

## 食と腸内細菌により形成される腸内環境の理解と健康科学への展開

研究代表者

國澤 純 医薬基盤・健康・栄養研究所

共同研究者

小川 順 京都大学農学研究科



左から、細見、國澤、雑賀、長竹（医薬基盤・健康・栄養研究所）  
画面内左上から、安藤、岸野、小川、北村、島田（京都大学）

## 1. 研究の背景と達成目標

体の維持と発達において最も基本的な生命活動である「食」を正しく理解することは、学術的にも社会的にも重要な課題である。これまでの食に関する学術状況を見てみると、栄養学では、タンパク質や脂質などのいわゆる栄養素が、食品科学分野では、ポリフェノールなど多くの非栄養素の生体機能が主な対象とされている。さらに近年では、食品成分そのものだけではなく、腸内細菌が産生する代謝物も生体に影響を与えることが分かってきた。一方、腸内細菌についても、現在、世界中で精力的に研究が進められているが、その多くは生体機能と相関する菌の名前だけが判明しているだけであり、腸内細菌叢の形成における食の関与や生体応答を制御する実効代謝物とその産生経路などについては多くが不明のままである。以上を鑑みると、今後、食と健康に関する研究を進める際には、①食事、②腸内細菌叢、③身体状態や疾患、④代謝物とその産生経路、などを包括的に解析し、それらが絡み合っただけで発現する生体応答との関連を解明することが重要である。本研究では、動物モデルを用いた解析とコホートから得られたビッグデータ解析を連動させた研究を遂行し、食と腸内細菌から形成される腸内環境に焦点を当て、実効分子の産生から認識・応答までを分子、細胞、個体の各レベルで解明する。本研究では、「単離・培養した微生物、もしくは生産、合成した候補分子を少なくとも2種類用い、有効性評価とそのメカニズムを解明する」ことを達成目標とする。

## 2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・ 食事成分として油とビタミンに着目した研究を行い、抗アレルギー・抗炎症活性を有する脂質代謝物を6種類同定し、その標的受容体と細胞などの作用メカニズムを解明した。
- ・ 同定した抗アレルギー・抗炎症性脂質代謝物のうち、2種類については微生物を用いた生産システムを開発した。
- ・ 腸管での生体防御に働くIgA抗体の産生を向上させる脂質代謝物を同定し、その作用メカニズムを明らかにした。
- ・ 胸腺におけるT細胞分化とビタミンB1の関わりとメカニズムを明らかにした。
- ・ 腸内細菌については、組織内共生菌として同定していたアルカリゲネスの菌体成分に着目した研究を遂行し、組織内共生メカニズムとワクチン用アジュバントとしての有用性を提示した。
- ・ 日本各地に独自のコホートを立ち上げ、計5千名の健康状態や生活習慣などのメタデータが付随したマイクロバイオームデータベースを樹立した。
- ・ 本データベースを活用し、食事と腸内細菌との関連や食の効果の層別化の基盤となる情報を獲得すると共に、心房細動や口腔ガン、糖尿病などにおける腸内細菌叢や口腔細菌叢との関連を明らかにした。

これらの成果は、食と腸内細菌から形成される腸内環境という観点から、新しい健康科学に関する新規学術情報を提供するものであり、健康長寿の延伸という課題に対し、食の有効性の個人差に基づく「個別化/層別化栄養」として社会的貢献が可能になると期待される。

### 3. 研究成果

オメガ3脂肪酸やオメガ6脂肪酸は食事により摂取する必要のある必須脂肪酸であり、その体内存在量は食事の油の脂肪酸組成に大きく左右される。これまでに、オメガ3脂肪酸の $\alpha$ -リノレン酸を豊富に含む亜麻仁油を摂取すると、エイコサペンタエン酸（EPA）代謝物の1つである17,18-エポキシエイコサテトラエン酸（17,18-EpETE）が腸管で著増することをリポドミクス解析によって見出し、17,18-EpETEが食物アレルギーを抑制する実効代謝物として働くことを明らかにしている。

本事業では、17,18-EpETEの抗アレルギー作用についての研究をさらに推進し、17,18-EpETEがアレルギー性皮膚炎の予防や治療にも有効性を発揮することをマウスやサルを用いた実験で明らかにした。さらにその詳細な作用機序として、17,18-EpETEが好中球に高発現するGPR40に作用することで仮足形成を阻害し、好中球の炎症部位への遊走を抑制することを解明した（JACI, 2018）。さらに17,18-EpETEの構造活性相関に着目した研究を遂行し、17(S)18(R)体にアレルギー性皮膚炎に対する強い抑制効果があることを見出した。そこで小川班と共同で、微生物代謝酵素を用いて立体選択的に17(S)18(R)体を産生するシステムを構築し、同システムで産生した17(S)18(R)体にも強力な抗アレルギー・抗炎症活性があることを確認した（FASEB Bioadv, 2019）。

さらに亜麻仁油を摂取することでアレルギー性鼻炎が改善し、さらに妊娠・授乳期間中の亜麻仁油接種で乳幼児の接触皮膚炎も抑制できることを見出した。腸管とは異なり鼻炎アレルギーを誘導した鼻粘膜には別のEPA代謝物である15-ヒドロキシエイコサペンタエン酸（15-HEPE）が、皮膚では12-HEPEが著増することがわかり、15-HEPEはPPAR $\gamma$ 依存的にマスト細胞の脱顆粒を抑制し、12-HEPEはRXR $\alpha$ 依存的にケラチノサイトに作用し好中球遊走因子であるCXCL1やCXCL2の遺伝子発現を抑制することが明らかになった（Nutrients, 2019; FASEB J, in press）。

母子栄養に着目した研究を遂行し、亜麻仁油餌で飼育したマウスの母乳中にはドコサペンタエン酸代謝物の1つである14-ヒドロキシDPA（14-HDPA）が多く存在することを見出し、本代謝物が母乳を介して仔マウスに移行した後、形質細胞様樹状細胞のTRAILの発現を誘導することで、T細胞からの炎症性サイトカインの産生を阻害し、その結果、アレルギー性皮膚炎の軽減効果を示すことを明らかにした。さらにヒトコホートサンプルを用いた解析から、1歳児健診の際にアレルギーと診断されたお子さんが生後1ヶ月時に飲んでいた母乳には14-HDPAが少ないことが判明した（Allergy, 2020）。

このように、亜麻仁油を摂取した後の代謝プロファイルは身体の部位により異なり、様々な代謝物に変換され多様な生理活性を発揮していることが明らかになった。

一方、オメガ6脂肪酸についての研究も展開し、アラキドン酸代謝物のロイコトリエンB<sub>4</sub>（LTB<sub>4</sub>）の受容体であるBLT1が腸管IgA陽性B細胞に発現していることを新たに見出した。腸管IgA陽性B細胞におけるBLT1を介したシグナルはMyD88の遺伝子発現を上方調節することで腸内細菌からの細胞増殖シグナルを増強し、経口ワクチンによって誘導される腸管管腔への抗原特異的分泌型IgA産生に重要な役割があることを明らかにした（Mucosal Immunol, 2019）。

また、必須脂肪酸欠乏時にオレイン酸からミード酸が代謝産生されることが知られているが、実際に必須脂肪酸をほとんど含まないココナツ油餌でマウスを飼育するとミード酸が血液中に増加してくることを

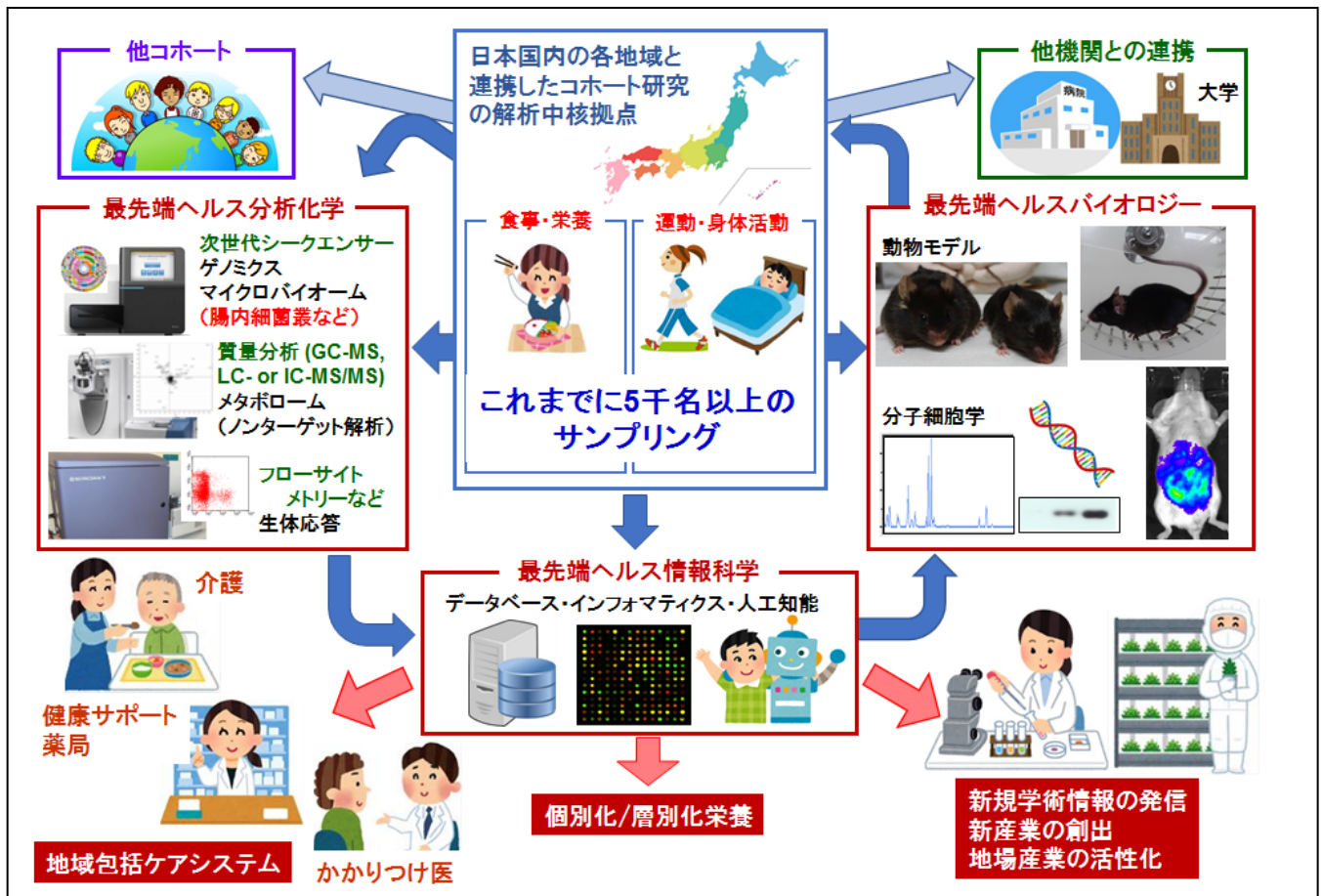
確認した。さらにミード酸の生理活性として好中球に作用し仮足形成を阻害することや、LTB<sub>4</sub>産生を減弱することで好中球の遊走や血管透過性の亢進を抑制することがわかり、通常餌で飼育したマウスにミード酸を投与することでアレルギー性皮膚炎が軽減されることが明らかになった (Allergy, 2019)。

また脂質とならび重要な栄養素であるビタミンにも着目した研究を遂行した。ビタミンB1は様々な代謝反応の補酵素として重要な役割を果たすことが知られている。これまでに、腸管免疫の要であるパイエル板のB細胞と、分化が進んだ粘膜固有層の形質細胞とではビタミンB1の要求性が異なることを見出し、各細胞の生存に必要なエネルギー代謝様式が異なることを明らかとしている。本事業では、これらの研究をさらに発展させ、ビタミンB1が胸腺T細胞分化にも重要な役割を果たすことを新たに見出し、ビタミンB1欠乏条件の胸腺では、T細胞の分化異常が起こり、体内の $\alpha\beta$ 型T細胞の減少が認められた (iScience, 2020)。

腸内細菌は食事と同様に腸管免疫をはじめとする宿主免疫の制御と深く関わっている。これまでに、小腸パイエル板組織内で共生しているアルカリゲネス菌を発見し、「リンパ組織内共生」という新概念を提唱している。本事業では、アルカリゲネスの共生メカニズムの解明、さらにそのユニーク性に着目したアジュバントへの応用について研究を進めた。アルカリゲネスは小腸パイエル板組織内で樹状細胞に補足され、IL-6やBAFFなどのサイトカイン産生の促進など樹状細胞の活性化を介して、IgA抗体産生の促進など腸管免疫を増強する。このようにアルカリゲネスは自然免疫を活性化している一方で、免疫細胞が集積しているパイエル板において炎症を惹起せずに共生関係を築いている。この共生メカニズムとして、アルカリゲネスの主要な菌体成分であるリポポリサッカライド (LPS) がユニークな構造を有し、TLR4に対する弱いアゴニスト活性をもつことを明らかにした。このため、アルカリゲネスLPSは炎症の惹起につながるような一酸化窒素の誘導能が低いことも明らかになった (Front Microbiol, 2020)。

アルカリゲネス由来LPSは、樹状細胞などの免疫系を適度に活性化するが、過剰な炎症は惹起しないという特徴をもっており、この免疫活性化作用はアジュバントとして理想的であると考えられる。そこで、アルカリゲネス由来のLPSならびにLPSの活性中心であるリポドAのアジュバントとしての有効性を検証した。その結果、実験的モデル抗原である卵白アルブミンを用いた検討から、LPSやLipid Aが抗原特異的な抗体産生やT細胞応答などの免疫応答を増強できることを明らかにした (Vaccines, 2020)。また、肺炎球菌に対する経鼻ワクチンとしても顕著な副反応を呈することなく免疫応答を増強し、肺炎球菌の呼吸器感染に対する感染防御効果を高めることを示した (Microorganisms, 2020)。

動物モデルを中心に進めてきた食事や腸内細菌に関する研究を人へ発展させることを目的に、日本人を対象にしたコホート研究を進め、日本各地に居住する5千名以上のデータを収集し、独自の統合解析プラットフォーム (MANTA) が付随したデータベースに格納した (PLoS One, 2020)。先行し収集した約1,500名の健康者データを用いて腸内細菌と生活習慣などの関連を解析し、居住地や便の性状、食習慣などと腸内細菌叢が関連していることを明らかにした (論文改訂投稿中)。また、腸内細菌と疾患の関連についても複数の病院や大学との共同研究を進め、心房細動や口腔ガン、糖尿病などにおける腸内細菌叢や口腔細菌叢を明らかにした (J Oral Biosci. 2019; Heart Vessels. 2021、投稿中ならびに準備中)。今後、作用メカニズムの解明や介入研究による検証などを進めていきたいと考えている。



#### 4. 今後の展開

本研究により、食と腸内細菌の相互作用も含めた腸内環境の構築と健康との関係に関し、コホート情報から基礎研究までの研究基盤構築と学術情報の発信を行うことができた。今後これらの研究を発展させ、さらに周辺領域の研究とも融合することで「腸内環境の包括的な理解による新しい健康科学分野」の創出と拡大につながると期待される。またここから得られた知見を活用することで、層別化/個別化栄養やヘルスケア領域での新展開が期待される。

#### 5. 発表実績

1. Saika A., Nagatake T., Hirata S.I., Sawane K., Adachi J., Abe Y., Isoyama J., Morimoto S., Node E., Tiwari P., Hosomi K., Matsunaga A., Honda T., Tomonaga T., Arita M., Kabashima K., and \*Kunisawa J.,  $\omega$ 3 fatty acid metabolite, 12-hydroxyeicosapentaenoic acid, alleviates contact hypersensitivity by downregulation of CXCL1 and CXCL2 gene expression in keratinocytes via retinoid X receptor  $\alpha$ . *FASEB J* (2021, in press)
2. Hosomi K., Shibata N., Shimoyama A., Uto T., Nagatake T., Tojima Y., Nishino T., Takeyama H., Fukase K., Kiyono H., \*Kunisawa J., Lymphoid tissue-resident Alcaligenes establish an intracellular symbiotic environment by creating a unique energy shift in dendritic cells. *Front Microbiol*

11:561005, 2020

3. Hirata S.I., Sawane K., Adachi J., Isoyama J., Sugiura Y., Matsunaga A., Hosomi K., Tomonaga T., Suematsu M., Nagatake T., \*Kunisawa J., Vitamin B1 supports the differentiation of T cells through TGF- $\beta$  superfamily production in thymic stromal cells. *iScience* 23(9):101426, 2020
4. Yoshii K., Hosomi K., Shimoyama A., Wang Y., Yamaura H., Nagatake T., Suzuki H., Lan H., Kiyono H., Fukase K., \*Kunisawa J., Chemically synthesized *Alcaligenes* lipid A shows a potent and safe nasal vaccine adjuvant activity for the induction of *Streptococcus pneumoniae*-specific IgA and Th17 mediated protective immunity. *Microorganisms* 8(8):1102, 2020
5. Hirata S.I., Nagatake T., Sawane K., Hosomi K., Honda T., Ono S., Shibuya N., Saito E., Adachi J., Abe Y., Isoyama J., Suzuki H., Matsunaga A., Tomonaga T., Kiyono H., Kabashima K., Arita M., \*Kunisawa J. Maternal  $\omega$ 3 docosapentaenoic acid inhibits infant allergic dermatitis through TRAIL-expressing plasmacytoid dendritic cells in mice. *Allergy* 75(8):1935-1951, 2020
6. Saika A., Nagatake T., Kishino S., Park S.B., Honda T., Matsumoto N., Shimojou M., Morimoto S., Tiwari P., Node E., Hirata S.I., Hosomi K., Kabashima K., Ogawa J., \*Kunisawa J. 17(S),18(R)-epoxyeicosatetraenoic acid generated by cytochrome P450 BM-3 from *Bacillus megaterium* inhibits the development of contact hypersensitivity via G-protein-coupled receptor 40-mediated neutrophil suppression. *FASEB Bioadv* 2 (1): 59-71, 2019
7. Sawane K., Nagatake T., Hosomi K., Hirata S.I., Adachi J., Abe Y., Isoyama J., Suzuki H., Matsunaga A., Fukumitsu S., Aida K., Tomonaga T., Arita M., \*Kunisawa J. Dietary omega-3 fatty acid dampens allergic rhinitis via eosinophilic production of the anti-allergic lipid mediator 15-hydroxyeicosapentaenoic acid in mice. *Nutrients* 11(12): E2868, 2019
8. Nagatake T., Hirata S.I., Koga T., Kuroda E., Kobari S., Suzuki H., Hosomi K., Matsumoto N., Yanrismet Y., Shimojou M., Morimoto S., Sasaki F., Ishii K.J., Yokomizo T., and \*Kunisawa J., BLT1 mediates commensal bacteria-dependent innate immune signals to enhance antigen-specific intestinal IgA responses. *Mucosal Immunol* 12(5):1082-1091, 2019
9. Tiwari P., Nagatake T., Hirata S. I., Sawane K., Saika A., Shibata Y., Morimoto S., Honda T., Adachi J., Abe Y., Isoyama J., Tomonaga T., Kiyono H., Kabashima K., and \*Kunisawa J., Dietary coconut oil ameliorates skin contact hypersensitivity through mead acid production in mice. *Allergy* 74(8): 1522-1532, 2019
10. Nagatake T., Shiogama Y., Inoue A., Kikuta J., Honda T., Tiwari P., Kishi T., Yanagisawa A., Isobe Y., Matsumoto N., Shimojou M., Morimoto S., Suzuki H., Hirata S., Steneberg P., Edlund H., Aoki J., Arita M., Kiyono H., Yasutomi Y., Ishii M., Kabashima K., and \*Kunisawa J., 17,18-EpETE-GPR40 axis ameliorates contact hypersensitivity by inhibiting neutrophil mobility in mice and cynomolgus macaques. *J Allergy Clin Immunol* 142(2): 470-484, 2018