



実用化実証事業
「腸内環境デザイン」グループ
研究概要集

(令和3年度～令和6年度)

令和8年2月

(地独) 神奈川県立産業技術総合研究所

Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology

目 次

プロジェクト総括

実用化実証事業

「腸内環境デザイン」グループ

グループリーダー 福田 真嗣 1

プロジェクト参加者一覧 7

業績 11

研 究 報 告

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 25

腸内環境制御に向けた基盤技術の構築と応用可能性の探究

中藤学、大縄悟志、井上浄 31

プロジェクト総括

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】

本グループは、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、38 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（ディスバイオーシス）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、遠隔臓器や全身における様々な疾患の発症に関連することが示唆されている。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ものの、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のかなど不明な点も多い。

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、消化管内に存在する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どのような影響を与えるのか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。本グループ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、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に貢献する。

1. 研究目的

プロジェクト期間中において以下の各項目を重点項目として定めた。

項目 1-1： 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取得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、

嫌気チャンバー内にて安定的かつ容易に培養する方法を模索した。

項目 1-2： ヒトおよび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。これまでに開発した腸内細菌培養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。

また新たに腸内細菌-腸管上皮細胞株共培養試験を行った。これらの実験に加え、これまでに単離・安定培養を確立した腸内細菌の特性を見出すために、単独腸内細菌定着マウスの解析や腸内細菌定着競合試験を行った。

項目 1-3： 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、代謝疾患、アレルギー疾患に関与する腸内細菌なども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。

項目 2-1： 新型コロナウイルス抗体価社会調査プロジェクト

世界規模でパンデミックを引き起こした新型コロナウイルスは変異を重ね、オミクロン株に匹敵するウイルスが出現する可能性もある。そのためワクチンや感染により獲得した免疫機能を維持・増強することが今後の課題となる。新型コロナ感染症においては、欧米では感染者数や死亡率が高く、アジアでは低いといった地域的な違いも指摘されており、その要因として遺伝子配列の違いや BCG ワクチン接種率(参考文献 5)、食生活をはじめとした生活習慣の違いなどが挙げられている。また、新型コロナ感染症の重症度や後遺症と腸内細菌叢との関連も示唆されている。本プロジェクトではこれまでに神奈川県立保健福祉大学、神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター、株式会社メタジェンとともに新型コロナウイルス抗体保有者の生活習慣や腸内環境の調査に関する共同研究を実施してきた。株式会社明治も参画し、あらたな産官学連携による共同研究として「神奈川県産官学共同 新型コロナウイルスワクチン抗体価社会調査プロジェクト」をスタートした。抗体市中モニタリングの結果と生活習慣や食習慣、健康状態に関するアンケート、腸内環境の網羅的解析、免疫系への影響の評価を統合的に解析・評価することで、生活習慣、特に食習慣がもたらすワクチン抗体価への影響について調べた。

項目 3-1： 腸内環境制御による疾患予防法の検討

医療技術の進歩により平均寿命は延伸している一方で、加齢に伴い様々な疾患に対するリスクも増加し、複数の慢性疾患を併存する人も増えている。こうした背景から、疾病に至る前段階である「未病」の状態を早期に発見し、対

策を講じることで、疾病の発症を予防し、健康寿命を延ばすことの重要性が高まっている。近年の研究では、ディスバイオーシスがさまざまな疾患の発症や増悪に関与していることが示されており、腸内環境を適切に維持することが健康管理の一助となることが明らかになりつつある。実際に、近年患者数が増加している脳梗塞や認知症においても、腸内環境との関連が報告されている。腸は「第二の脳」とも呼ばれ、「脳腸相関」に関する研究も進んでおり、腸内環境の制御が脳機能の維持において重要な役割を果たすことが推察されている。しかし、脳梗塞や認知症、またそれらの前段階にあたる高血圧や肥満といった未病状態における腸内環境の改善による疾患予防効果については、十分に検討・報告されていない。そこで本グループでは、未病の改善を政策的に推進している神奈川県との連携のもと、腸内環境制御による未病段階での疾患予防効果を検証するための予備的な検討を行った。まずは高血圧モデル動物を用いた食品成分の継続摂取実験を通じて、腸内環境の変化と血圧抑制効果との関連を評価し、腸内環境改善による未病改善の可能性を検討した。

2. 研究成果

研究目的に掲げた各項目の研究成果を以下に示す。

項目 1-1： 腸内細菌基準株の安定的培養技術の確立

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 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。

	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

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

項目 1-2： ヒトおよび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

一を釣菌し、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、その配列をシークエンス解析することで、菌種の同定を行いヒト便試料より 6 種類のグラム陰性菌と 1 種類のグラム陽性菌の単離・培養に成功した。これらに加えて、疾患関連細菌 2 種類の単離・安定培養法の確立に成功した。

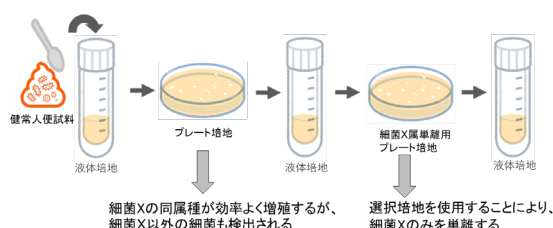
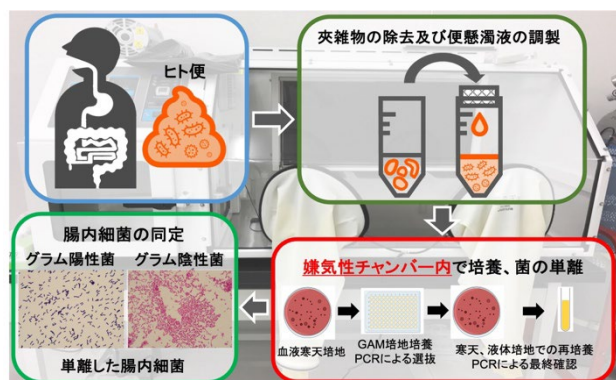


図 1 ヒトもしくはマウス由来便試料からの腸内細菌の単離・安定培養法構築の流れ、疾患関連細菌 X の単離・安定培養法の構築手順

腸内細菌が存在する消化管内は、腸内細菌同士の相互関係のみならず、腸内細菌—宿主細胞の相互関係も腸内細菌の定着に必要となる。すなわち、宿主—微生物共生系を検討することは腸内細菌の特徴や機能を評価する上で重要である。そこで、新たな腸内細菌培養方法として腸管上皮細胞培養株と腸内細菌の共培養系の構築を行った。その結果、腸内細菌と腸管上皮細胞培養株を共培養したところ、一部の細菌は形状が培地のみでの単独培養時と異なる形状に変化することが明らかとなった。

これまでに作製した腸内細菌特異的抗体の機能解析から腸内細菌特異的抗体に使用したヒト由来腸内細菌 A は同基準株と表面構造が異なることが示唆されていた。そこで、ヒト由来腸内細菌 A が宿主に与える影響を評価した。それぞれの腸内細菌の単独腸内細菌定着マウスを構築し、宿主への影響を解析したが、ヒト由来腸内細菌 A と基準株の間に大きな違いは認められなかった。一方、腸管への定着効率を検討するため、ヒト由来腸内細菌 A と基準株によるマウス腸内への競合定着試験を実施したところ、ヒト由来腸内細菌 A はマウスの腸内において基準株よりも優勢になることが明らかとなった。

項目 1-3： 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。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細菌に特異的に結合しながら、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も実施した。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た。次に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。

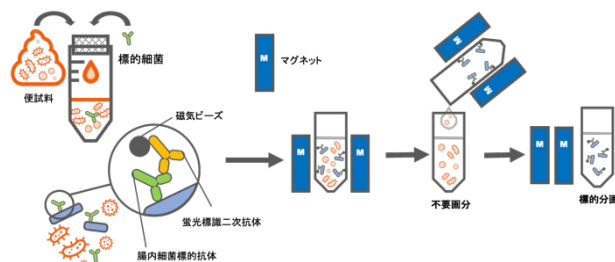


図 2 MojoSort と作製した腸内細菌特異的抗体を用いた、便懸濁液からの標的細菌分離の概念図

疾患に関連するグラム陰性菌に発現するタンパク質 (タンパク質 X) に対する抗体を作成し様々な腸内細菌との交差反応を検証した。タンパク質 X を発現する腸内細菌ならびにその破碎溶液に対して反応する抗体の作製に成功した。また抗体の作製と並行して、タンパク質 X を簡易的に検出する方法の検討を行なった。その結果、タンパク質 X を発現する腸内細菌を添加した便懸濁液からタンパク質 X 特異的プライマーを用いた PCR 法により簡便にタンパク質 X を検出する方法を構築できた。

次に、これまでに作製した腸内細菌特異的抗体の機能解析を実施した。まずヒト由来腸内細菌を特異的に認識する抗体について標的分子の解析を実施した。抗体を用いた免

疫沈降法ならびに遺伝子欠損細菌を用いたウェスタンブロット解析から、予想とは異なり抗体 A は細菌に広く保存されている細胞内酵素を認識していることが明らかとなった。今までの研究から本抗体を作製した際に用いたヒト由来腸内細菌では抗体が表層の分子を認識していることが示される結果が得られていた。そこで免疫組織染色や腸内細菌培養上清を用いたウェスタンブロット解析により、酵素の局在ならびに酵素が細胞外に分泌されるかどうか検討を実施した。その結果、ヒト由来腸内細菌では酵素が細菌の表層に発現し、菌体外へと放出されていることを見出した。

作製したタンパク質 X に対する抗体について、タンパク質 X を発現する標的細菌、細菌破砕溶液、および細菌培養上清を使用し、得られた抗体の機能を検討した。その結果、作製した抗体は標的タンパク質を持つ、幅広い疾患関連細菌を認識できるだけでなく、標的タンパク質を有さない同属の細菌には交差反応を示さなかった。次に作製した抗体の応用利用法の検討を実施するために、標的タンパク質 X を添加したヒト便懸濁液から作製した抗体を活用し、標的タンパク質 X が検出できるかどうかの検討を行った。その結果、ELISA で便に添加した標的タンパク質 X を検出することができた。また、作製した抗体はウェスタンブロット法にも適用できることも明らかとなった。

これまでに作製してきた有用性の高い腸内細菌ならびに疾患に関連する腸内細菌に対する抗体についてそれぞれ機能評価を行なった。はじめに有用性の高い腸内細菌に対する抗体については、抗体を活用し、これまで検討してきた標的細菌を人為的に添加した腸内細菌叢液ではなく、本来の腸内細菌叢から標的細菌を分離・単離できるかを検討した。抗体結合磁気ビーズを用いて分取した分画より新たに 3 株の標的細菌の単離に成功し、いずれも再培養可能であることが示唆された。本成果は、腸内細菌叢から目的菌を選択的に回収可能な基盤技術の構築につながる成果であると考えられる。疾患に関連する腸内細菌に対する抗体については、疾患診断法の構築への応用が期待される複数の抗体の機能評価を実施した。精製した抗体に HRP 標識を施し、ELISA により標的タンパク質を定量的に検出する条件を確立した。さらに、便懸濁液に添加した標的タンパク質を、ELISA にて検出できた。これらの結果に加え、複数の抗体について、抗体可変領域の配列解析を行なった。これらの成果は新たな疾患の新規診断法開発の基盤情報として有用であることを示唆するものであった。

項目 2-1： 新型コロナウイルス抗体価社会調査プロジェクト

神奈川県が中心となり進めている大規模ゲノムコホートである「神奈川県みらい未病コホート研究」の研究基盤を活用し、新型コロナウイルス抗体市中モニタリングを進めた。さらに追跡調査として、新型コロナウイルス抗体保有者の健康状態や腸内環境の特徴について、アンケート調査や、腸内環境の解析、免疫グロブリン A (IgA) の測定を実施し、特に不顕性感染者の腸内環境の特徴を明らかに

した。併せて、生活習慣や食習慣、健康状態に関するアンケートや腸内環境の網羅的解析、さらには免疫系への影響を検討するための末梢血単核球等の評価に向けた研究体制を構築した。(図 3、プロジェクト URL:

https://www.kistec.jp/kistec-manage/wp-content/uploads/press_221104.pdf)

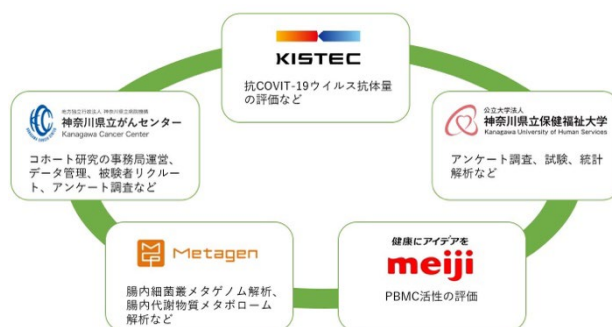


図 3 新型コロナウイルス抗体価社会調査プロジェクトに参画する産学官の研究機関並びに各拠点における研究実施項目

食習慣がもたらすワクチン抗体価への影響について調べた結果、血中のワクチン抗体価は、ワクチン接種後日数に依存して抗体価は低下したが、接種直後でも抗体価が低い人や接種半年後でも抗体価が維持されている人など個人ごとに大きく異なることが明らかとなった。また新型コロナウイルスワクチンと食、および腸内環境の関連性を調べたところ、ヨーグルトの習慣的な摂取が抗体価の上昇や維持、抗原特異的 T 細胞の活性化と関連すること、ヨーグルトの習慣的な摂取が腸内細菌叢や代謝物質を変化させることが明らかとなった (図 4)。

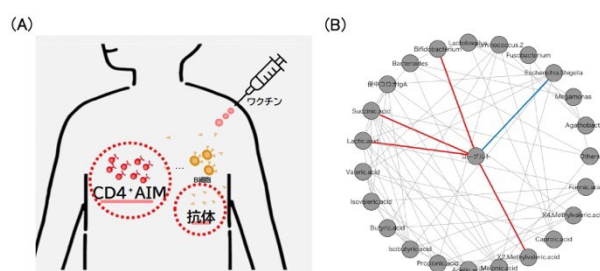


図 4 (A) ヨーグルト摂取がコロナワクチン投与に与える影響

URL: <https://www.kistec.jp/aboutus/press/pr20231130-2/>

(B) ヨーグルトの摂取頻度と腸内環境の相関解析結果

生活習慣、特に食習慣がもたらすワクチン抗体価への影響についての調査では 94 人分の腸内細菌叢の解析、81 名分の便に含まれる SARS-CoV-2 S1 RBD タンパク質に対するヒト IgG 抗体およびヒト IgA 抗体量を ELISA にて定量した。さらに生活・食習慣、健康状態アンケート、血中抗体価ならびに免疫細胞解析データとの統合解析を進め

た。腸内環境と血液中の抗-SARS-CoV-2 S タンパク質 IgG の相関解析を実施した結果、血中抗体価と便中抗体価の間に相関があった。また、血中・便中に抗体価の間に共通して相関がある腸内細菌や代謝物質はなかったものの、個々の抗体価と相関するものを見出した（図 5）。これらをまとめた内容を論文報告し（参考文献 6）、プレスリリースも行った。<https://www.kistec.jp/aboutus/press/pr20251106/>

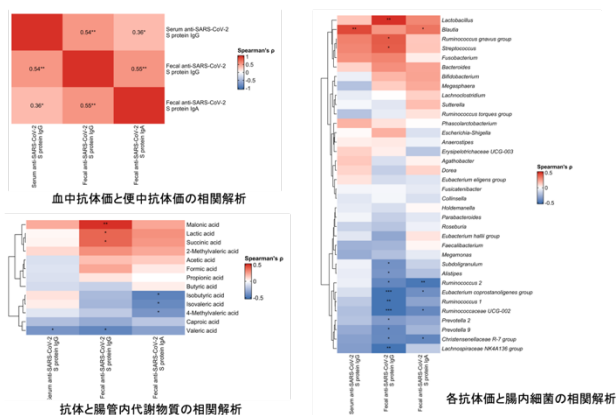


図 5 血中抗体価と腸内環境の関連性

項目 3-1： 腸内環境制御による疾患予防法の検討

ディスバイオーシスは多くの疾患の発症に関与しており、腸内環境の改善が疾患予防や未病状態への介入手段として注目されている。そこで、未病の一例として高血圧に着目し、腸内環境の制御によってその進行を抑制できるかを検討した。高血圧疾患モデル動物に対し、複数のプレバイオティクスとして知られる食品成分を自由飲水で継続摂取させ、経時的に収縮期血圧を測定した。その結果、いくつかの食品成分の摂取により、対照群（水投与群）と比較して5週目以降に有意な血圧抑制効果が認められた。また、血圧上昇のタイミングについても、食品成分や代謝物質を摂取した群では対照群に比べて遅延が見られ、収縮期血圧の上昇を緩やかにする効果が示唆された。これらの結果は、食品由来成分の継続的摂取が腸内環境の維持・改善を通じて高血圧の進行を抑制し、未病段階での予防的介入として有効である可能性を示すものであった。

3. 研究体制

本グループでは、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おり、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。本グループではオンラインを活用し、多拠点の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を共有し、共同研究の進め方を議論しながら進めた。

4. 総括

本グループでは、腸内環境制御基盤技術の構築に向け、腸内細菌に関する新たな知見の取得および制御技術・ツールの開発を進めている。その一環として、腸内環境制御に

資するツールのひとつである腸内細菌特異的抗体の作製に着手し、独自に確立した手法により複数の抗体を作製してきた。有用性が示唆される腸内細菌を標的とした抗体を応用し、多種多様な腸内細菌から構成される腸内細菌叢から、標的細菌を効率的に単離することに成功した。得られた成果は、腸内細菌の機能解析および応用研究の基盤技術として有用であり、現在、学術論文として投稿を行っている。また、疾患に関連する細菌に対する抗体についても、機能解析およびアプリケーション開発を進めており、得られた研究成果に基づいて知的財産の出願を行った。

またアフターコロナを見据えた取り組みとして、産官学連携による新型コロナウイルス抗体価に関する社会調査プロジェクトを開始し、その研究成果の一部として、新型コロナウイルスワクチン接種と食生活、腸内環境との間に密接な関連性があることを明らかにした。これらの成果をもとに、研究成果をまとめた論文を投稿し、科学的根拠に基づく知見として発信を進めた。また本研究で得られた知見を応用し、免疫機能を高めることを目的としたサプリメントや機能性食品の開発を進め、食を基盤としたアフターコロナ時代の感染症に強い身体づくりの実現を目指した。

腸内環境制御による疾患予防法の検討では、腸内環境制御による未病段階での疾患予防効果の検証を目的として、食品成分を継続的に摂取させた高血圧疾患モデル動物を用い、腸内環境の変化と収縮期血圧の推移を経時的に評価した。その結果、いくつかの食品成分において、腸内環境の維持・改善を通じた血圧上昇の抑制効果が確認され、腸内環境を標的とした栄養介入が高血圧をはじめとする未病状態の改善に有効である可能性が示唆された。一方で、血圧抑制作用の詳細な機序については依然として明らかな点が多く、検討課題として残された。なお、本研究は、未病改善を重点政策として掲げる神奈川県との連携体制のもとで推進しており、得られた知見を基盤として、腸内環境制御を活用した未病対策の社会実装へ繋げる。

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も実施する。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. Interaction between microbiota and Immunity in health and disease *Cell Res.* Jun;30(6):492-506. (2020)
- 2 Sanders, ME., Merenstein, DJ., Gibson, GR., Rastall, RA. Probiotics and prebiotics in intestinal health and diseases: from biology to the clinic *Nat Rev Gastroenterol.* Oct; 16(10):605-616, (2019).
- 3 Fan, Y., Pedersen, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol.* Jan;19(1):55-71, (2021).
- 4 Chen, Y., Zhou, J., Wang, L. Role and Mechanism of gut

microbiota in human disease *Front cell Infect Microbiol.* Mar 17;11:625913 (2021).

5 Escobar LE, Molina-Cruz A, Barillas-Mury C.. BCG vaccine protection from severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 28;117(30):17720-17726 (2020).

6 Negishi, H., Nakato, G., Kadowaki, R., Kono, H., Minakata, M., Ichikawa, A., Fukuda, S. *et al*, Associations between food consumption with T cell activation and antibody responses following SARS-CoV-2 mRNA vaccination. *Gut Microbes Reports*, 2(1). (2025).

プロジェクト参加者

令和 3 年度 （令和 3 年 4 月～令和 4 年 3 月）

氏名	職名	本務先等
福田 真嗣	プロジェクトリーダー	慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任教授
井上 浄	非常勤研究員	慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任准教授
Aw Wanping	非常勤研究員	慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任助教
中藤 学	常勤研究員	
大縄 悟志	常勤研究員	
古川 梨紗子	研究補助員	
栗原 眞理子	事務補助員	
田中 一己	研究協力員	慶應義塾大学
高橋 春乃	研究協力員	慶應義塾大学
池田 陽人	研究協力員	慶應義塾大学

令和 4 年度 （令和 4 年 4 月～令和 5 年 3 月）

氏名	職名	本務先等
福田 真嗣	プロジェクトリーダー	慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任教授
井上 浄	非常勤研究員	慶應義塾大学先端生命科学研究所 所員
Aw Wanping	非常勤研究員	慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任助教
中藤 学	常勤研究員	
大縄 悟志	常勤研究員	
上松 仁	研究補助員	
栗原 眞理子	事務補助員	
田中 一己	研究協力員	慶應義塾大学
池田 陽人	研究協力員	慶應義塾大学
市村 涼葉	研究協力員	慶應義塾大学

令和 5 年度 （令和 5 年 4 月～令和 6 年 3 月）

氏名	職名	本務先等
福田 真嗣	プロジェクトリーダー	慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任教授
井上 浄	非常勤研究員	慶應義塾大学先端生命科学研究所 客員教授
Aw Wanping	非常勤研究員	慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任助教
中藤 学	常勤研究員	
大縄 悟志	常勤研究員	
上松 仁	研究補助員	
栗原 眞理子	事務補助員	
田中 一己	研究協力員	慶應義塾大学
池田 陽人	研究協力員	慶應義塾大学
市村 涼葉	研究協力員	慶應義塾大学

令和 6 年度 （令和 6 年 4 月～令和 7 年 3 月）

氏名	職名	本務先等
福田 真嗣	プロジェクトリーダー	慶應義塾大学先端生命科学研究所・特任教授
井上 浄	非常勤研究員	慶應義塾大学先端生命科学研究所・客員教授
Aw Wanping	非常勤研究員	慶應義塾大学先端生命科学研究所・特任助教
中藤 学	常勤研究員	
大縄 悟志	常勤研究員	
上松 仁	研究補助員	
栗原 眞理子	事務補助員	
田中 一己	研究協力員	慶應義塾大学
池田 陽人	研究協力員	慶應義塾大学
市村 涼葉	研究協力員	慶應義塾大学
四宮 彩名	研究協力員	慶應義塾大学

業 績

業績

【原著論文】

1. Yang J, Song I, Saito M, Hartanto T, Ichinohe T, Fukuda S. Partially hydrolyzed guar gum attenuates symptoms and modulates the gut microbiota in a model of SARS-CoV-2 infection. *Gut Microbiome (Camb)*. 2025 Jan 14;6:e1
2. Onishi M, Nakamura T, Kano C, Hirota T, Fukuda S, Morita H. α -Cyclodextrin supplementation improves endurance exercise performance and reduces post-exercise fatigue in human males: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Biosci Microbiota Food Health*. 2025;44(1):80-89
3. Ikeda H, Oshibuchi K, Yang J, Fukuda S, Arakawa K. Complete genome sequence of *Bulleidia* sp. 10714-15 isolated from human colon cancer patients. *Microbiol Resour Announc*. 2024 Dec 12;13(12):e0093724
4. Kobayashi M, Kobayashi N, Deguchi K, Omori S, Nagai M, Fukui R, Song I, Fukuda S, Miyake K, Ichinohe T. TNF- α exacerbates SARS-CoV-2 infection by stimulating CXCL1 production from macrophages. *PLoS Pathog*. 2024 Dec 9;20(12):e1012776
5. Mio K, Goto Y, Matusoka T, Komatsu M, Ishii C, Yang J, Kobayashi T, Aoe S, Fukuda S. Barley β -glucan consumption improves glucose tolerance by increasing intestinal succinate concentrations. *NPJ Sci Food*. 2024 Sep 30;8(1):69
6. Ichimura R, Tanaka K, Nakato G, Fukuda S, Arakawa K. Complete genome sequence of *Mediterraneibacter gnnavus* strain R1, isolated from human feces. *Microbiol Resour Announc*. 2024 Sep 30:e0086324
7. Grant ET, Parrish A, Boudaud M, Hunewald O, Hirayama A, Ollert M, Fukuda S, Desai MS. Dietary fibers boost gut microbiota-produced B vitamin pool and alter host immune landscape. *Microbiome*. 2024 Sep 23;12(1):179
8. Steimle A, Neumann M, Grant ET, Willieme S, De Sciscio A, Parrish A, Ollert M, Miyauchi E, Soga T, Fukuda S, Ohno H, Desai MS. Gut microbial factors predict disease severity in a mouse model of multiple sclerosis. *Nat Microbiol*. 2024 Sep;9(9):2244-2261
9. Kurokawa S, Nomura K, Sanada K, Miyaho K, Ishii C, Fukuda S, Iwamoto C, Naraoka M, Yoneda S, Imafuku M, Matsuzaki J, Saito Y, Mimura M, Kishimoto T. A comparative study on dietary diversity and gut microbial diversity in children with autism spectrum disorder, attention-deficit hyperactivity disorder, their neurotypical siblings, and non-related neurotypical volunteers: a cross-sectional study. *J Child Psychol Psychiatry*. 2024 Sep;65(9):1184-1195
10. Mizutani S, Tamaki A, Shiba S, Salim F, Yamada M, Takamaru H, Nakajima T, Yoshida N, Ikuta S, Yachida T, Shibata T, Soga T, Saito Y, Fukuda S, Ishikawa H, Yamada T, Yachida S. Dynamics of the gut microbiome in FAP patients undergoing intensive endoscopic reduction of polyp burden. *Gut*. 2024 Aug 1:gutjnl-2024-332381.
11. Lin YH, Tahara-Hanaoka S, Obana N, Fukuda S, Shibuya A. An inhibitory immunoreceptor Allergin-1 regulates the intestinal dysbiosis and barrier function in mice. *Int Immunol*. 2024 Jun 8;36(7):365-371.
12. Salim F, Mizutani S, Shiba S, Takamaru H, Yamada M, Nakajima T, Yachida T, Soga T, Saito Y, Fukuda S, Yachida S, Yamada T. *Fusobacterium* species are distinctly associated with patients with Lynch syndrome colorectal cancer. *iScience*. 2024 Jun 4;27(7):110181.

13. Sasaki I, Fukuda-Ohta Y, Nakai C, Wakaki-Nishiyama N, Okamoto C, Okuzaki D, Morita S, Kaji S, Furuta Y, Hemmi H, Kato T, Yamamoto A, Tosuji E, Saitoh SI, Tanaka T, Hoshino K, Fukuda S, Miyake K, Kuroda E, Ishii KJ, Iwawaki T, Furukawa K, Kaisho T. A stress sensor, IRE1 α , is required for bacterial-exotoxin-induced interleukin-1 β production in tissue-resident macrophages. *Cell Rep.* 2024 Apr 23;43(4):113981
14. Funahashi K, Lee CG, Sugitate K, Kagata N, Fukuda N, Song I, Ishii C, Hirayama A, Fukuda S. Development of a specialized method for simultaneous quantification of functional intestinal metabolites by GC/MS-based metabolomics. *Gut Microbes Rep.* 1: 1, 2024.
15. Song I, Yang J, Saito M, Hartanto T, Nakayama Y, Ichinohe T, Fukuda S*. Prebiotic inulin ameliorates SARS-CoV-2 infection in hamsters by modulating the gut microbiome. *npj Sci. Food.* 8: 18, 2024.
16. Yamauchi Y, Masutomi H, Ishihara K, Hartanto T, Lee CG, Fukuda S*. The differential effect of two cereal foods on gut environment: a randomized, controlled, double-blind, parallel-group study. *Front. Nutr.* 10: 1254712, 2024.
17. Matsuzaki J, Kurokawa S, Iwamoto C, Miyaho K, Takamiya A, Ishii C, Hirayama A, Sanada K, Fukuda S, Mimura M, Kishimoto T, Saito Y. Intestinal metabolites predict treatment resistance of patients with depression and anxiety. *Gut Pathog.* 16: 8, 2024.
18. Tsukimi T, Obana N, Shigemori S, Arakawa K, Miyauchi E, Yang J, Song I, Ashino Y, Wakayama M, Soga T, Tomita M, Ohno H, Mori H, Fukuda S*. Genetic mutation in *Escherichia coli* genome during adaptation to the murine intestine is optimized for the host diet. *mSystems.* 20;9(2): e0112323, 2024.
19. Wang Y, Morishima T, Sezaki M, Sato R, Nakato G, Fukuda S, Kobiyama K, Ishii KJ, Li Y, Takizawa H. *Akkermansia muciniphila* induces slow extramedullary hematopoiesis via cooperative IL-1R/TLR signals. *EMBO Rep.* 2023 Oct 23:e57485.
20. Yama K, Nishimoto Y, Kumagai K, Jo R, Harada M, Maruyama Y, Aita Y, Fujii N, Inokuchi T, Kawamata R, Sako M, Ichiba Y, Tsutsumi K, Kimura M, Murakami S, Kakizawa Y, Kumagai T, Yamada T, Fukuda S*. Dysbiosis of oral microbiome persists after dental treatment-induced remission of periodontal disease and dental caries. *mSystems.* 2023 Sep 12:e0068323.
21. Tanaka K, Tanigawa N, Song I, Komatsu T, Kuriki Y, Tanaka Y, Fukudo S, Urano Y, Fukuda S*. A protease activity-based machine-learning approach as a complementary tool for conventional diagnosis of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Front Microbiol.* 2023 Jul 7;14:1179534.
22. Nagai M, Moriyama M, Ishii C, Mori H, Watanabe H, Nakahara T, Yamada T, Ishikawa D, Ishikawa T, Hirayama A, Kimura I, Nagahara A, Naito T*, Fukuda S*, Ichinohe T*. High body temperature increases gut microbiota-dependent host resistance to influenza A virus and SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun.* 2023 Jun 30;14(1):3863.
23. Kawamoto S, Uemura K, Hori N, Takayasu L, Konishi Y, Katoh K, Matsumoto T, Suzuki M, Sakai Y, Matsudaira T, Adachi T, Ohtani N, Standley DM, Suda W, Fukuda S, Hara E. Bacterial induction of B cell senescence promotes age-related changes in the gut microbiota. *Nat Cell Biol.* 2023 Jun;25(6):865-876.
24. Kure A, Tsukimi T, Ishii C, Aw W, Obana N, Nakato G, Hirayama A, Kawano H, China T, Shimizu F, Nagata M, Isotani S, Muto S, Horie S, Fukuda S*. Gut environment changes due to androgen deprivation therapy in patients with prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2023 Jun;26(2):323-330.

25. Fujita H, Ushio M, Suzuki K, Abe MS, Yamamichi M, Okazaki Y, Canarini A, Hayashi I, Fukushima K, Fukuda S, Kiers ET, Toju H. Facilitative interaction networks in experimental microbial community dynamics. *Front Microbiol.* 2023 Apr 11;14:1153952.
26. Zhu X, Sakamoto S, Ishii C, Smith MD, Ito K, Obayashi M, Unger L, Hasegawa Y, Kurokawa S, Kishimoto T, Li H, Hatano S, Wang TH, Yoshikai Y, Kano SI, Fukuda S, Sanada K, Calabresi PA, Kamiya A. Dectin-1 signaling on colonic $\gamma\delta$ T cells promotes psychosocial stress responses. *Nat Immunol.* 2023 Apr;24(4):625-636.
27. Tanaka Y, Yamashita R, Kawashima J, Mori H, Kurokawa K, Fukuda S, Gotoh Y, Nakamura K, Hayashi T, Kasahara Y, Sato Y, Fukuda S. Further notice of omics profiles of fecal and oral microbiota change in irritable bowel syndrome patients with diarrhea and symptom exacerbation. *J Gastroenterol.* 2023 Apr;58(4):427-428.
28. Fujita H, Ushio M, Suzuki K, Abe MS, Yamamichi M, Iwayama K, Canarini A, Hayashi I, Fukushima K, Fukuda S, Kiers ET, Toju H. Alternative stable states, nonlinear behavior, and predictability of microbiome dynamics. *Microbiome.* 2023 Mar 29;11(1):63.
29. Morita H, Kano C, Ishii C, Kagata N, Ishikawa T, Hirayama A, Uchiyama Y, Hara S, Nakamura T, Fukuda S*. *Bacteroides uniformis* and its preferred substrate, α -cyclodextrin, enhance endurance exercise performance in mice and human males. *Sci Adv.* 2023 Jan 25;9(4):eadd2120.
30. Nishimoto Y, Kawai J, Mori K, Hartanto T, Komatsu K, Kudo T, Fukuda S*. Dietary supplement of mushrooms promotes SCFA production and moderately associates with IgA production: A pilot clinical study. *Front Nutr.* 2023 Jan 9;9:1078060.
31. Nishimoto Y, Fujisawa K, Ukawa Y, Kudoh M, Funahashi K, Kishimoto Y, Fukuda S*. Effect of urolithin A on the improvement of vascular endothelial function depends on the gut microbiota. *Front Nutr.* 2023 Jan 5;9:1077534.
32. Tanaka A, Sanada K, Miyaho K, Tachibana T, Kurokawa S, Ishii C, Noda Y, Nakajima S, Fukuda S, Mimura M, Kishimoto T, Iwanami A. The relationship between sleep, gut microbiota, and metabolome in patients with depression and anxiety: A secondary analysis of the observational study. *PLoS One* 18: e0296047, 2023.
33. Kawamata T, Wakimoto A, Nishikawa T, Ikezawa M, Hamada M, Inoue Y, Kulathunga K, Salim FN, Kanai M, Nishino T, Gentleman K, Liu C, Mathis BJ, Obana N, Fukuda S, Takahashi S, Taya Y, Sakai S, Hiramatsu Y. Natto consumption suppresses atherosclerotic plaque progression in LDL receptor-deficient mice transplanted with iRFP-expressing hematopoietic cells. *Sci Rep.* 13:22469, 2023.
34. Nishimoto Y, Salim F, Yamauchi Y, Mori Y, Murakami S, Suzuki A, Fukuda S, Yamada T. Kale improves bowel movements in constipated women and affects some intestinal microbes and metabolites: a pilot study. *Front Nutr.* 10:1247683, 2023.
35. Fujita H, Ushio M, Suzuki K, Abe MS, Yamamichi M, Okazaki Y, Canarini A, Hayashi I, Fukushima K, Fukuda S, Kiers ET, Toju H. Metagenomic analysis of ecological niche overlap and community collapse in microbiome dynamics. *Front Microbiol.* 14:1261137, 2023.
36. Oshibuchi K, Yang J, Obana N, Fukuda S, Arakawa K. Complete genome sequence of *Solobacterium moorei* JCM 10645T isolated from a human stool sample. *Microbiol Resour Announc.* e0096523, 2023.
37. Nishimoto Y, Salim F, Yama K, Kumagai K, Jo R, Harada M, Maruyama Y, Aita Y, Fujii N, Inokuchi T, Kawamata R, Sako M, Ichiba Y, Tsutsumi K, Kimura M, Mori Y, Murakami S, Kakizawa Y, Kumagai T, Fukuda

- S*. Integrated analysis of the oral and intestinal microbiome and metabolome of elderly people with more than 26 original teeth: a pilot study. *Front Microbiol.* 14:1233460, 2023.
38. Sezaki, M*, Hayashi, S*, Nakato, G., Wang, Y., Nakata, S., Biswas, S., Morishima, T., Fakruddin, M., Moon, J., Ahn, S., Kim, P., Miyamoto, Y., Baba, H., Fukuda, S., and Takizawa, H. (* equal contribution) Hematopoietic stem and progenitor cells integrate microbial signals to promote gut tissue repair. *EMBO J.* 2022 Nov 17;41(22):e110712.
 39. Nakamura Y, Suzuki S, Murakami S, Nishimoto Y, Higashi K, Watarai N, Umetsu J, Ishii C, Ito Y, Mori Y, Kohno M, Yamada T, Fukuda S. Integrated gut microbiome and metabolome analyses identified fecal biomarkers for bowel movement regulation by *Bifidobacterium longum* BB536 supplementation: A RCT. *Comput Struct Biotechnol J.* 2022 Oct 25;20:5847-5858.
 40. Tanaka Y, Yamashita R, Kawashima J, Mori H, Kurokawa K, Fukuda S, Gotoh Y, Nakamura K, Hayashi T, Kasahara Y, Sato Y, Fukudo S. Omics profiles of fecal and oral microbiota change in irritable bowel syndrome patients with diarrhea and symptom exacerbation. *J Gastroenterol.* 2022 Oct;57(10):748-760.
 41. Yoshida Y, Shimizu I, Shimada A, Nakahara K, Yanagisawa S, Kubo M, Fukuda S, Ishii C, Yamamoto H, Ishikawa T, Kano K, Aoki J, Katsuumi G, Suda M, Ozaki K, Yoshida Y, Okuda S, Ohta S, Okamoto S, Minokoshi Y, Oda K, Sasaoka T, Abe M, Sakimura K, Kubota Y, Yoshimura N, Kajimura S, Zuriaga M, Walsh K, Soga T, Minamino T. Brown adipose tissue dysfunction promotes heart failure via a trimethylamine N-oxide-dependent mechanism. *Sci. Rep.* 2022 Sep 1;12(1):14883.
 42. Goto Y, Nishimoto Y, Murakami S, Nomaguchi T, Mori Y, Ito M, Nakaguro R, Kudo T, Matsuoka T, Yamada T, Kobayashi T, *Fukuda S. Metabologenic Approach Reveals Intestinal Environmental Features Associated with Barley-Induced Glucose Tolerance Improvements in Japanese: A Randomized Controlled Trial. *Nutrients.* 2022 Aug 24;14(17):3468.
 43. Yukawa-Muto Y, Kamiya T, Fujii H, Mori H, Toyoda A, Sato I, Konishi Y, Hirayama A, Hara E, Fukuda S, Kawada N, Ohtani N. Distinct responsiveness to rifaximin in patients with hepatic encephalopathy depends on functional gut microbial species. *Hepatol. Commun.* 2022 Aug;6(8):2090-2104.
 44. Jangid A, Fukuda S, Seki M, Suzuki Y, Taylor TD, Ohno H, Prakash T. Gut microbiota alternation under the intestinal epithelium-specific knockout of mouse Piga gene. *Sci. Rep.* 2022 Jun 25;12(1):10812.
 45. Yamagishi R, Kamachi F, Nakamura M, Yamazaki S, Kamiya T, Takasugi M, Cheng Y, Nonaka Y, Yukawa-Muto Y, Thuy LTT, Harada Y, Arai T, Loo TM, Yoshimoto S, Ando T, Nakajima M, Taguchi H, Ishikawa T, Akiba H, Miyake S, Kubo M, Iwakura Y, Fukuda S, Chen WY, Kawada N, Rudensky A, Nakae S, Hara E, Ohtani N. Gasdermin D-mediated release of IL-33 from senescent hepatic stellate cells promotes obesity-associated hepatocellular carcinoma. *Sci. Immunol.* 2022 Jun 24;7(72):eab17209.
 46. Nishimoto Y, Mizuguchi Y, Mori Y, Ito M, Miyazato S, Kishimoto Y, Yamada T, Fukuda S. Resistant maltodextrin intake reduces virulent metabolites in the gut environment: A randomized control study in a Japanese cohort. *Front. Microbiol.* 2022 May 4;13:644146.
 47. Shiroma H, Shiba S, Erawijantari PP, Takamaru H, Yamada M, Sakamoto T, Kanemitsu Y, Mizutani S, Soga T, Saito Y, Shibata T, Fukuda S, Yachida S, Yamada T. Surgical Treatment for Colorectal Cancer Partially

- Restores Gut Microbiome and Metabolome Traits. *mSystems*. 2022 Apr 26;7(2):e0001822.
48. Jangid A, Fukuda S, Suzuki Y, Taylor TD, Ohno H, Prakash T. Shotgun metagenomic sequencing revealed the prebiotic potential of a grain-based diet in mice. *Sci Rep*. 2022 Apr 25;12(1):6748.
 49. 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*. 2022 Mar 4;5(1):206.
 50. 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. *3 Biotech*. 2022 Feb;12(2):56.
 51. 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*. 2022 Jan 13;12(1):689.
 52. *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.
 53. 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.
 54. 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.
 55. 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.
 56. 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.
 57. 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.
 58. 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.
 59. 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.
 60. 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.
 61. 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.

62. 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.
63. 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.
64. 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.
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. 福田真嗣 腸内細菌をくすりに！最新”腸”科学が明らかにする個人差と腸内環境の関係性、日本薬学会第 145 年会市民公開講座、アクロス福岡(福岡)、2025 年 3 月 30 日
2. 福田真嗣 Brown Gem Story ～メタジェンの挑戦～、第 19 回日本ゲノム微生物学会年会、かずさアカデミアホール(千葉)、2025 年 3 月 18 日
3. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療・創薬・ヘルスケアの現状、第 21 回日本消化管学会総会学会学術集会、京王プラザホテル(東京)、2025 年 2 月 21 日
4. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアの現状と未来、第 21 回日本獣医内科学アカデミー学術集会、東京国際フォーラム(東京)、2025 年 2 月 16 日
5. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアの現状と未来、第 40 回日本栄養治療学会学術集会、パシフィコ横浜(神奈川)、2025 年 2 月 15 日
6. 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 39 回前立腺シンポジウム、コングレススクエア日本橋(東京)、2024 年 12 月 14 日
7. 福田真嗣 腸内細菌と肥満解消～一層注目を集める短鎖脂肪酸の新しい可能性～、日本肥満症予防協会、オ

【総説】

1. 中藤学、尾花望、福田真嗣 総論:腸内フローラとは？ GO-VET, 7(3), 4-13 (2024)

【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)

ンライン、2024 年 12 月 5 日

8. 福田真嗣 腸内細菌叢＝あなたの体質？最新“腸”科学が明らかにする個人差と腸内環境の関係性、第 61 回日本臨床生理学会総会、KABUTO ONE HALL & CONFERENCE(東京)、2024 年 11 月 15
9. 福田真嗣 自己管理をサポートする新たな ME-BYO テクノロジー、国際シンポジウム ME-BYO サミット神奈川 2024、湯本富士屋ホテル(神奈川)、2024 年 11 月 8 日
10. 福田真嗣 腸内細菌が決める！？あなたの体型と健康のひみつ、日本肥満症予防協会 市民講座、パシフィコ横浜(神奈川)、2024 年 10 月 21 日
11. 福田真嗣 腸内環境の可視化と健康づくりへの活用、第 26 回ダノン健康栄養フォーラム、品川インターシティーホール(東京)、2024 年 9 月 28 日
12. 福田真嗣 Cancer prevention and treatment by gut environmental design、第 83 回日本癌学会学術総会、福岡国際会議場(福岡)、2024 年 9 月 21 日
13. 楊佳約、尾花望、中藤学、野村暢彦、福田真嗣 腸管粘膜局在細菌が大腸炎を緩和する 第 38 回日本バイオフィーム学会学術集会 大阪公立大学阿倍野キャンパス(大阪)、2024 年 7 月 27 日
14. 市村涼葉、田中一己、清水映輔、小川葉子、坪田一男、福田真嗣 骨髄移植による免疫機能変化が腸内細菌叢移植後の腸内細菌叢定着にもたらす影響 第 28 回腸内細菌学会 タワーホール船堀(東京)、2024 年 6 月 25 日
15. 根岸紘生、中藤学、門脇里恵、河野紘己、市川愛弓、牧野聖也、中村翔、成松宏人、福田真嗣 新型コロナウイルス(COVID-19)ワクチン抗原に対する免疫応答と特異的抗体価に影響を与える食習慣ならびに腸内環境の解析 第 78 回日本栄養・食糧学会大会、中村学園大学(福岡)2024 年 5 月 25 日
16. 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、日プレ・プロバイオティクスシンポジウム in 名古屋、ウインク愛知(愛知)、2024 年 5 月 17 日
17. 福田真嗣 腸内細菌を医薬品に：腸内環境層別化に

よる新たな医療・創薬・ヘルスケア、日本薬学会第 144 回年会、パシフィコ横浜(神奈川)、2024 年 3 月 29 日

18. Nakato G, Inoue H, Onawa S, Agematsu H, Obana N, Furukawa R, Inoue J and Fukuda S. Development of bacteria-specific antibody for isolation of target bacteria and functional analysis of antibody-targeted bacterial molecules. 日本農芸化学会 2024 年度東京大会、東京農業大学 世田谷キャンパス(東京) 2024 年 3 月 26 日
19. 福田真嗣 食がもたらす腸内細菌叢の多重安定性とその機能、第 71 回日本生態学会大会、横浜国立大学(神奈川)、2024 年 3 月 19 日
20. 福田真嗣 マウス腸内適応時の大腸菌遺伝子変異と食事との関連、第 46 回日本分子生物学会年会、オンライン開催、2023 年 11 月 29 日
21. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療・創薬・ヘルスケア産業の創出、第 10 回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、富士ソフトアキバプラザ(東京)、2023 年 11 月 25 日
22. 福田真嗣 腸内環境層別化による新たな医療・ヘルスケア、第 63 回日本臨床化学会年次学術集会、御茶ノ水ソラシティーカンファレンスセンター(東京)、2023 年 10 月 28 日
23. 福田真嗣 腸内環境層別化による新たな医療・ヘルスケア、第 25 回日本神経消化器病学会、京王プラザホテル(東京)、2023 年 9 月 29 日
24. 楊佳約、尾花望、中藤学、野村暢彦、福田真嗣 腸管粘膜関連細菌が宿主健康に与える影響日本遺伝学会 第 95 回大会 くまもと県民交流館パレア(熊本)、2023 年 9 月 7 日
25. 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 64 回日本心身医学会総会ならびに学術講演会、パシフィコ横浜(神奈川)、2023 年 7 月 1 日
26. Shinji Fukuda Bacteroides uniformis: A dominant

- bacterial species in the human gut enhances endurance exercise performance. Gordon Research Conference on Animal-Microbe Symbioses, Renaissance Tuscany II Ciocco, Lucca, Italy, June 18-23th, 2023.
27. Yang J, Obana N, Nakato G, Nomura N, Tomita M and Fukuda S. An intestinal mucosa-associated bacterium which modulates host health. Gordon Research Seminar on Animal-Microbe Symbioses, Renaissance Tuscany II Ciocco, Lucca, Italy, June 17-18th, 2023.
28. Shinji Fukuda Genetic mutation in *Escherichia coli* genome during adaptation to the murine intestine is optimized for the host diet, Wolbachia Conference 2023, Orthodox Academy of Creta, Creta, Greece, June 11-16th, 2023.
29. 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、日本化学会第 103 春季年会、東京理科大学野田キャンパス(千葉)、ハイブリット開催、2023 年 3 月 25 日
30. 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. 中藤学、根岸紘生、門脇里恵、河野紘己、市川愛弓、利光孝之、牧野聖也、狩野宏、中村翔、成松宏人、福田真嗣 新型コロナウイルスワクチン接種における免疫、食生活、腸内環境との関連性 ヘルスイノベーション・カンファレンス 殿町 2025 (川崎) 2025 年 2 月 22 日
2. Gaku Nakato, Hikaru Inoue, Satoshi Onawa, Nozomu Obana, Kazuki Tanaka, Hitoshi Agematsu, Isaiah Song, Joe Inoue, Shinji Fukuda Development of a strain-level microbial isolation method using monoclonal antibodies and functional analysis of antibody-targeted bacterial molecules. IUMS2024 (Florence, Italy) 2024 年 10 月 24 日
3. Nozomu Obana, Gaku Nakato, Shinji Fukuda Sortase-mediated capsular polysaccharide production facilitates intestinal competitive fitness in *Ruminococcus gnavus*. IUMS2024 (Florence, Italy) 2024 年 10 月 24 日
4. Jiayue Yang, Nozomu Obana Gaku Nakato, Nobuhiko Nomura Shinji Fukuda Intestinal mucosa-associated bacterium *Adlercreutzia equolifaciens* attenuates colitis. IUMS2024 (Florence, Italy) 2024 年 10 月 23-25 日
5. Jiayue Yang, Nozomu Obana, Gaku Nakato, Nobuhiko Nomura, Shinji Fukuda An intestinal mucosa-associated bacterium which attenuates colitis. 第 97 回日本細菌学会総会 札幌コンベンションセンター (北海道) 2024 年 8 月 7 日
6. Jiayue Yang, Nozomu Obana, Gaku Nakato, Nobuhiko Nomura, Shinji Fukuda Intestinal mucosal-associated bacterium *Adlercreutzia equolifaciens* attenuates colitis 第 51 回内藤コンファレンス シャトレーゼガトーキングダム札幌 (北海道) 2024 年 6 月 26 日
7. 市村涼葉、田中一己、清水映輔、小川葉子、坪田一男、福田真嗣 便微生物叢移植および骨髄 移植併用による腸内細菌叢定着への影響、第 46 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(兵庫)、2023 年 12 月 8 日
8. Nakato G, Inoue H, Onawa S, Furukawa R, Tanaka K, Inoue J and Fukuda S. Development of bacteria-specific antibody for isolation of target bacteria and functional analysis of antibody-targeted bacterial molecules. Gordon Research Conference on Animal-Microbe Symbioses, Renaissance Tuscany II Ciocco, Lucca, Italy, June 18-23th, 2023.
9. Yang J, Obana N, Nakato G, Nomura N, Tomita M and Fukuda S. An intestinal mucosa-associated bacterium which modulates host health. Gordon Research Conference on Animal-Microbe Symbioses, Renaissance

- Tuscany II Ciocco, Lucca, Italy, June 18-23th, 2023.
10. 楊佳約, 尾花望, 中藤学, 野村暢彦, 富田勝, 福田真嗣 腸管粘膜最近傍に局在する腸内細菌が宿主免疫機能に与える影響、第 96 回日本細菌学会総会、アクリエ姫路(姫路)、2023 年 3 月 17 日
 11. 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 32 回泌尿器科分子・細胞研究会、秋田市にぎわい交流館 AU(秋田)、2023 年 2 月 25 日
 12. 福田真嗣 腸内デザイン:腸内環境に基づく層別化がん治療の可能性、お茶の水がんアカデミア第176回集会、オンライン、2023 年 2 月 22 日
 13. Shinji Fukuda The impact of gut microbiota-derived metabolites on endurance exercise performance、China-Japan Life Science Workshop、オンライン開催、2023 年 1 月 13 日
 14. 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 20 回日本機能性食品医科学会総会、ホテルルビノ京都堀川(京都)、2022 年 12 月 4 日
 15. 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、日本放射線技術学会第 69 回関東支部研究発表大会、つくば国際会議場(筑波)、2022 年 12 月 3 日
 16. 市村涼葉, 田中一己, 清水映輔, 小川葉子, 坪田一男, 福田真嗣 便微生物叢移植および骨髄移植併用による腸内細菌叢定着への影響、第 45 回日本分子生物学会年会、幕張メッセ(千葉)、ハイブリット開催、2022 年 11 月 30 日
 17. 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 9 回食品薬学シンポジウム、富山県パレプラン高志会館カルチャーホール(富山)、ハイブリット開催、2022 年 10 月 15 日
 18. 中藤学 研究者としての視座を高める海外留学のススメ、第 46 回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム(若手企画シンポジウム)、東京大学(東京)、2022 年 10 月 28 日
 19. 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 165 回日本獣医学会学術集会、麻布大学(東京)、ハイブリット開催、2022 年 9 月 6 日
 20. 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、日本ペット栄養学会第 23 回定例大会、東京農工大学府中キャンパス(東京)、ハイブリット開催、2022 年 7 月 24 日
 21. 福田真嗣 ウィルス感染と腸内細菌、第 8 回がん代謝研究会、あいぽーと佐渡(新潟県)、2022 年 7 月 22 日
 22. 福田真嗣 腸内細菌叢を活用した新たな医療・ヘルスケア産業の創出、日本微生物資源学会第 28 回大会、東京理科大学野田キャンパス(千葉)ハイブリット開催、2022 年 7 月 1 日
 23. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療がもたらす未来、第 37 回日本臨床栄養代謝学会学術集会、パシフィコ横浜(神奈川)ハイブリット開催、2022 年 5 月 31 日
 24. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療がもたらす未来、日立一高科学講演会、オンライン開催、2022 年 5 月 10 日
 25. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療がもたらす未来、第 122 回日本外科学会定期学術集会、熊本城ホール(熊本)、2022 年 4 月 14 日
 26. 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 5 件
- (2) 国外特許出願 2 件

研 究 報 告

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

ヒトの腸管内に生息する腸内細菌は食物由来の未消化物（食物繊維やオリゴ糖）を異化代謝することで短鎖脂肪酸を産生して増殖し、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腸内細菌も存在しており、それら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ことが知られている。その一方で、生活習慣の乱れやストレスなど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などが疾患の発症に関与することも知られている。したがって、疾患に関連する腸内細菌を標的とした創薬を効率よく開発する為には、標的となる腸内細菌を宿主の腸内細菌叢から効率よく検出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は、食物繊維やオリゴ糖の摂取のみならず、ヨーグルトや乳酸菌発酵飲料などの発酵食品の摂取が一般に浸透している。これらは日常的に取り入れられる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、これらを摂取している間は便から食品に含まれる有用菌が検出されるものの、摂取をやめてしまうと腸管から有用菌は検出されなくなる（参考文献1）。そのため、これらの食品の効果は一時的であることが示唆されている。その一方で、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）。このように有用菌が定着する、もしくはしない人がどのように決定されているかについては現在研究途上となっている。臨床においては、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課題も残る。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標的細菌のみを検出する為のツールの開発が重要となってくる。

(2) 標的腸内細菌由来タンパク質特異的抗体の作製意義

抗体は免疫細胞の一つである形質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細菌に対する市販の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検出するには、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構築のための研究ツールの開発

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確立し、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。実用化実証事業においては疾病の新規診断開発に向け、以下に示す課題に取り組んだ。

- 疾患に関与する腸内細菌に対するタンパク質の検出用抗体の取得とその遺伝子の簡易的検出
- 検出された抗体の機能評価と解析
- 最終クローン抗体の機能評価
- 有用性が高い抗体を産生するハイブリドーマの抗体可変領域解析および精製抗体の作製と標識

2. 実験と結果

(1) 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。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 1A に示すように細菌 X に特異的な反応性を示し、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 1B)。

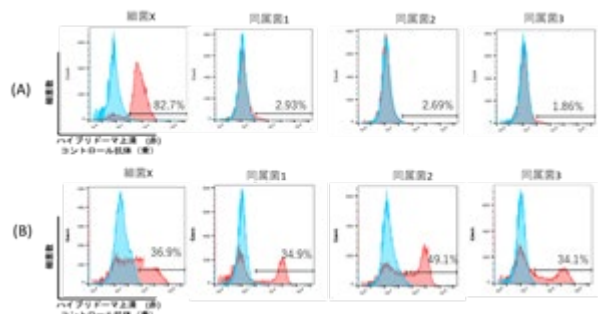


図 1 (A) (B) フローサイトメーターによる抗体と細菌 X および同属菌への結合の検証。赤色は細菌 X に対する抗体、青はアイソタイプコントロール抗体

(2) 細菌 X に対する特異的な抗体の選抜

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。嫌気チャンバー内において本研究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と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 2)。

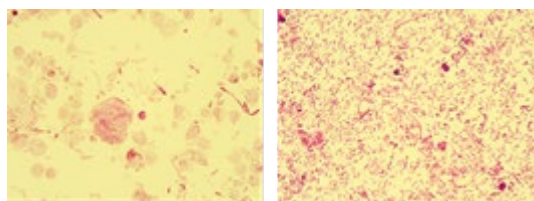


図 2 ヒト便試料より単離した X 属細菌のグラム染色像

(3) タンパク X に対する特異的な抗体の選抜

血清中の細菌由来タンパク (以下タンパク X と仮称) に対する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。はじめに、タンパク X に対する特異性を検証するために、タンパク X を発現する細菌に対する反応性の検証をフローサイトメーターと ELISA で行なった (図 3、図 4)。図 3(A)と図 4 で示すようにタンパク X に特異的に結合する抗体を選抜した。

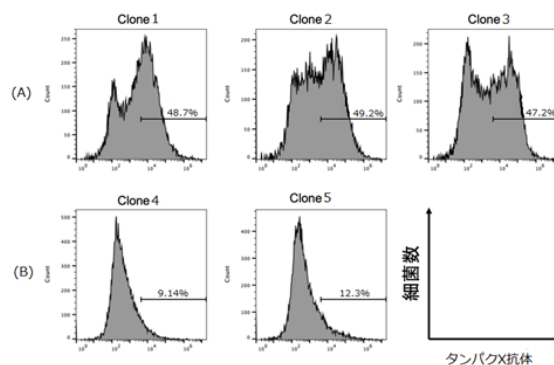


図 3 フローサイトメーターによる抗体とタンパク X 発現細菌への結合の検証 (一部)。 (A) は陽性反応クローン、 (B) は陰性反応クローンをそれぞれ示す

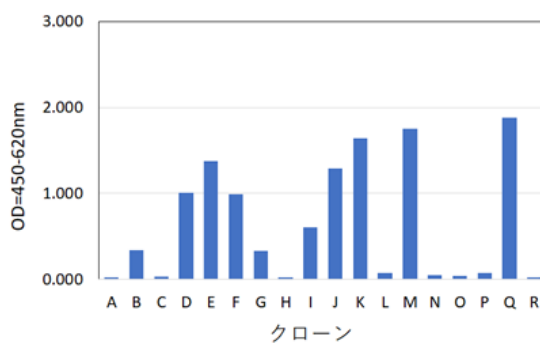


図 4 ELISA による抗体とタンパク X 発現細菌への結合の検証 (一部)

(4) タンパク X を発現する腸内細菌を含んだヒト便試料からのタンパク X 遺伝子検出の検討

抗体の作製と並行して、タンパク X を簡易的に検出するための方法の構築を試みた。実際に便懸濁液を DNA テンプレートとして使用した際に PCR で検出できるかどうかの検討を行なった。健康者便懸濁液にタンパク X を発現する細菌を 3 段階の濃度 (0.1, 1, 10%) で添加し、3 つの処理を行った懸濁液を調製した。各処理が完了した懸濁液をテンプレートとし、PCR を行い各試料における反応性の検討を行なった (図 5)。その結果、便懸濁液をテンプレートとして使用しても PCR 反応を阻害しないこと、また便中に 1% のタンパク X 発現細菌が含まれていればタンパク X 特異的プライマーにて検出できることを明らかにした。

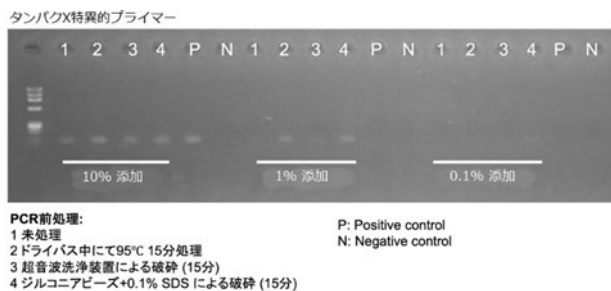
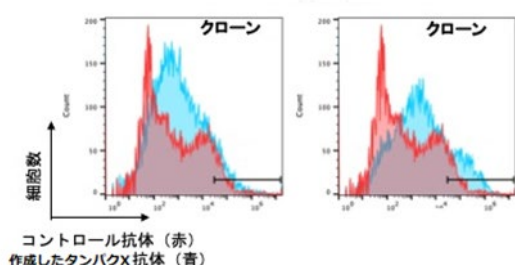


図5 タンパク X 発現細菌を添加した便懸濁液からのタンパク X 遺伝子の検出。タンパク X 発現細菌を含んだ便懸濁液を事前処理した後に、タンパク X 特異的プライマーにて PCR 増幅した後に PCR 産物をアガロースゲル電気泳動した結果

(5) 特定疾患関連細菌検出に向けたタンパク X 標的抗体の機能評価

FACS による抗タンパク X 抗体と特定疾患関連細菌の交差反応の検討

作製した特定疾患時に増加が認められる細菌由来タンパクに対する抗体の最終クローンの評価を実施した。はじめに口腔由来細菌基準株 8 種、単離株 2 種ならびに非口腔由来細菌 4 種に対して抗体が交差反応を示すかフローサイトメーターにより検討した。その結果 2 つのクローンにおいて 2 種の細菌に対する交差反応が認められたが、その他の細菌に対して交差反応は認められなかった (図 6、表 1)。



基準株	A	B	C	D	E	F	G
クローン							
1	×	×	×	×	×	×	×
2	×	×	×	×	×	×	×
3	×	△(10.0%)	×	×	×	×	×
4	×	×	×	×	×	×	×
5	×	×	△(5.61%)	×	×	×	×
6	×	×	×	×	×	×	×
7	×	○(18.9%)	○(10.7%)	×	×	×	×

分離株	H	I	J	K
クローン				
1	×	×	×	×
2	×	×	×	×
3	×	×	×	×
4	×	×	×	×
5	×	×	×	×
6	×	×	×	×
7	×	×	×	×

図 6 (上)、表 1 (下) FACS による抗タンパク X 抗体と特定疾患関連細菌の交差反応の検討

(6) ELISA による抗タンパク X 抗体と特定疾患関連細菌由来タンパク質との交差反応の検討

特定疾患関連細菌の破砕分画、膜分画を用いた ELISA による交差反応の検討を実施した。すべてのクローンにおいて免疫抗原であるタンパク X に対する高い交差反応があり、ネガティブコントロールタンパク質である複数種の非口腔由来細菌タンパク質混合液への交差性はなかった一方で、FACS の結果とは異なり、口腔由来細菌由来タンパク質に対する交差反応はクローン 2 を除くすべてのクローンで見られた。中でもクローン 1、3、4、5 は特定疾患由来細菌由来タンパク質を含むすべての口腔由来細菌に対して交差反応を示した (表 2)。

タンパク質	A	B	C	D	E	F	G
クローン							
1	○	×	○	○	○	○	△(0.825)
2	○	×	△(0.438)	△(0.484)	△(0.484)	○	×
3	○	×	×	○	○	○	△(0.974)
4	○	×	○	○	○	○	○
5	○	×	○	△(0.889)	○	○	○
6	○	×	×	×	×	×	×
7	○	×	○	△(0.425)	○	×	△(0.777)

表 2 ELISA による抗タンパク X 抗体と特定疾患関連細菌由来タンパク質との交差反応の検討

(2-7)抗タンパク X 抗体を用いた ELISA による特定疾患関連細菌培養上清に含まれるタンパク X の検出

タンパク X は細菌の表層に発現するだけでなく、細菌外へ分泌されている。そこで特定疾患関連細菌の培養上清に含まれるタンパク X が作製した抗体により検出できるかどうかの検討を実施した。疾患関連細菌と疾患患者由来細菌を用いて検討したところ、培養上清を直接添加した場合でもタンパク X を検出することができた。また、薬剤処理による濃縮を実施することで検出感度を向上させることができた (図 7)。

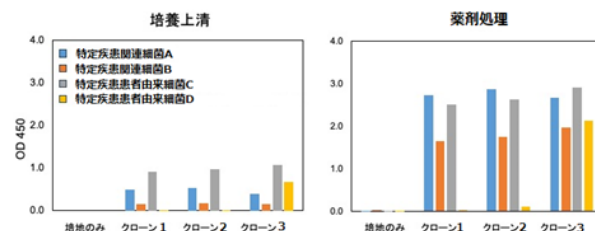


図 7 特定疾患関連細菌培養上清に含まれるタンパク X の検出結果

口腔由来および非口腔由来特定疾患関連細菌に対する交差反応の検討を行なった。その結果、クローン 3 はすべての口腔由来特定疾患関連細菌由来の培養上清に含まれるタンパク質 X を検出することができ、実用化へ有用なクローンであることが見出された。また、クローン 1 と 2 についても全てではないものの、ほとんどの口腔由来特定疾患関連細菌由来の培養上清からタンパク X

を検出することができた。一方で、クローン4は交差反応性が低かった（表3）。

細菌	クローン			
	1	2	3	4
1	○	○	○	×
2	○	○	○	△
3	○	○	○	×
4	○	○	○	×
5	○	○	○	○
6	×	×	○	○
7	○	○	○	△
8	×	×	○	×
9	○	○	○	×
10	○	○	○	△
11	○	○	○	○
12	×	×	○	×
13	×	×	×	×
14	×	×	×	×
15	×	×	×	×
16	×	×	×	×

○: OD>2.0, ○: OD=1.0-2.0, △: OD=0.1-1.0, ×: OD<0.1
緑: 非口腔由来特定疾患関連細菌

表3 抗タンパクX抗体を用いたELISAによる細菌培養上清に含まれるタンパクXの検出結果

(8) 抗タンパクX抗体を用いたELISAによる便懸濁液に含まれるタンパクXの検出

得られた抗体を用いてヒト便懸濁液からタンパクXが検出できるかどうか検討した。健常者と特定疾患患者由来の便から便懸濁液を調製し、便懸濁液と便懸濁液にタンパクXを添加したサンプルを用いてELISAによる検出を行った。その結果、タンパクXを添加した便懸濁液からはタンパクXを検出することができた。一方で、未添加の便懸濁液からは健常者ならびに特定疾患患者のどちらからもタンパクXが検出されなかった（図8）。

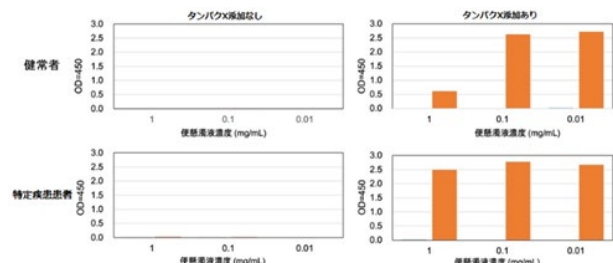


図8 抗タンパクX抗体を用いたELISAによる便懸濁液に含まれるタンパクXの検出結果

(9) 抗タンパクX抗体によるウェスタンブロットによるタンパクXの検出

ELISAによる検出において特定疾患患者由来の便からタンパクXが検出できなかった要因の一つとして、タンパクX自体が便中に含まれる何らかの因子によりマスクされており、抗体による検出ができなくなっている可能性が示唆された。そこで、ウェスタンブロット法による検出法の構築を行った。はじめに、タンパクXがどのくらいの濃度まで検出できるかの検討を行い、0.8 ngまで検出できることを見出した。また、特定疾患関連細菌の細菌破砕溶液を用いて同様の検討を行った。その結果、タンパクXを持つ細菌破砕溶液では0.1 μgまで検出可能であった（図9,A）。一方で、非口腔由来特定疾患関連細菌

菌である細菌破砕溶液からはシグナルが検出されなかった（図9,B）。

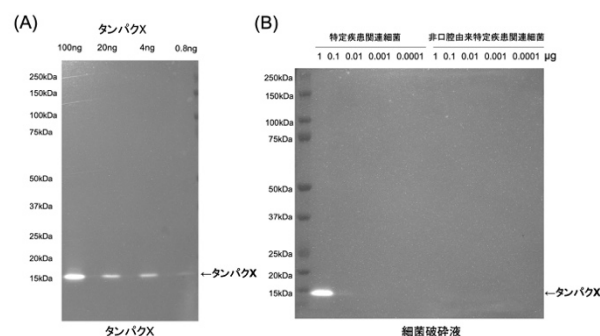


図9 抗タンパクX抗体によるウェスタンブロットによるタンパクXの検出 (A)タンパクX組み換えタンパク質の検出限界の検討 (B)特定疾患関連細菌破砕溶液からのタンパクXの検出結果

(10)直接ELISA法によるタンパクXの検出

特定疾患診断法に応用できる可能性のある2つのクローンについて腹水から抗体を精製した。ハイブリドーマ細胞をマウスに投与し、得られた腹水から抗体精製を行い、細菌由来タンパク質に対する抗タンパクX抗体を2つ取得した。抗体の一部はELISAでのタンパクXの検出に向けて昨年度取得したタンパクXとともにHRP標識キットによるラベル化を行った。次にこれらの標識抗体を用いてタンパクXを直接ELISA法にて検出できるか検討を行った（図10A）。作成したすべてのHRP抗タンパクX抗体を用いるとタンパクXを定量できた（図10B）。

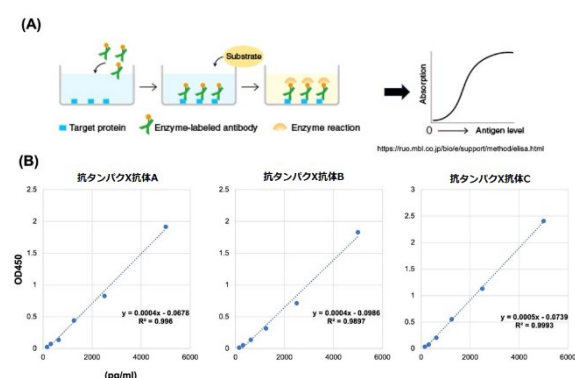


図10 直接ELISA法によるタンパクXの検出

(A)直接ELISA法の概要

(B)HRP標識抗タンパクX抗体によるタンパクXの検出

(11) 抗タンパク X 抗体を用いた ELISA による便懸濁液からのタンパク X の検出

作成した抗体を用いて特定疾患由来便懸濁液に添加したタンパク X を検出できるか検討した。便懸濁液にタンパク X を添加し、各種抗体で検出した結果、便に添加したタンパク X を検出することができた (図 11)。

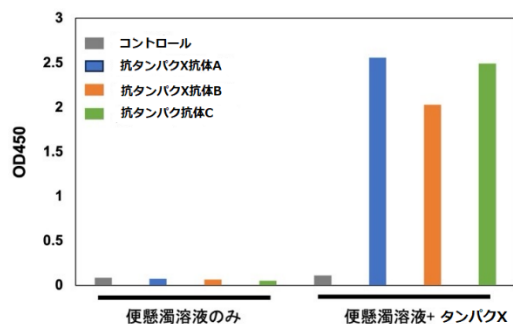


図 11 抗タンパク X 抗体を用いた ELISA 法による便懸濁液からのタンパク X の検出結果

(12) 抗タンパク X 抗体の抗体可変領域配列の解析

クローン A,B 由来の抗タンパク X 抗体が新規特定疾患検出法の開発に有用であることが明らかとなったため、将来的な応用に向け、抗体可変領域解析を行い、抗体分子の可変領域で抗原と直接接触する領域である相補性決定領域 (Complementarity Determining Region: CDR) の配列を決定した。その結果、クローン A については CDR 配列を決定することはできたが、クローン B については VL 可変領域の配列は解析できたものの VH 可変領域は配列解析できなかった。

3. 考察

本プロジェクトでは、腸内環境制御基盤技術の構築に向けた研究ツールの一つとして、腸内細菌特異的抗体および腸内細菌由来タンパク X に対する抗体の作製と高度化を進めてきた。独自の抗体作製法を用いることで、標的細菌および特定疾患時に増加が認められる細菌由来タンパク X を高い特異性で認識する抗体の取得に成功し、本手法が特異性の高い抗体開発に有効であることを示した。また、タンパク X が単一の菌種に限らず同属細菌にも発現している点に着目し、用途に応じて菌種特異的認識および属レベル認識の双方に対応可能な抗体群の選抜と整備を進めた。これにより、解析用途から診断応用まで、目的に応じた抗体の使い分けが可能な基盤を構築した。

さらに、抗体と PCR を組み合わせたタンパク X 検出による新規特定疾患診断法の開発に着手し、ELISA およびウェスタンブロットを用いた便懸濁液からのタンパク X 検出法、ならびに PCR による口腔内由来細菌と非口腔内由来細菌の判別法の構築を進めた。あわせて、有用性の高いハイブリドーマについては抗体可変領域配列解析および腹水化による抗体取得を実施し、実用化に向けた抗体資源の整備を行った。また、診断および機能評価に

必要な特定疾患関連細菌の単離および安定培養法の確立を進め、評価系の再現性と信頼性の向上を図った。これらの成果を踏まえ、抗体および PCR を組み合わせたタンパク X 検出系について知的財産権の申請を行い、社会実装に向けた基盤整備を進めている。

本取り組みにより、腸内細菌および細菌由来タンパクを標的とした高特異性抗体の開発から診断応用、知財化に至る一連の基盤技術が確立され、腸内環境制御を基盤とした疾患診断ならびに創薬・機能性食品開発への展開が可能となった。

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。

【参考文献】

- 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).
- 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).
- 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).
- 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).

腸内環境制御に向けた基盤技術の構築と応用可能性の探究

中藤学、大縄悟志、井上浄

1. はじめに

ヒトを含む哺乳類は、生後まもなく外部環境に曝露されることにより、微生物との共生関係を構築し始める。消化管内もその例外ではなく、体内にありながら外界と接する特性を持つ。ヒトの腸管には約 1000 種類、総数約 38 兆個の腸内細菌が存在し、その生息密度は極めて高く、地球上の環境の中でも最も高密度な微生物生息地の一つとされる（参考文献 1）。腸内細菌は相互作用を通じてバランスを保ちながら共存しており、この微生物集団は腸内細菌叢と呼ばれる。特に乳幼児期には食生活の変化に伴い腸内細菌叢の構成が大きく変動するが、成人以降は日々の食事や生活習慣に影響されつつも、比較的安定した状態が保たれるようになる（参考文献 2）。

（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する腸内細菌叢は、宿主に対してさまざまな有益な効果をもたらすことが知られている。ヒトは呼吸や飲食を通じて常に外来抗原の侵入リスクにさらされているが、腸内細菌叢はこれらの外来抗原の腸管内への定着や体内への侵入を防ぐ役割を担っている。また、腸内細菌は食物由来の未消化成分を栄養源として発酵分解し、その過程で代謝物質を産生・分泌する。これらの代謝物質は、腸管上皮細胞のエネルギー源となるだけでなく、上皮細胞間の結合強化や腸管バリア機能の維持にも寄与することが示されている（参考文献 3）。一部の腸内細菌由来代謝物質は、宿主の免疫機能にも影響を及ぼす。例えば、腸内細菌叢を構成する主要な細菌群であるクロストリジウム目細菌群は、食物繊維を代謝して酪酸を産生する。この酪酸は、過剰な免疫応答を抑制する制御性 T 細胞

（Treg）の分化誘導を促進することが報告されている（参考文献 4,5）。また、ビフィズス菌が産生する酢酸は腸管バリア機能を強化し、腸管感染症の予防に寄与する。さらに、酢酸により誘導された免疫グロブリン A（IgA）は、病原性片利共生細菌に結合することで、大腸表面の粘液層への侵入を阻止することも明らかとなっている（参考文献 6,7）。

一方で、ストレスや生活習慣の乱れによって腸内細菌叢の構成バランスが崩れる状態（ディスバイオーシス）が生じ、この状態がさまざまな疾患の発症に関与することが明らかとなっている。実際に、ディスバイオーシスは大腸がんや炎症性腸疾患などの消化器疾患に加え、糖尿病、動脈硬化、自閉スペクトラム症、アレルギー疾患など多様な疾患と関連することが報告されている（参考文献 8）。さらに、ディスバイオーシス時には腸内細菌叢由来の代謝物質

の質や量にも変化が生じ、それ自体が病態形成に寄与する要因となる可能性がある。このような背景から、腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に維持することは、疾患の予防および健康の維持において極めて重要であると考えられる。

（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およびその経時的変化については、多くの知見が得られている。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役割を果たしており、さまざまな疾患との関連も明らかになりつつある。したがって、個々の腸内細菌の特性や、それらが産生する代謝物質を理解することは、健康の維持および疾患の予防において重要である。メタボローム解析の進展により、疾患時などに变化する代謝物質の同定は進んでいるものの、それらの代謝物質が腸内細菌叢のどの菌種に由来するかについては、未解明な点が多い。個々の腸内細菌に関する研究報告が限られている主な要因としては、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。腸内細菌の多くは偏性嫌気性菌であり、わずかな酸素の混入によっても生育が著しく阻害される。そのため、脱酸素剤を用いた簡易的な嫌気環境の構築や、嫌気グローブボックスを用いた培養法の開発が進められているが、それでもなお、単離・培養が困難な菌種が多数存在しているのが現状である。

（3）腸内環境制御基盤技術の構築および利用法の検討

腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に制御するための基盤技術の構築は、健康の維持や疾患予防における有効な手段として注目されている。このような基盤技術を確立するためには、以下の課題に体系的に取り組む必要がある。すなわち、「腸内細菌の安定培養法の確立と有用菌の単離」「難培養性腸内細菌の培養技術の検討」、「個々の腸内細菌の特性解明と宿主への影響評価」、「腸内環境制御基盤ツールの開発およびその評価」である。これらの課題に対して、培養条件の最適化や疾患モデルを用いた機能解析、様々な腸内細菌や腸内細菌由来タンパク質に対する抗体の作製を進めてきた。これらに加えて、腸内環境制御による疾患制御モデルの検討として、食品成分を用いた検討を行った。本研究から得られる成果は、腸内環境制御基盤技術に結びつく創薬、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期待されている。

2. 実験と結果

(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は腸内細菌を安定的に培養することが必要となる。そこで、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、日水製薬株式会社) 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が可能であることを見出した (図 1)。

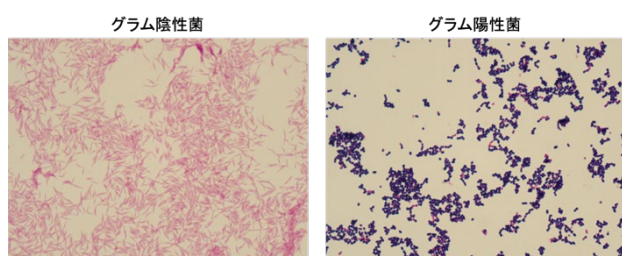


図 1 安定培養法を確立した腸内細菌基準株グラム染色像

(2) ヒト由来腸内細菌の単離・培養技術の確立

これまでに蓄積してきた嫌気培養技術と腸内細菌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ならびにその安定培養方法を確立した。

標的となる腸内細菌が多く含まれる便懸濁溶液を血液寒天培地に播種し、嫌気環境下においてコロニーを形成させた。24-48 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釣菌し、液体 GAM 培地に植菌、PCR により標的細菌であるかどうか検討した。選択された標的細菌コロニーを再度、血液寒天培地、液体 GAM 培地にて嫌気環境下で培養した。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ケンス解析を実施し、菌種の同定を行った。その結果、R3 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)。また R4-R5 年度にかけては、疾患に関連する 3 種類、計 19 菌株のグラム陰性菌の単離・培養に成功した (図 3、4)。

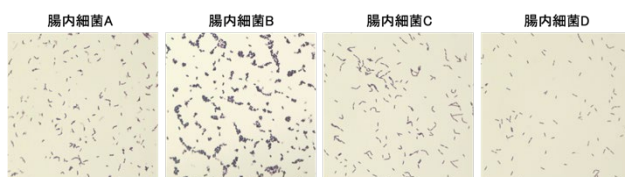


図 2 R3 年度にヒト便試料より単離した腸内細菌のグラム染色画像

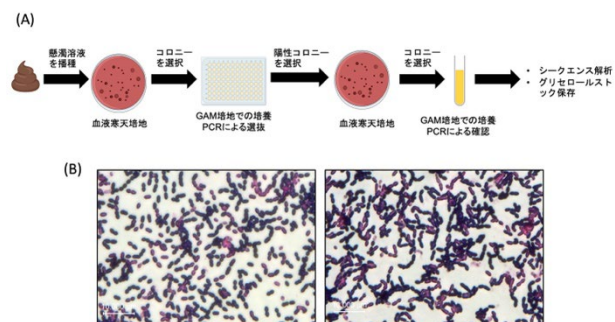


図 3 R4 年度にヒト便試料より単離した疾患との関連が示唆される腸内細菌の単離方法 (A) とグラム染色画像 (B)

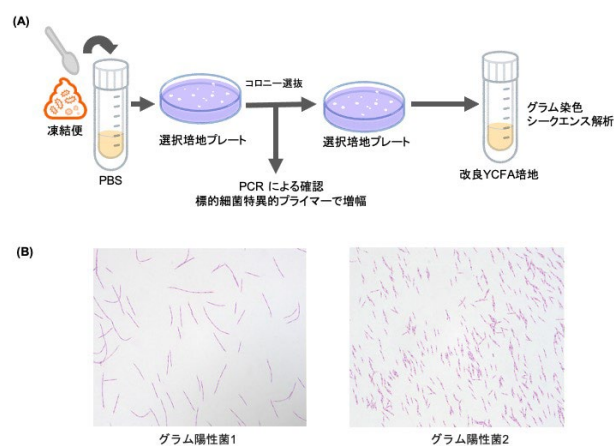


図 4 R5 年度にヒト便試料より単離した疾患との関連が示唆される腸内細菌の単離方法 (A) とグラム染色画像 (B)

(3) 新たな腸内細菌培養方法の検討

腸内細菌は宿主の消化管内に限られた生存領域を確保しており、宿主由来の代謝物質の利用も消化管内への定着に重要な役割を果たしていることが示唆され、宿主—微生物共生系を検討することは腸内細菌の特性を理解する上で重要となる。そこで本年度はこれまで培ってきた腸内細菌培養技術と腸管上皮培養細胞を組み合わせることで、宿主—微生物共生系の検討を実施した。細胞培養用のトランズウェル上に腸管上皮細胞培養株を播種し 3-4 週間ほど細胞培養用培地にて培養を行い、極性を形成させた。次に図 5A に示すように、トランズウェル下部には細胞培養用培地、上部には細菌培養用培地ならびに腸内細菌を添加し、嫌気環境下で 48-72 時間、37℃にて共培養を行った。共培養後にトランズウェル内培地を回収し、グラム染色を行った。いくつかの腸内細菌について本培養方法を用いて共培養したところ、共培養あり、なしにおいて腸内細菌の形状に変化はなかったが、興味深いことに一部の細菌は腸管上皮細胞培養株と共培養すると形状が変化することが明らかとなった (図 5B)。

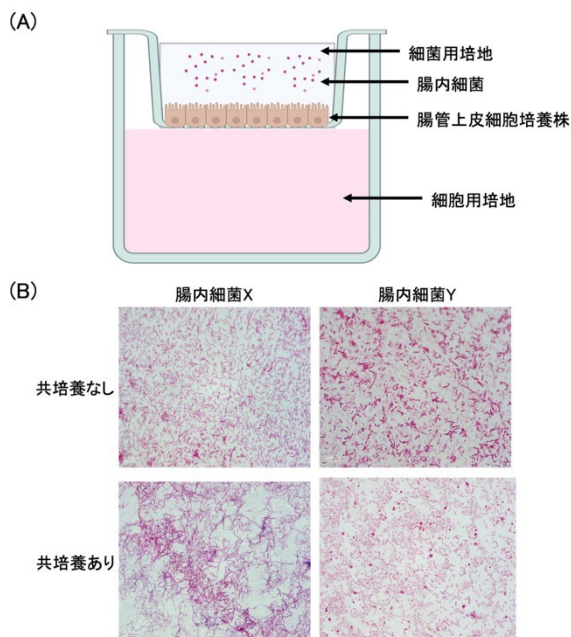


図5 腸内細菌と腸管上皮細胞培養株の共培養の検討
(A) 共培養の概略図、Biorender を用いて作成 (B) 共培養後の腸内細菌のグラム染色画像、腸内細菌 X および Y は共培養後に細菌の形状が変化した

(4) 腸内細菌特異的抗体の有用性の検討

これまでに本プロジェクトの先行研究において、作製した腸内細菌特異的抗体を使用することで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こり、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 6)。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 6)。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、次世代シーケンサー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 7)。最後に標的細菌を含むヒト腸内細菌叢より、抗体により標的細菌を分離濃縮できるかどうかを検討した (図 8)。標的細菌を含む腸内細菌叢を調製し、抗体-磁気ビーズ (MojoSort) を用いて、標的分画を分取し、標的細菌を分取、再培養できるかどうかの検討を行った。MojoSort により得られた標的細菌を含む分画を寒天プレートに播種し、コロニーを形成させた。標的細菌特異的プライマーおよび属特異的プライマーを用いた PCR により、新たに標的細菌を 3 株単離することに成功した (図 9A)。次に、単離されたそれぞれの株を液体培地にて培養を行った。その結果、それぞれの株は再培養可能であり、標的細菌と同様の形状ならびに増殖能を有していた (図 9B および C)。

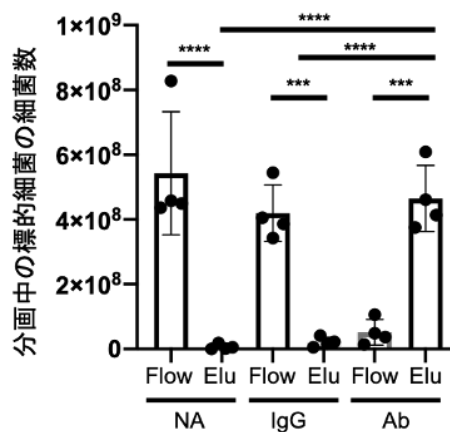


図6 標的細菌を添加した腸内細菌混合液からの標的細菌の分離

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 *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

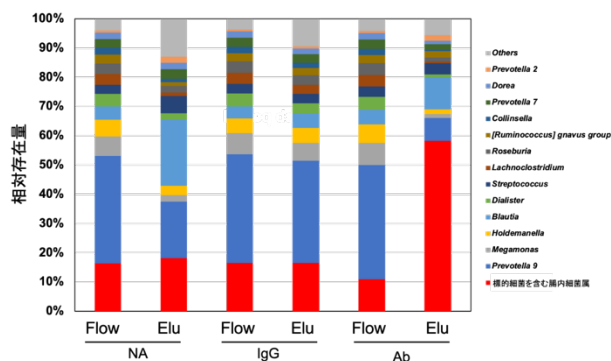


図7 標的細菌を添加したヒト腸内細菌叢混合液からの標的細菌の分離

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。

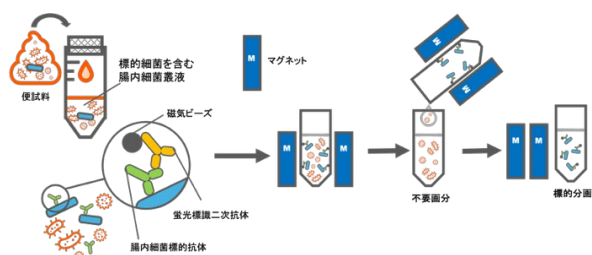


図 8 抗体を用いた腸内細菌叢からの標的細菌分離手法

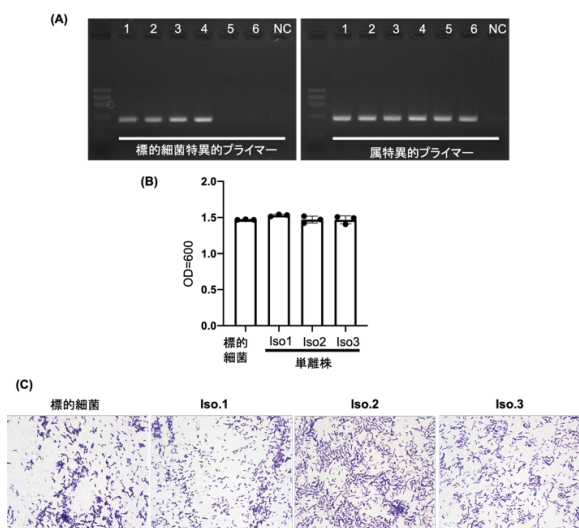


図 9 腸内細菌標的抗体を用いた腸内細菌叢からの標的細菌の単離ならびに再培養の検討

(5) 腸内細菌特異的抗体の標的分子の同定

作製した腸内細菌特異的抗体は標的腸内細菌を含む腸内細菌混合液から標的となる腸内細菌を分離濃縮するための有効なツールとなりうる可能性を示してきた。そこで、次に抗体の機能解析として抗体の標的分子の検討を行った。抗体が認識する抗原分子を同定するため、標的となる抗原を標的腸内細菌の細胞壁分画溶液から免疫沈降法により濃縮した(図 10、A)。はじめに、Protein A ビーズ、アイソタイプコントロール抗体、抗体 A を使用し、標的分子の濃縮を検討した。その結果、抗体 A を使用すると 55kDa 付近に標的分子のシグナルが検出された。一方でアイソタイプコントロール抗体においてはそのシグナルが検出されなかった(図 10、B)。抗体 A を用いると銀染色においても同様の位置にバンドを確認することができた(図 10、C)。次に銀染色ゲルから標的分画を含むゲルを切り出し、質量分析計により標的タンパク質の同定を行った。その結果、細菌間においても広く保存されている細胞内酵素(酵素 X)が抗体の標的分子であることが明らかとなった。また、抗体の標的が酵素 X であるかどうか検討するために、酵素 X を欠損する大腸菌株を用いて検討を行った。その結果、酵素 X を欠損する大腸菌ではバンドはなく、抗体 A の標的は酵素 X であることが確かめられた(図 10、D)。

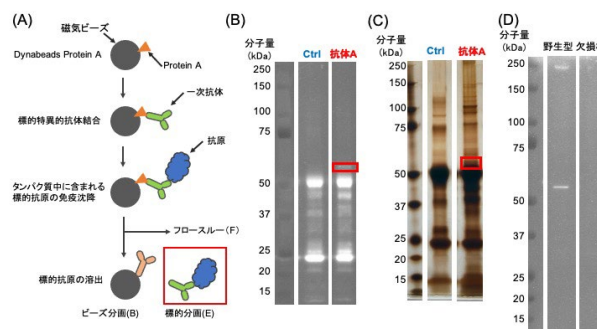


図 10 抗体の標的分子の検討

(A) 免疫沈降法の概略 (B) アイソタイプコントロール抗体 (Ctrl) と抗体による免疫沈降後のウェスタンブロット、図の赤枠は標的分子を示す (C) 免疫沈降後の銀染色ゲル、赤枠で示される標的部分を切り出した。(D) 抗体を用いたウェスタンブロットによる酵素 X の検出、欠損株は酵素 X を欠損する大腸菌を示す

(6) 腸内細菌の特性の解明

項目 (5) 記載したように抗体 A の標的分子である酵素 X は通常細胞内に発現する分子であった。しかしながら、昨年度までの研究から抗体を作製した際に用いたヒト由来腸内細菌(細菌 A)では本酵素を表層に発現することが示される結果が得られている。そこで免疫組織染色を行い蛍光顕微鏡にて観察し、局在の検討を行った。その結果、腸内細菌 A では酵素 X が細菌表層に強く発現していることが明らかとなった。一方で、腸内細菌 A の基準株である腸内細菌 B においては細胞表層での発現は見られなかった(図 11、A)。腸内細菌 A は表層において酵素 X を強く発現していたことから、最後に酵素 X が菌体外へと放出されるかどうかを検討した。腸内細菌 A および腸内細菌 B を液体培地にて 24 時間培養し、細菌培養上清をもちいてウェスタンブロット解析を行った。その結果、腸内細菌 A では酵素 X が細胞外へと放出されていたが、一方で腸内細菌 B では放出されないことが明らかとなった。(図 11、B)。

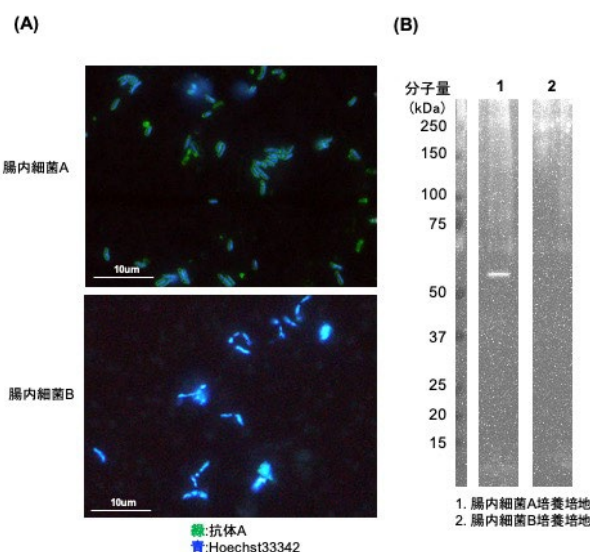


図 11 腸内細菌 A における酵素 X の発現

(A) 抗体 A による免疫組織染色画像。緑は抗体 A、青はヘキスト 33258 による細菌を示す。(B) 腸内細菌培養上清中に含まれる酵素 X をウェスタンブロットにより検討したもの

(7) 宿主への影響の評価

ヒト由来腸内細菌 A は同細菌の基準株である腸内細菌 B とは異なる表層構造をもつ可能性が示唆された。そこで、この分子の発現様式の違いが宿主へどのような影響を与えるかの検討を行った。

はじめに宿主へ与える影響を評価するために無菌マウス、単独腸内細菌定着マウスの構築を行なった。無菌マウスに腸内細菌 A 及び基準株 (腸内細菌 B) を投与して定着させ 4 週間維持した後、腸管組織、血液、盲腸内容物ならびに便を採取した。便中の IgA を測定したところ、腸内細菌 A と基準株を定着させた単独腸内細菌定着マウスにおいて有意な差はなかった。

次に宿主への影響の評価の一つとして、腸管への定着について検討するために、腸内細菌 A と基準株の競合試験を実施した。競合試験では共投与したどちらの腸内細菌が定着したかを判断する必要がある。これまでに構築した腸内細菌特異的抗体を用い検討することも可能ではあったが、菌数測定にて正確に定量するために腸内細菌 A と基準株のゲノム情報を比較し、それぞれに特徴的な配列部分を見出すことで、それぞれの腸内細菌を検出可能な特異的プライマーを設計した。それぞれの細菌から DNA を抽出し、作成したプライマーにて PCR を行なった。その結果、設計したプライマーはそれぞれ標的となる腸内細菌を判別するために使用できることが明らかとなった (図 12)。次に、腸内細菌 A と基準株を無菌マウスに共投与し、腸管内での定着を比較した (図 13、A)。作成した菌特異的プライマーを用いて定量 PCR を行なったところ、腸内細菌 A はマウスの腸内において基準株よりも優勢になることが明らかとなった (図 13、B)。

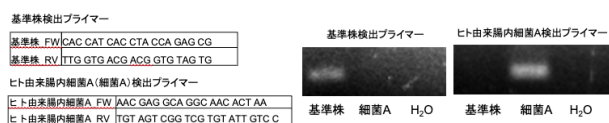


図 12 競合定着試験に向けた腸内細菌検出用プライマーの検討

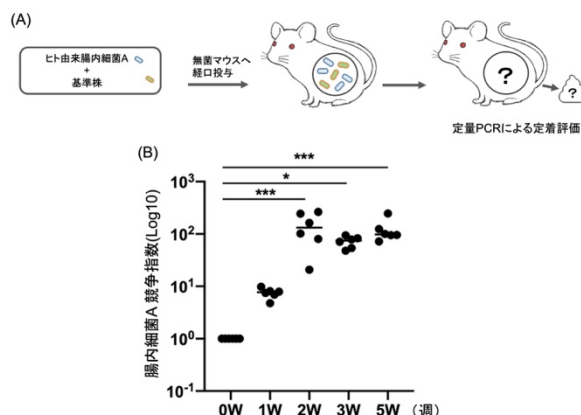


図 13 競合試験による腸内定着の評価

(A) 競合定着試験の概要 (B) 腸内細菌 A と基準株の競合定着試験の結果。log10 競合指数 (腸内細菌 A DNA 量 ÷ 基準株 DNA 量) を示す。*p < 0.05 ***p < 0.001

(8) 腸内環境制御による疾患予防法の検討

背景の項にて記載したようにディスバイオーシスは疾患と深い関連性があり、腸内環境を改善することが疾患の治療につながる可能性がある。近年、健康から疾患に至る間の状態として「未病」という状態が着目されるようになってきている。そこで、腸内環境制御により腸内環境を整えることで未病を改善できるかどうかを検討した。本研究では脳梗塞や認知症の未病状態の一つとして考えられる高血圧に着目した。これまで蓄積した解析データや過去の論文報告より食品成分の継続的な摂取により、腸内環境を改善または維持することは、高血圧をはじめとする代謝性疾患を改善するための有効な手法の一つであることが示唆された。そこで、実際に食品成分摂取による腸内環境の改善により高血圧を改善できるかどうかの検討を行った。

高血圧疾患モデル動物 (Spontaneously Hypertensive Rat: SHR) に様々なプレバイオティクスとして使用されている食品成分を自由飲水投与させ、経時的に収縮期血圧の測定、便、組織検体採取を行った (図 14)。

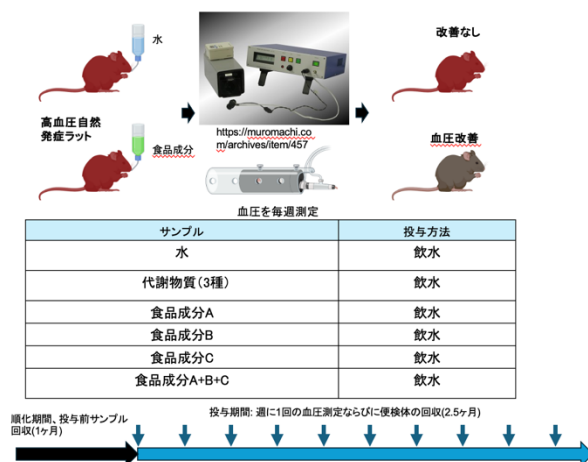


図 14 食品成分摂取による血圧改善効果の実験概要

収縮期血圧を経時的に測定した結果、ネガティブコントロールである水を摂取した群と比較したところ、5週目で食品成分B投与群、そして6週目で食品成分C投与群において有意に高血圧抑制効果があった。9週目では有意差はないものの、食品成分B投与群、食品成分C投与群、食品成分A+B+C投与群は高血圧抑制の傾向がみられた(図15)。それぞれの群ごとの血圧上昇を検証したところ、水は2週目以降に収縮期血圧が有意に上昇し、他の群よりも早い上昇率であった。また、収縮期血圧が有意に上昇する時期は、代謝物質(3種)を投与した群では他の群に比べて遅く、食品成分C投与群以外の食品成分摂取群では収縮期血圧の有意な上昇は水よりも遅く、血圧上昇抑制効果があることが示唆された。

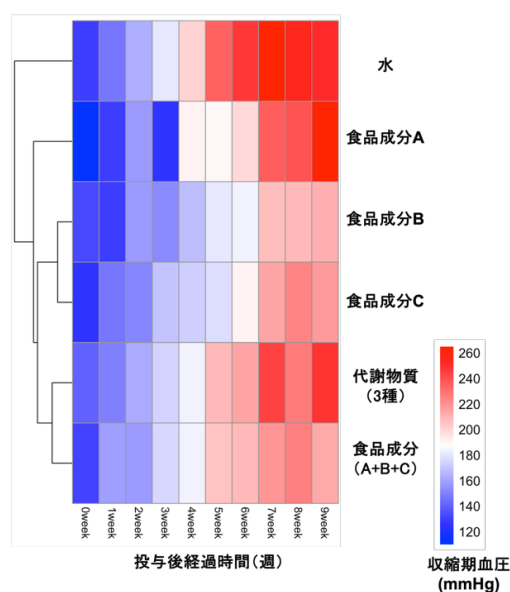


図15 食品成分摂取による高血圧症状改善の検討
水、代謝物質、食品成分を継続摂取した際の収縮期血圧の週ごとの変化を示したヒートマップ

3. 考察及び今後の展望

本プロジェクトでは、嫌気培養技術を工夫することで、多数の腸内細菌基準株およびヒト便由来腸内細菌の単離・安定培養法の確立に成功した。累計で70種を超える基準株の培養条件を整備するとともに、疾患との関連が示唆される複数の腸内細菌を新たに単離した。これらの成果は、腸内細菌の機能や宿主への影響を理解するための重要な研究基盤となっている。さらに、腸管上皮細胞培養株と腸内細菌の共培養系を構築し、宿主由来因子が腸内細菌の形態や性質に影響を及ぼす可能性を明らかにした。本手法は、単独培養では再現が困難な宿主-微生物共生状態に近い環境を実験的に再現できる方法として、腸内細菌の特性解明や宿主との相互作用の理解に有用であると考えられる。一方で、一部の菌株については増殖に必要な因子が十分でない可能性も示唆されており、今後は培地組成の改良や新たな培養手法の導入により、培養条件のさらなる最適化を進める。

腸内細菌特異的抗体を用いた研究では、標的細菌を混合環境から選択的に分離・濃縮する技術の高度化を進めた。腸内細菌叢から抗体を用いて目的菌を直接分離し、新たな菌株の単離および再培養に成功したことから、抗体を活用した選択的分離・培養技術が、腸内細菌研究における実用的なツールとして有効であることが示された。一方で、標的分画中に標的以外の細菌が混在する課題も残されており、抗体と細菌との非特異的反応を抑制する条件の検討など、分離精度のさらなる向上が今後の重要な課題である。

また、抗体の機能解析として、抗体の標的分子が細胞内酵素Xであることを同定した。特定の腸内細菌では、本酵素が細胞表層に発現し、さらに細胞外へ放出されるという特徴的な性質を示すことを明らかにした。宿主への影響評価として、無菌マウスおよび単独腸内細菌定着マウスを用いた解析を進め、特定の腸内細菌と基準株との競合定着試験により、腸内環境における定着能の違いを確認したが、その分子機構については未解明な点が残されている。今後は、全ゲノム解析や代謝物解析を組み合わせ、腸内細菌の構造的・機能的特徴と宿主応答との関連性を多角的に評価するとともに、酵素X欠損株の作製などを通じて、腸管への定着や宿主との相互作用における本酵素の役割の解明を進める。

これらの基礎的な知見は、腸内細菌の働きを分子レベルで理解するだけでなく、腸内環境の制御を通じた健康維持や疾患予防への応用につながる重要な基盤である。この観点から、腸内環境の制御による疾患予防の可能性について検討した結果、食品成分の継続的な摂取が、腸内環境の改善または維持を通じて収縮期血圧の低下に関連する可能性が示された。一方で、その詳細な作用機序については、既報の知見を踏まえても依然として明確ではなく、さらなる解析が必要である。今後は、本研究で得られた試料を用いて、メタゲノム解析およびメタボローム解析などのマルチオミクス手法を導入し、血圧抑制に関与する腸内細菌叢の変化および代謝物質の同定を進める。

今後は、本研究で確立した単離・培養技術および抗体を活用した選択的分離技術を基盤として、マルチオミクス解析を統合的に展開し、腸内細菌叢の変化や代謝物質の動態をより包括的に解明する。これにより、腸内環境の制御を通じた疾患予防および健康維持の分子基盤の確立を目指すとともに、関連研究機関や自治体と連携し、得られた知見のヒトへの応用可能性を検討しながら、腸内環境制御基盤技術の社会実装につなげることを目指す。

4. 謝辞

本実験の遂行にあたり、慶應義塾先端生命科学研究所の楊佳約博士、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。本研究の一部は、JST 戦略的創造研究推進事業、一般財団法人糧食研究会、神奈川県庁の助成金の支援を受けて実施しました。

【参考文献】

- 1 Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* **14**, e1002533 (2016).
- 2 Odamaki, T. *et al.* Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.* 25:16:90, (2016).
- 3 Okada, T., *et al.* Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat. Commun.* 4: 1654, (2013).
- 4[†] Furusawa, Y., [†] Obata, Y., [†]*Fukuda, S. ([†]co-first and *corresponding author), *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504: 446-450, (2013).
- 5 Atarashi, K., *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500: 232-236, (2013).
- 6 Fukuda, S., *et al.* Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469, 543-547 (2011).
- 7 Takeuchi, T. *et al.* Acetate differentially regulates IgA reactivity to commensal bacteria. *Nature* 595, 560-564 (2021).
- 8 Sekirov, I. *et al.* Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* Jul;90(3):859-904. (2010).

