

研究報告2022 目次 【研究開発部】

実用化実証事業

「腸内環境デザイン」グループ

◆ 総括	132
◆ 腸内細菌の単離・培養法の確立および腸内細菌特異的抗体の実用化に向けた評価	135
◆ 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	138
◆ 業績	140

腸内環境デザイングループ

グループリーダー 福田 真嗣

【基本構想】

本プロジェクトは、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で、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向けた基盤技術の構築を目的としている。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ことで腸管内の恒常性を維持している。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消化器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、腸内細菌由来の代謝物質も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から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、構築した嫌気培養方法を用いた腸内細菌の単離および安定培養方法の確立、標的となる腸内細菌を選択的に取得するためのツール開発、およびその有用性の検証に取り組んだ。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. 2021 年度の研究目的

2021 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分離・培養するには二つの方法がある。一つ目は、ヒトやマウスの便に含まれる腸内細菌叢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等に保管・登録されており、入手可能である(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。これまでに開発した腸内細菌培地や嫌気培養法を活用することによりヒト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およびその有効性の評価

腸内細菌叢を構成する腸内細菌の中には、ビフィズス菌

や乳酸桿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（参考文献 1-3）。その一方、病原性大腸菌などの消化器関連疾患や代謝疾患やアレルギー疾患に関与する腸内細菌などが存在することも報告されている（参考文献 2-4）。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・培養するには、便試料懸濁液を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採用されることが多い。選択培地や培地に特定の物質を添加することにより、ある程度の選択は可能であるが、標的細菌のみを単離する効率は低いことが課題となっている。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、その有効性を評価した。

2. 2021 年度の研究成果

2021 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をリスト化し、理研 BRC より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 ブイヨン培地（以下 GAM 培地）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。GAM 培地により培養できなかったものについては本研究室で独自に調製した改良型 YCFA 培地（mYCFA）により培養することで安定的に培養可能とした。本年度は 15 種類の腸内細菌基準株の安定培養に成功した。表 1 はこれまでにグループ内にて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。

表 1：腸内細菌基準株の入手数および安定培養方法構築の可否をまとめたもの

	基準株 入手数	培養 成功数	要培養条件 検討
グラム陽性菌	52	50	2
グラム陰性菌	25	21	4

(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、嫌気チャンバ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。認められたものから 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。本年度はヒト便試料より

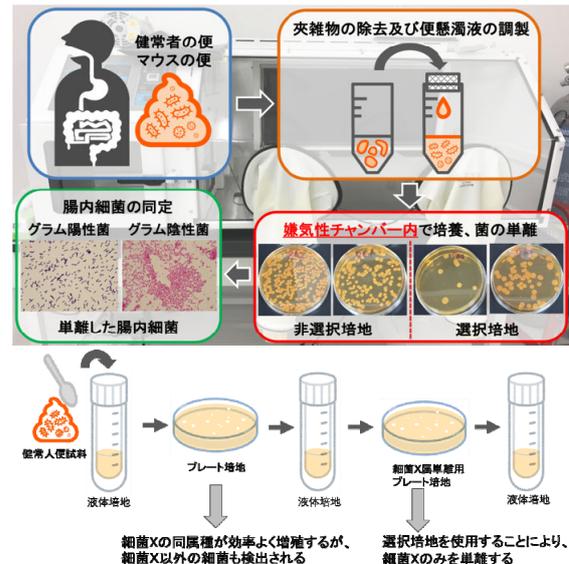


図 1：ヒトもしくはマウス由来便試料からの腸内細菌の単離・安定培養法構築の流れ、疾患関連細菌 X の単離・安定培養法の構築手順

4 種類のグラム陰性菌の単離・培養に成功した。これらに加えて、疾患関連腸内細菌 2 種類の単離・安定培養法の確立に成功した。

(3) 標的腸内細菌単離に向けたツールの開発とその応用利用法の検証

多種多様な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・培養するには、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などの課題があった。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。本年度は疾患に関連するグラム陰性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に成功した。また、標的の疾患関連グラム陰性菌属に広く交差性を示す抗体も同時に取得できた。

次に、これまでに作製した腸内細菌特異的抗体についても有用性の検討を実施した。昨年度までに標的細菌を含む腸内細菌混合液から図 2 に示す Magnetic-activated cell sorting 法の一つである MojoSort により標的細菌の濃縮に成功していた。本年度はより複雑な環境から標的細菌の分離を試みるため、ヒト便試料から夾雑物を除いた溶液に標的細菌を添加し、MojoSort を用いることで標的細菌を濃縮可能かどうかの検討を実施した。その結果、腸内細菌混合

液よりは効率が落ちるものの、標的分画に細菌を濃縮できた。

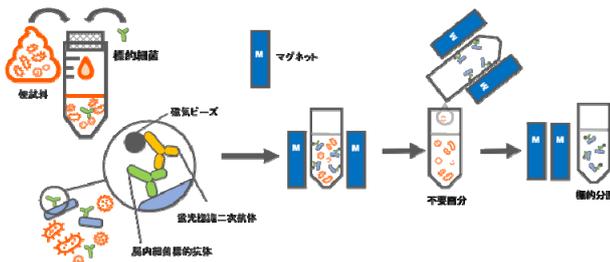


図2: MojoSortと作製した腸内細菌特異的抗体を用いた、便懸濁溶液からの標的細菌分離の概念図

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、研究室同士を繋ぐ環境を構築していた。昨年度から続く COVID-19 による制限下においても、共同研究先と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し、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前身となる腸内細菌叢プロジェクトから引き続き、腸内環境制御基盤技術の構築へ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・ツールの開発を実施している。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、その方法を活用することで腸内細菌の単離・安定培養法の確立を進めている。本年度は新たに14種類の腸内細菌基準株の安定培養に成功し、累計で71種類の腸内細菌基準株の安定的培養法を確立した。嫌気チャンバ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を組み合わせるにより本年度はヒト腸内細菌を6種類単離することができた。安定的な培養法を確立した腸内細菌の中で有用性が示唆されるものについては、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検討を進める。一方で、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、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・濃縮法についても有効であることが示された。本結果は腸内細菌標的抗体を活用することで、標的となる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引き続き進め、腸内環境制御基盤技術開発ツールとして活用する。

将来的には、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。

【参考文献】

1. Zheng, D., Liwinski, T., Elinav, E. *Cell Res.* Jun;30(6):492-506. (2020)
2. Sanders, ME., Merenstein, DJ., Gibson, GR., *Nat Rev Gastroenterol.* Oct; 16(10):605-616, (2019).
3. Fan, Y., Pedersen, O. *Nat Rev Microbiol.* Jan;19(1):55-71, (2021).
4. Chen, Y., Zhou, J., Wang, L. *Front cell Infect Microbiol.* Mar 17;11:625913 (2021).

腸内細菌の単離・培養法の確立および腸内細菌特異的抗体の 実用化に向けた評価

「腸内環境デザイン」グループ
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) 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、その際に代謝物質である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病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。

(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、各種疾患とも深く関わる事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。これらについての研究報告数が少ない一番の要因は、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法の開発が進んでいるものの、依然として単離・培養が困難な腸内細菌が数多く存在している。

(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、以下に示す課題に取り組む必要がある。

1. 腸内細菌の安定的培養方法の確立
2. ヒトやマウスからの腸内細菌の単離
3. 単独腸内細菌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
4. 構築した腸内細菌研究ツールの評価

個々の腸内細菌についての基礎データやその培養方法のノウハウの蓄積は、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のみならず基礎研究の発展にも大きな役割を果たすことが考えられる。

2. 実験と結果

本年度は腸内細菌基準株の安定培養法の構築、ヒト便試料からの腸内細菌の単離および培養方法の確立、本プロジェクトにて作製した腸内細菌特異的抗体の実用化に向けた応用利用法の検討の 3 つの項目に取り組んだ。

(1) 腸内細菌基準株の安定培養方法の構築

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 14 種類を新たに入手し安定培養法の検討を行った。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、日本製薬株式会社) もしくは本プロジェクト独自に改良を加えた改良型 YCFA 培地の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本年度入手した 5 種類のグラム陽性菌および 9 種類のグラム陰性菌の培養を行った。その結果、全ての腸内細菌基準株については、GAM および mYCFA を使用し、嫌気環境下にて培養することで安定培養にできることを見出した(図 1)。

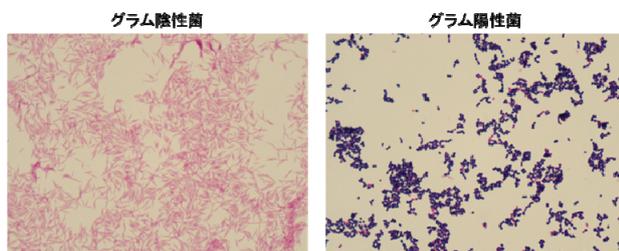


図 1:安定培養法を確立した腸内細菌基準株グラム染色像

(2) ヒト由来腸内細菌の単離・培養法の確立

これまでに引き続き、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嫌気培養技術と選択培地を組み合わせることで、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を実施した。

径の異なるフィルターを複数種類組み合わせ、そこに健康人由来の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 16 時間培養した。前培養した培養液を様々な選択培地プレートに接種し、嫌気環境下でコロニーを形成させた。24-72 時間後に形成されたコロニー群から単コロニーを釣菌し、液体培地内にて培養を継続した。その中から増殖が認められたものは 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で遺伝子増幅した後にシークエンス解析を実施し、菌種の同定を行った。その結果、本年度は 4 種類のグラム陽性菌の単離・培養に成功した (図 2)。

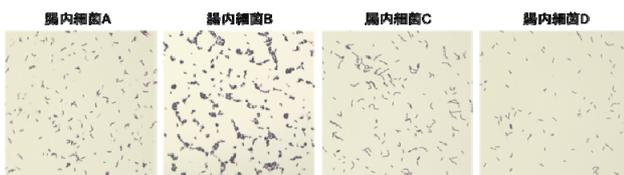


図 2:本年度ヒト便試料より単離した腸内細菌のグラム染色画像

(3) 腸内細菌特異的抗体の有用性の検討

本プロジェクトにおいてこれまで腸内細菌特異的抗体を作製し、標的細菌を含む腸内細菌混合液から標的の腸内細菌を分離濃縮する方法を確立していた。しかしながら、カラムへの標的細菌以外の吸着が起り、標的分画を調製する際にこれらの細菌が混入する課題があった。そこで本年度は類似した方法ではあるがカラムを使用しない MojoSort を使用することでより純度を上げられるかどうか検討を行った。MojoSort 後の各分画から DNA を抽出し、標的腸内細菌数を定量 PCR により検討した。その結果、抗体を含まない NA およびコントロール抗体の IgG では不要分画 (Flow) にて標的細菌が検出されたが標的分画(Elu)ではほとんど細菌は検出されなかった(図 3)。一方で、作製した標的腸内細菌特異的抗体を用いると Flow でもわずかに検出されたが、標的分画においてほぼ全ての標的細菌が検出された、MojoSort により腸内細菌混合液から標的細菌の単離・濃縮の効率を上げることが明らかとなった(図 3)。

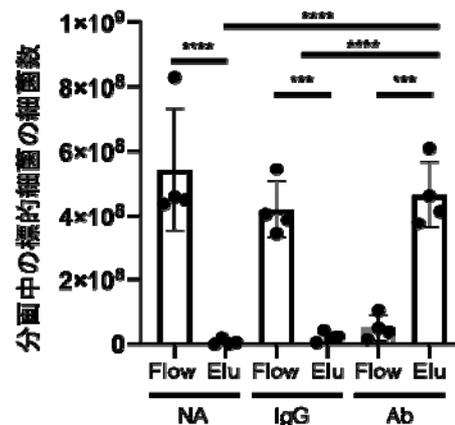


図 3: 標的細菌を添加した腸内細菌混合液からの標的細菌の分離 NA は磁気ビーズのみ、IgG はコントロール、Ab は腸内細菌特異的抗体を示す。 ***p<0.001, ****p<0.0001

そこで次に標的細菌を含むヒト腸内細菌叢混合液から同手法を用いて、標的となる腸内細菌の単離・濃縮を検討した。分画したそれぞれのサンプルより DNA を抽出し、次世代シークエンスにより各分画中に含まれる腸内細菌の割合を検討した。NA および IgG では標的分画 (Elu) とフロースルー(Flow)において腸内細菌は同程度の割合で存在していた。一方で、腸内細菌特異的抗体 (Ab) を使用すると標的分画において標的細菌を濃縮することに成功した (図 4)。

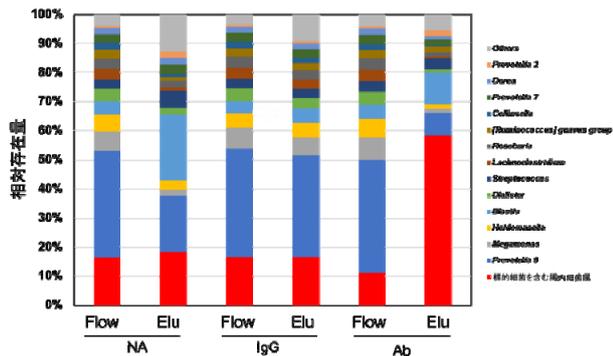


図4：標的細菌を添加したヒト腸内細菌叢混合液からの標的細菌の分離

NAは磁気ビーズのみ、IgGはコントロール抗体、Abは腸内細菌特異的抗体をそれぞれ示す。

3. 考察及び今後の展望

本年度新たに14種類の腸内細菌基準株の安定培養に成功し、累計71種類の腸内細菌基準株の安定的培養法を確立した。一方で、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、培地の改良や二槽式透析培養器を用いた培養を続けることで安定培養法の構築をめざす。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4種類の腸内細菌を単離・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。

これらに加え、作製した腸内細菌特異的抗体を用いた標的細菌の分離・濃縮法の改良、より複雑な環境からの標的細菌の分離を検討した。腸内細菌特異的抗体を用いることで標的細菌を含む腸内細菌混合液からは高純度の標的細菌の分離に成功した。一方で、標的腸内細菌を含むヒト腸内細菌叢からの分離においては、標的分画において濃縮は見られたものの、標的以外の腸内細菌も含まれていた。今後は抗体と標的腸内細菌の非特異的な反応を抑える手法を検討し、精度を上げることに取り組む。

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する。またこれらの情報と作製している腸内細菌特異的抗体をうまく活用することで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。

本研究は、文部科学省地域イノベーション・エコシステム形成プログラム、神奈川県委託事業先進異分野融合プロジェクト研究立案・推進事業により実施しました。

【参考文献】

- Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J.Z., Abe, F., Osawa, R., *BMC Microbiol.* 25:16:90, (2016).
- 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. *Nat. Commun.* 4: 1654, (2013).
- †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. *Nature* 504: 446-450, (2013).
- 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. *Nature* 500: 232-236, (2013).
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C., Finlay, B.B. *Physiol Rev.* Jul;90(3):859-904. (2010).
- 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. *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

「腸内環境デザイン」グループ
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) 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。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人が摂取することで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、臨床的面においては、潰瘍性大腸炎やクローン病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「便微生物叢移植療法」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。そこで腸内環境を整え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のではないかと考えた。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分離するツールの開発が重要となってくる。

(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つ。細菌も抗原としての性質を有しており、実際に特定の細菌を認識す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。

(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、治療もしくは診断への有効な手段となる可能性がある。これまで本プロジェクトにおいて、独自の抗体作製方法を構築し、複数の腸内細菌に対して特異性の高い抗体の作製に成功している。本年度は疾病の新規診断法開発に向け、疾患に関連する腸内細菌に対する抗体の取得を試みた。

2. 実験と結果

(1) 標的腸内細菌特異的抗体の作製

これまでに構築した独自の抗体作製方法を用いることでグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対する特異性が高い抗体作製に成功している。そこで本年度は、安定培養法を確立した腸内細菌の中から特定の疾病時に増加が認められる細菌(以下、細菌 X と表記する)を標的とした特異的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)を比較した。抗原感作後における血清中に含まれる細菌 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、新規法では有意な差は認められなかったが高い傾向を示した。(図 1)。

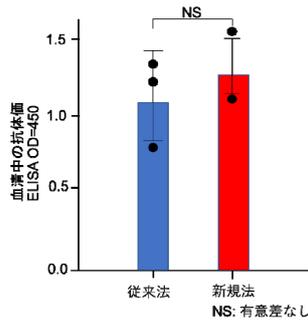


図1：最終抗原感作後の血清中の細菌 X に対する抗体価の比較、青は従来法、赤は新規法を示す。

(2) 細菌 X に対する特異的な抗体の選抜

血清中の細菌 X に対する抗体価の上昇が認めら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。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 および同属種の腸内細菌に対する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、各細菌との反応を検討したところ多くのハイブリドーマクローンは図 2A に示すように細菌 X に特異的な反応性を同種異株の細菌に対して反応性を示さなかった。一方で、ハイブリドーマの中には細菌 X のみならず同属菌にも幅広く交差反応を示すものも含まれていた（図 2B）。

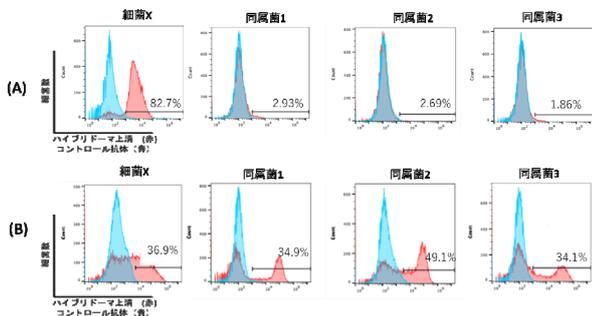


図2：フローサイトメーターによる抗体と細菌 X および同属菌への結合の検証。赤色は細菌 X に対する抗体、青はアインタイプコントロール抗体をそれぞれ示している。

(3) ヒト便試料からの細菌 X 単離の検討

項目 2.(2)で作製した抗体の交差反応性の検討や、他の X 属細菌に対する抗体作製に向け、ヒト便試料より X 属細菌の単離を試みた。嫌気チャンパー内において本研究室独自に調製した腸内細菌培養培地と細菌 X 属単離用のプレートを組み合わせることで、2 種類の X 属細菌の単離に成功した（図 3）。

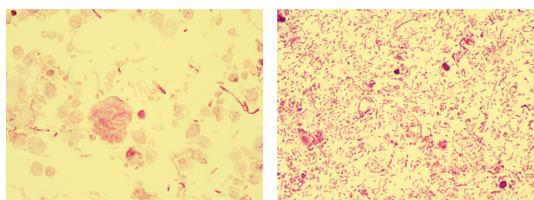


図3：ヒト便試料より単離した X 属細菌のグラム染色像

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。X 属細菌は一つの種類の腸内細菌のみならず、同属に含まれる細菌も同様に疾病への寄与が示唆されている。次の課題としては、細菌 X に特異的抗体のみならず X 属細菌を広く認識する抗体の作製も行い、用途に応じた使い分けをできるようにする。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についても引き続き進めていく。

4. 謝辞

本実験の遂行にあたり、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、何裕遙氏、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。

本研究は、文部科学省地域イノベーション・エコシステム形成プログラム、神奈川県委託事業先進異分野融合プロジェクト研究立案・推進事業により実施しました。

【参考文献】

- 1 Kim, S., Suda, W., Kim, S., Oshima, K., Fukuda, S., Ohno, H., Morita, H., Hattori, M., *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. 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. *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. *Lancet.* Mar 25;389(10075):1218-1228 (2017).

業 績

【原著論文】

1. Ishihara S, Sato T, Fujikado N, Miyazaki H, Yoshimoto T, Yamamoto H, Fukuda S, Katagiri K. Rap1 prevents colitogenic Th17 cell expansion and facilitates Treg cell differentiation and distal TCR signaling. *Commun. Biol.* 5: 206, 2022
2. Jangid A, Fukuda S, Kato T, Seki M, Suzuki Y, Taylor TD, Ohno H, Prakash T. Impact of dietary fructooligosaccharides (FOS) on murine gut microbiota and intestinal IgA secretion. *3Biotech* 12: 56, 2022
3. Maruyama Y, Nishimoto Y, Umezawa K, Kawamata R, Ichiba Y, Tsutsumi K, Kimura M, Murakami S, Kakizawa Y, Kumagai T, Yamada T, *Fukuda S. Comparison of oral metabolome profiles of stimulated saliva, unstimulated saliva, and mouth-rinsed water. *Sci. Rep.* 12: 689, 2022.
4. *Furusawa C, Tanabe K, Ishii C, Kagata N, Tomita M, *Fukuda S. Decoding gut microbiota by imaging analysis of fecal samples. *iScience* 24: 103481, 2021.
5. Yang Y, Kumrungsee T, Kato N, Fukuda S, Kuroda M, Yamaguchi S. Supplemental *Aspergillus* lipase and protease preparations display powerful bifidogenic effects and modulate the gut microbiota community of rats. *Fermentation* 7: 294, 2021.
6. Connell S, Kawashima M, Nakamura S, Imada T, Yamamoto H, *Tsubota K, *Fukuda S. Lactoferrin ameliorates dry eye disease potentially through enhancement of short-chain fatty acid production by gut microbiota in mice. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 12384, 2021.
7. Yokoyama Y, Shinohara K, Kitamura N, Nakamura A, Onoue A, Tanaka K, Hirayama A, Aw W, Nakamura S, Ogawa Y, Fukuda S, Tsubota K, Watanabe M. Metabolic effects of bee larva-derived protein in mice: Assessment of an alternative protein source. *Foods* 10: 2642, 2021.
8. Ejima R, Akiyama M, Sato H, Tomioka S, Yakabe K, Kimizuka T, Seki N, Fujimura Y, Hirayama A, Fukuda S, Hase K, Kim YG. Seaweed dietary fiber sodium alginate suppresses the migration of colonic inflammatory monocytes and diet-induced metabolic syndrome via the gut microbiota. *Nutrients* 13: 2812, 2021.
9. Watanabe Y, Takeuchi N, Yang J, Obana N, Morinaga K, Kusada H, Tamaki H, Fukuda S, Arakawa K. Complete genome sequence of *Atopobiaceae* bacterium strain P1, isolated from mouse feces. *Microbiol. Resour. Announc.* 10: e0062721, 2021.
10. Suzuki K, Nakaoka S, Fukuda S, Masuya H. Energy landscape analysis elucidates the multistability of ecological communities across environmental gradients. *Ecol. Monogr.* 91: e01469, 2021.
11. Takahashi H, Yang J, Yamamoto H, Fukuda S, Arakawa K. C Complete Genome Sequence of *Adlercreutzia equolifaciens* subsp. *celatus* JCM 14811T. *Microbiol. Resour. Announc.* 10: e0050721, 2021.
12. Kurokawa S, Tomizawa Y, Miyaho K, Ishii D, Takamiya A, Ishii C, Sanada K, Fukuda S, Mimura M, Kishimoto T. Fecal Microbial and Metabolomic Change during Treatment Course for Depression: An Observational Study. *J. Psychiatr. Res.* 140: 45-52, 2021.
13. Nishimoto Y, Nomaguchi T, Mori Y, Ito M, Nakamura Y, Fujishima M, Murakami S, *Yamada T, *Fukuda S. Nutritional efficacy of *Chlorella* supplementation depends on the individual gut environment: randomized control study. *Front. Nutri.* 8: 648073, 2021.
14. Sato S, *Shimizu E, He J, Ogawa M, Asai K, Yazu H, Rusch R, Yamane M, Yang F, *Fukuda S, Kawakami Y, *Tsubota K, Ogawa Y. Positive effects of oral antibiotic administration in murine chronic graft-versus-host disease. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 3745, 2021.
15. Nakamura A, Kurihara S, Takahashi D, Ohashi W, Nakamura Y, Kimura S, Onuki M, Kume A, Sasazawa Y, Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Saiki S, Matsumoto M, Hase K. Symbiotic polyamine metabolism regulates epithelial proliferation and macrophage differentiation in the colon. *Nat. Commun.* 12: 2105, 2021.
16. 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. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 24: 97-107, 2021.

【招待講演・指定演者】

1. 福田真嗣
腸内細菌叢がもたらす宿主恒常性と疾患
第21回日本分類学会連合公開シンポジウム 2022年1月8日（オンライン開催）
2. 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73回日本生物工学会 2021年10月28日（オンライン開催）
3. 福田真嗣
腸内デザインによるがんの予防・治療
第80回日本癌学会学術総会 2021年10月2日（オンライン開催）
4. 福田真嗣
腸内環境に基づく食の層別化がもたらす未来
日本食品科学工学会第68回大会 2021年8月27日（オンライン開催）
5. 福田真嗣
マウス腸内における大腸菌共生進化機構の解明
日本進化学会第23回大会 2021年8月20日（オンライン開催）
6. 福田真嗣
ヒトマイクロバイオームがもたらす健康と疾患
第48回日本毒性学会学術年会 2021年7月9日（オンライン開催）
7. 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25回腸内細菌学会 2021年6月1日（オンライン開催）
8. 福田真嗣
腸内細菌叢由来アミノ酸代謝物質がもたらす宿主恒常性と疾患
日本アミノ酸学会第6回産官学連携シンポジウム 2021年5月31日（オンライン開催）

【口頭発表】

1. 田中一己
米ぬか摂取による大腸炎抑制効果はトリプトファン代謝物質がもたらす
第1回腸内デザイン学会年会 2021年11月18日（オンライン開催）

【ポスター発表】

1. 田中一己
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75回日本栄養・食糧学会大会 2021年7月4日（オンライン開催）

【特許】

- (1) 国内特許出願 1件