Tsukimi T., Watabe T., Tanaka K., Sato P. M., Suzuki H., Tomita M., *Fukuda S. Draft Genome Sequences of *Bifidobacterium animalis* Consecutively Isolated from Healthy Japanese Individuals. *Journal of Genomics*.8: 37-42, (2020).
4. Inoue H., Shibata S., Li K., Inoue J., Fukuda S and Arakawa K. Complete Genome Sequences of *Bifidobacterium longum* strain Jih1 isolated from human feces. *Microbiology Resource Announcements May 28*; 9(22):e00319-20 (2020).
5. Toju H., S Abe M., Ishii C., Hori Y., Fujita H., Fukuda S. Scoring Species for Synthetic Community Design: Network Analyses of Functional Core Microbiomes. *Frontiers in Microbiology Jun 25*;11:1361. (2020).
6. Yang J., Yang Y., Ishii M., Nagata M., Aw W., Obana N., Tomita M., Nomura N., *Fukuda S. Does the Gut Microbiota Modulate Host Physiology through Polymicrobial Biofilms? *Microbes and Environments*;35(3). (2020).
7. Caballero-Flores G., M Pickard J., Fukuda S., Inohara N., Núñez G. An Enteric Pathogen Subverts Colonization Resistance by Evading Competition for Amino Acids in the Gut. *Cell Host & Microbe Jul 17*;S1931-3128(20)30359-0 (2020).
8. *Nakato G., Morimura S., Lu M., Feng X., Wu CJ. and Udey MC. Amelioration of congenital tufting enteropathy in EpCAM(TROP1)-deficient mice via heterotopic expression of TROP2 in intestinal epithelial cells. *Cells Aug*; 9(8): 1847, (2020).
9. Mishima E., Ichijo M., Kawabe T, Kikuchi K., Akiyama Y., Toyohara T., Suzuki T., Suzuki C., Asao A., Ishii N., Fukuda S., Abe T. Germ-Free Conditions Modulate Host Purine Metabolism, Exacerbating Adenine-Induced Kidney Damage. *Toxins Aug 26*;12(9):E547 (2020).

10. Nakamura A., Yokoyama Y., Tanaka K., Benegiamo G., Hirayama A., Zhu Q., Kitamura N., Sugizaki T., Morimoto K., Itoh H., Fukuda S., Auwerx J., Tsubota K., Watanabe M. Asperuloside Improves Obesity and Type 2 Diabetes through Modulation of Gut Microbiota and Metabolic Signaling. *iScience Sept*; 23(9):101522 (2020).
11. Tomizawa Y., Kurokawa S., Ishii D., Miyaho K., Ishii C., Sanada K., Fukuda S., Mimura M., Kishimoto T. Effects of Psychotropics on the Microbiome in Patients with Depression and Anxiety: Considerations in a Naturalistic Clinical Setting. *The International Journal of Neuropsychopharmacology Sep 25*; pyaa070 (2020).
12. Ogawa Y, Miyoshi C, Obana N, Yajima K, Hotta-Hirashima N, Ikkyu A, Kanno S, Soga T, *Fukuda S, *Yanagisawa M. Gut microbiota depletion by chronic antibiotic treatment alters the sleep/wake architecture and sleep EEG power spectra in mice. *Sci. Rep. 10*: 19554, (2020).

【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24回腸内細菌学会 2020年6月11日(誌上開催)
2. 福田真嗣
消化管内細菌叢がもたらす生体恒常性と疾患
第62回歯科基礎医学学会学術大会 2020年9月26日
(オンライン開催)
3. 福田真嗣
消化管内細菌叢がもたらす生体恒常性と疾患
第63回秋季日本歯周病学会学術大会 2020年10月16日
(オンライン開催)
4. 福田真嗣
腸内環境の制御による感染症予防・治療基盤技術の創出
第10回家畜感染症学会学術集会 2020年12月12日
(オンライン開催)

【ポスター発表】

1. Hikaru Inoue, Gaku Nakato, Masaru Tomita, Joe Inoue, Shinji Fukuda.
Development of target bacteria-isolation method using anti-bacterial species specific monoclonal antibody
第43回日本分子生物学会 2020年12月4日
(オンライン開催)

2. 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
第43回 日本分子生物学会 2020年12月4日
(オンライン開催)

3. 竹内奈穂、田中一己、アウ・ワンピン、尾花望、富田
勝、福田真嗣
希少糖摂取による腸内細菌叢の変化は抗肥満効果をもた
らす
第43回 日本分子生物学会 2020年12月4日
(オンライン開催)

【特許】

- (1) 国内特許出願 2件
- (2) 国外特許出願 1件