

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. 2024 年度の研究目的

2024 年度は以下の 3 つを重点項目として定めた。

(1) 標的腸内細菌を単離するためのツール開発、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）。一方、消化器関連疾患、代謝疾患、アレルギー疾患などに関与する腸内細菌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一般的である。選択培地や培地に特定の物質を添加することにより、ある程度の選択は可能であるが、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、検出するためのツール開発として疾患関連細菌由来タンパク質を標的とした抗体の開発、これまでに作製した腸内細菌標的抗体の機能評価を行なった。

(2) 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現在も変異を重ねており、オミクロン株に匹敵するような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・増強することがウイルスの脅威から私たちを守るために重要となる。新型コロナ感染症は、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。そこで、本グループは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、株式会社明治による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抗体価社会調査プロジェクト」を進め、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。

(3) 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。今年度は、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. 2024 度の研究成果

2024 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) 標的腸内細菌を単離するためのツール開発、有効性の評価

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ものと考えられる。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。

(2) 新型コロナウイルス抗体価社会調査プロジェクト

本プロジェクトでは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。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。本年度は 94 人分の腸内細菌叢の解析、81 名分の便中に含まれる 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 1)

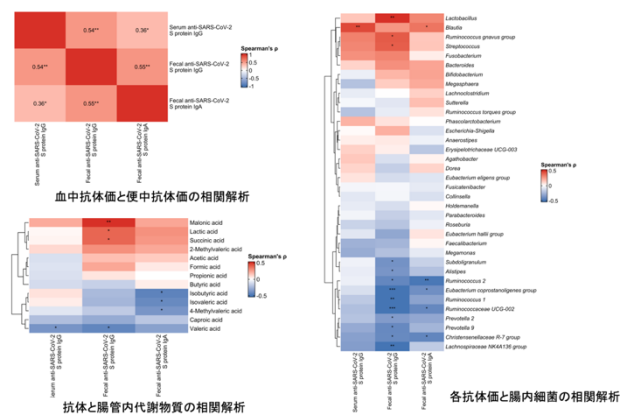


図 1 血中抗体価と腸内環境の関連性

(3) 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と関与しており、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。本年度は、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。

昨年度より、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た。本年度は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ている。今後は、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す。

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でない点が多く、今後の検討課題として残された。今後はマルチオミクス解析で得られたデータを解析し、血圧調節に関与する腸内細菌および代謝物質の同定を進める。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. * 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).

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

腸内環境デザイングループ

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、課題 1:腸内細菌の安定培養法の確立と有用菌の単離、課題 2:個々の腸内細菌の特性解明と宿主への影響評価、課題 3:腸内環境制御基盤ツールの開発およびその評価である。これまでに、課題 1 および 2 に関しては、培養条件の最適化や疾患モデルを用いた機能解析を通じて多くの知見を蓄積してきた。また、課題 3 においても、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。令和 6 年度は、この課題 3 について引き続き検討を進めながら、新たに課題 4 として、食品成分を用いた腸内環境の制御による疾患予防法の検討に着手した。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

本年度は腸内環境制御基盤ツールの評価ならびに食品成分を用いた腸内環境制御による疾患予防法の検討を行った。

(1) 腸内細菌標的抗体の機能評価

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、標的細菌を人為的に添加した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きた。本年度は、標的細菌を含む腸内細菌叢より、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1)。

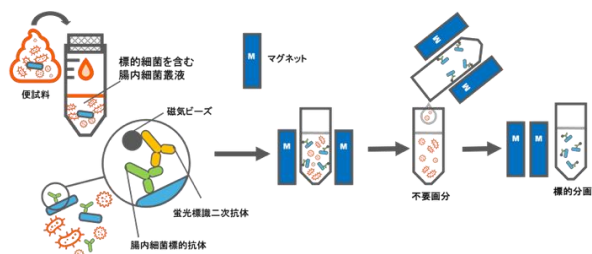


図1 抗体を用いた腸内細菌叢からの標的細菌分離手法

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2A)。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2BおよびC)。

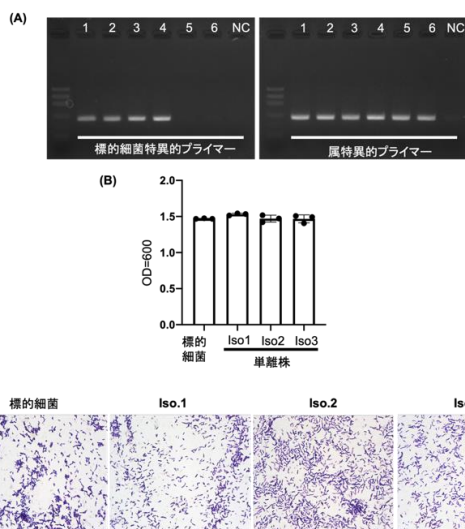


図2 腸内細菌標的抗体を用いた腸内細菌叢からの標的細菌の単離ならびに再培養の検討

(A) 標的細菌特異的プライマー、属特異的プライマーによるコロニーPCRの結果、1. Iso1、2. Iso2、3. Iso3、4. 標的細菌、5. 標的細菌同属細菌1、6. 標的細菌同属細菌2、7. Nuclease free waterをそれぞれ示す。(B) 新たに単離した標的細菌の再培養結果(C) 再培養後の標的細菌ならびに単離株のグラム染色画像

(2) 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3)。

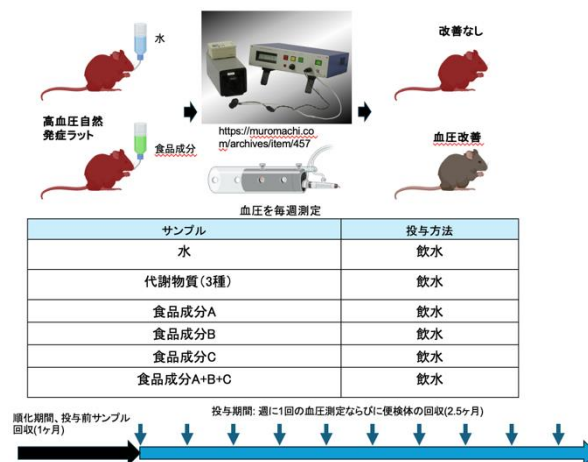


図3 食品成分摂取による血圧改善効果の実験概要

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4)。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。

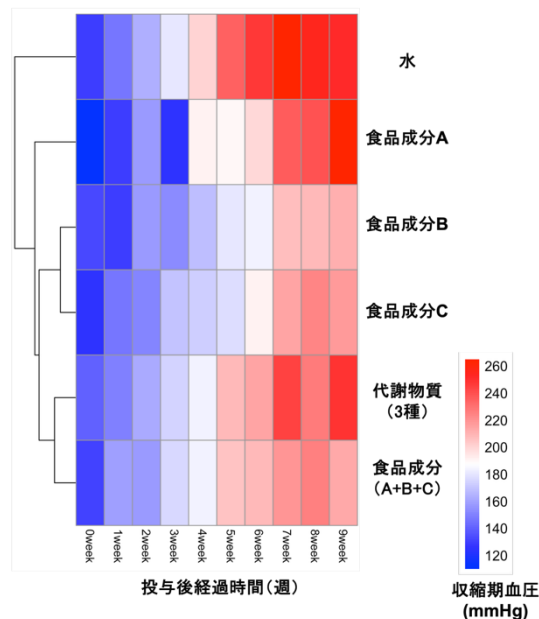


図4 食品成分摂取による高血圧症状改善の検討

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

本年度は、これまでに作製した腸内細菌特異的抗体を活用し、腸内細菌叢中から標的細菌を高精度に分離・濃縮する手法の確立を試みた。従来は、腸内細菌混合液に人為的に添加した標的細菌の分離を成功させていたが、本年度はより実践的な条件下として、標的細菌を含む腸内細菌叢から直接分離できるかを検討した。調製した腸内細菌叢を MojoSort にて分画し、分取分画を寒天培地に播種した。得られたコロニーについて属特異的および種特異的プライマーを用いた PCR 解析を行った結果、標的細菌と一致する新たな3株の単離に成功した。さらに、各株は液体培地での再培養が可能であり、形態や増殖能も標的株と一致していた。これらの成果は、腸内細菌叢に含まれる目的菌を抗体により選択的に分離・培養できる技術として、腸内細菌機能解析や応用研究に有用であることが示唆される。これらの成果に基づき、本技術の有用性を示す学術論文を現在投稿中である。

腸内環境制御による疾患予防法の検討として、食品成分の継続的摂取が腸内環境の改善あるいは維持を通じて収縮期血圧の低下に寄与していることが明らかとなった。一方で、血圧抑制効果の詳細な作用機序については、既報の知見も踏まえても依然として明確ではなく、今後の解析が必要である。そこで、本研究で得られた試料を用いてメタゲノム解析や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行う。さらに、神奈川県および関連研究機関と連携し、得られた知見のヒトへの応用可能性についても検討を進める。

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 Odumaki, 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).

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。また標的細菌のみを認識する抗体作製にも成功しており、疾病の新規診断法開発へと枠を広げる目的でこれまでに、疾病への関連が示唆される腸内細菌に発現するタンパク質の検出用抗体の取得、ならびにその遺伝子の簡易検出について評価を行い、引き続き抗体の機能評価と解析を行った。今年度は取得したクローンの最終化を行った抗体の機能評価を行い、有用性が高い抗体を産生するハイブリドーマについて、抗体可変領域解析および精製抗体の作製、標識を行った。

2. 実験と結果

(1) 特定疾患診断法の確立に向けた抗体の機能評価 (1-1) 直接 ELISA 法によるタンパク X の検出

昨年度の研究より、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（以下、タンパク X と仮称）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 1A)。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 1B)

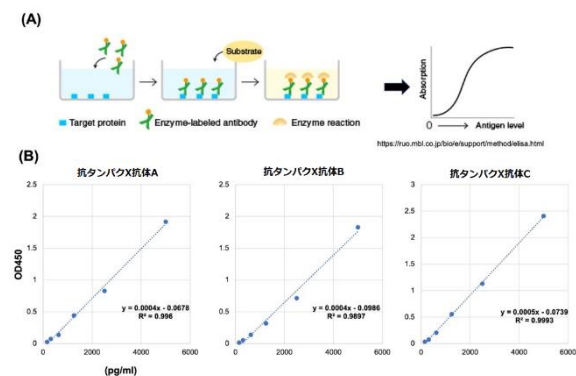


図 1 直接 ELISA 法によるタンパク X の検出

(A)直接 ELISA 法の概要

(B)HRP 標準抗タンパク X 抗体によるタンパク X の検出

(1-2) 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 2)。

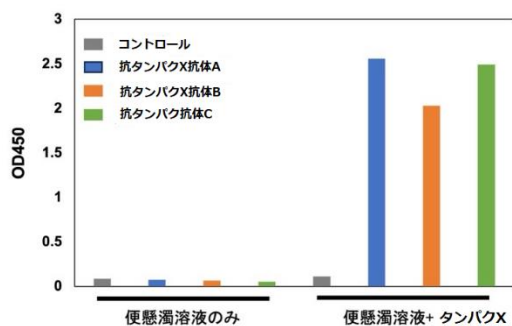


図 2 抗タンパク X 抗体を用いた ELISA 法による便懸濁液からのタンパク X の検出結果

(1-3) 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. 考察及び今後の展望

本年度、特定疾患関連細菌に発現するタンパク X に対する抗体と 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構築について知財申請を行った。今後は配列解析ができなかったハイブリドーマは必要に応じて再度抗体可変領域の配列解析を実施する。

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】

- 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).

業績

【原著論文】

1. Funahashia 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.
2. 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
3. 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
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. 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
6. Ichimura R, Tanaka K, Nakato G, Fukuda S, Arakawa K. Complete genome sequence of *Mediterraneibacter gnavus* strain R1, isolated from human feces. Micorobiol Resour Announc. 2024 Sep 30:e0086324
7. 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 Sep30;8(1):69
8. 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.
9. 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.
10. 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
11. 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.
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. 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.
14. 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

【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)

【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gres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回日本バイオフィルム学会学術集会 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、ウイंक愛知(愛知)、2024年5月17日

【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 シャトレーザガトーキングダム札幌（北海道）2024年6月26日

【特許】

- (1)国内特許出願 1 件
- (2)国際特許出願 1 件