

第6回研究助成

伝統発酵食品の腸管免疫制御および腸・脳相関に関する研究

研究代表者

辻 典子 産業技術総合研究所

共同研究者

平山和宏 東京大学大学院

安達貴弘 東京医科歯科大学

藍原祥子 神戸大学大学院

波平昌一 産業技術総合研究所

角田 茂 東京大学大学院



本研究に関連した国際ワークショップより

(第6回オルソオルガノジェネシス検討会・第2回 JST-SICORP 国際ワークショップ 合同開催ワークショップ)

前列右から2番目藍原、4番目辻、中列右から3番目波平、後列左から4番目安達。

中央沖合 左から平山、角田。)

1. 研究の背景と達成目標

洋の東西を問わず古代には食医が重要とされ、医食同源の考え方のもとで健康長寿を目指した。ヒポクラテスの格言にも「人間は誰でも体の中に百人の名医を持っている」とあり、我々は「体の中の名医」を「腸内環境」と読み替えて科学することを試みた。腸内環境は「食」とその結果形成される「腸内微生物」で規定される。

実際腸内には多様で100兆個にもものぼる腸内細菌をはじめとする微生物群が棲息しているが、人体との相互作用や微生物同士の関係を介して健康維持や疾患に深く関与していることが明らかとなり、健康増進への活用をめざした様々な研究開発が始められている。すなわち腸内細菌(マイクロバイオーーム)は、さまざまな疾病の発症予測のバイオマーカーや新規診断法、医薬品の有効性や副作用の予測、新しい機序に基づく健康食品、医薬品の開発などにおいて新たな標的となりつつあり、社会的にも大きな期待が寄せられている。

無菌マウスにヒト便中サンプルより得られた細菌群を経口的に移植したヒト腸内フローラマウスは高度にヒトの生体機能をシミュレーションすることが次々と報告されており、モデル動物において腸内環境と疾患との間の関係性を解明するのに適したシステムと考えられる。また、ヒト腸内フローラマウスの優位点はこのような事実に加え、臨床や疫学統計に必要な科学的エビデンスを示す上で非常にパワフルなツールとなり得ることである。本来一頭で対照データを得ることも困難なヒトの健康状態と疾病リスクや食の介入の関係を、“均一な腸内細菌叢を持つ複数の個体(マウス)”として介入試験を行い、科学的に判定することが可能となるため、食や薬が個人の腸内環境と生体恒常性維持機能(免疫・神経・内分泌等)を制御する様子を、均一で十分な数のヒト腸内フローラマウスを用いて統計的に評価・解析することができると期待されるのである。

腸管(特に小腸)は広大な面積で種々の環境シグナルを積極的に受け取り、全身に伝えていくが、「神経-免疫-内分泌ネットワーク」の構築に必要な「食」と、その結果選択される「共生微生物」のシグナルを腸管が受容し、高次生命機能に変換していく過程はまだ未知の世界である。本研究では、食と健康の根幹的な関係を明らかにするため、ヒト腸内フローラマウスの技術を活用して「個体レベルの環境適応」を高度にシミュレーションし、さらにイメージングも可能とする技術プラットフォームを確立することとした。その上で食シグナルが腸管から全身に波及していく様子を、「伝統発酵食品」をモデルとして解明することを目的とした。小腸における乳酸菌と免疫システムの共生進化の機構を軸に、日本食の利点を独創的に解明しつつ、人類にとって理想的な食を提示する。医食同源による疾病・未病制御、健全な加齢にヒントを与えるだけでなく、脳腸軸にも美味しい食事とは何かを追求し、答えを得る。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・ ヒト腸内フローラマウスを用いて、食品成分による腸内細菌叢および免疫機能変化を追跡可能であることを示した(免疫応答に対する発酵食品の効果が腸内細菌叢に依存して異なることを示した)。
- ・ 近年、国民の QOL(Quality of life)の低下要因は感染症のようなシングルファクターの疾患ではなく、糖尿病や認知症などマルチファクターの生活習慣病による状況であり、新たな前臨床モデルやバイオマーカーの統合的理解が望まれている。そうした中で、ヒト腸内フローラマウスは生理機能の包括的な理解を可能とする新たな動物モデルとして、広く食産業や臨床を含む医薬産業への活用が期待される(→Food Medicineの推進)。
- ・ カルシウムバイオセンサーYC3.60を細胞系譜特異的に発現するマウスを作製し、生体内で細胞の動態のみならず、活性化まで可視化できる5D(x, y, z, 時間, Ca²⁺シグナル)生体イメージングを確立した。このシステ

ムを利用し、プロバイオティクスや機能性食品の腸管でのシグナリングを可視化し、生体内での食シグナルを評価することを試みた。

- ・ 味噌など発酵食品の摂取により記憶型免疫細胞や抗炎症性細胞の機能成熟が促進することを示した。

以上の成果は、多様な健康産業の発展と持続的な健康社会の実現に大きく貢献することが期待される。

3. 研究成果

発酵食品の免疫賦活機能の強さと腸内細菌叢との関係性を明らかにする

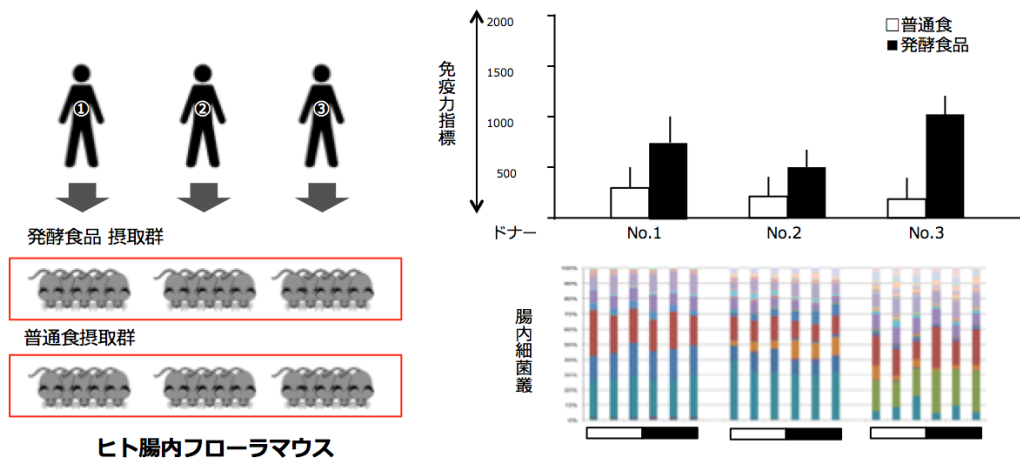


図1:ヒト腸内フローラマウスを用いた食の腸内環境および免疫機能制御の評価システムの確立

(1) ヒト腸内フローラマウス

ヒト腸内フローラマウスを用いて、食品成分によるヒト腸内細菌叢の変化および免疫など生理機能変化を追跡可能であることを示した。図1に示すように、3名のボランティアの便の移植により東京大学で作成されたヒト腸内フローラマウスの腸内細菌叢を調べたところ三様の結果で、それぞれ由来元の個人が固有に有する細菌叢の特徴を継承していると考えられた。発酵食品の含まれた餌を摂取することによる腸内細菌叢の変化は比較的穏やかであったのに対し、免疫力指標は食品の摂取により大きく変動した。発酵食品の摂取により、抗炎症性サイトカインの上昇、炎症性サイトカインの減少が観察されており、さらにその影響の強さは腸内細菌叢のパターンに依存していた。抗原特異的なT細胞機能の発現が、食と微生物叢に依存していることが示され、いかなる血中成分によりその制御がおこなわれているのかについてさらに解析を進めていく。

(2) 腸管バリア機能

カルシウムバイオセンサーYC3.60を細胞系譜特異的に発現するカメレオンマウスを利用し、プロバイオティクスや機能性食品の腸管でのシグナリングを可視化し、生体内での食シグナルを評価することを試みた(図2)。食品成分として乳酸菌や納豆菌など微生物死菌体によるカメレオンマウス小腸上皮細胞の活性化をSPFマウスにおいて観察したところ、興味深いことに納豆菌に対してはCa²⁺レベルの迅速かつ持続的な増強が観察されたのに対し、乳酸菌C60株ではCa²⁺レベルの変動がみられなかった。このことは、乳酸菌群が小腸の常在細菌であるために、上皮細胞の新たな刺激因子と認識され難い可能性を示している。一方、無菌飼育下のカメレオンマ

ウスでは乳酸菌 C60 株に対する Ca^{2+} レベルの増強も納豆菌に対するそれと同様に顕著であり、無菌状態の腸管においては乳酸菌も未知の刺激因子として上皮細胞を活性化しうることを示した。どのようにして SPF および無菌マウスにおいて応答性が異なるのかについて検討を行っているが、トル様レセプター (TLR) の各種リガンドによる自然免疫刺激に対しては、応答シグナルの検出は困難であった。納豆菌等は TLR リガンド以外の自然免疫レセプター (C-タイプレクチンなど) で認識される可能性が考えられた。また、無菌マウスおよびヒトフローラマウスにおいて、発酵食品を添加した餌により腸内分泌系 (腸管内分泌に関わる細胞群) が変化するかを検証するため、小腸上皮における関連遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法で定量し、結果を考察中である。

(3) 小腸と免疫機能

食品成分が免疫システムに対して作用する場は小腸であり、抗炎症機構において重要な場となっている。乳酸菌は小腸の主要な常在細菌であり、古来より酵母や麹菌とともに発酵食品微生物として活用されている。こうした小腸環境成分は、直接免疫系の活性化や機能成熟に関与すると考えられる。日本の伝統発酵食品のうち代表格のひとつである味噌は樹状細胞における IL-10 等の発現を増強した。乳酸菌・酵母・麹菌を全て含むため、食品中の核酸・多糖により免疫細胞が活性化されると考えられた。日本に特有の伝統食品微生物である納豆菌によっても樹状細胞からのサイトカイン産生が増強された。また、それらの分子発現には TLR の下流アダプター分子である MyD88 が重要であることも示され、TLR など自然免疫レセプターが病原菌だけではなく、共生細菌や食成分に対しても効率よく応答することが改めて示された。(図 3. 乳酸菌に特有の経路として二本鎖 RNA を認識する TLR3 が重要であることは先年発表している。)

(4) 脳腸軸(神経細胞)

成体神経新生は、哺乳類の成体脳の特定領域に神経幹細胞が存在し、一生涯に渡り神経細胞が新生され続ける現象である。特に、海馬と呼ばれる領域における神経新生は、学習・記憶だけでなく、加齢に伴う認知症の発症も関連するとされる。そのようなライフコースにわたって重要な脳神経の生理機能と腸内環境(腸内微生物叢)との関係をあきらかにするため、無菌マウスと SPF マウスを比較したところ、無菌マウスにおいては、通常飼育下のマウスに比べ神経幹細胞の数が減少していること、及び、その幹細胞の神経新生能も著しく減少していることを見出した。さらに、通常飼育下でのマウスの成体神経新生は運動によって亢進することが知られているが、無菌マウスにおいてはその運動による効果が認められなかった。このことは、哺乳類の成体脳の恒常的な神経新生には、腸内微生物が重要な役割を果たしていることを示している。さらに、腸内環境と運動の条件が揃った際に脳神経の再生が効率よく行われる可能性が初めて明らかとなった。今後腸内環境因子そのもの、あるいは腸内微生物叢の餌ともなる食成分との組み合わせ効果を追求していくことで、「食と運動」による脳機能の制御技術(学習効率や情動の改善やヘルシーエイジング)の発展にも結びつけていくことができる。

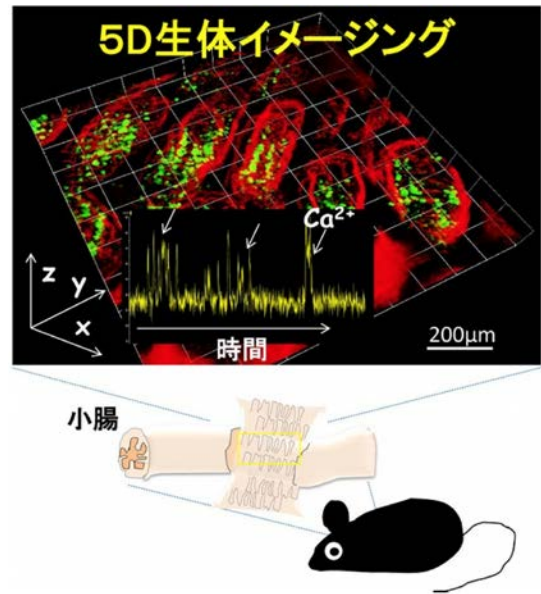


図2:カメレオンマウスを活用し腸管細胞活性化の検出系を確立した

4. 今後の展開

* 免疫と脳腸軸

ヒトフローラマウスを用いて伝統発酵食品を中心とした日本食に対する生体応答データをさらに蓄積する。

(1) 腸内細菌叢、(2) 免疫指標、(3) 代謝物やマイクロRNAのプロファイル、等のデータセットから情報多重解析を行っていく。

各種エンテロタイプ of ヒトフローラマウスにおいて、小腸を起点とする栄養(核酸・糖・アミノ酸など)から免疫・脳機能への波及に重点を置いた研究を展開する。

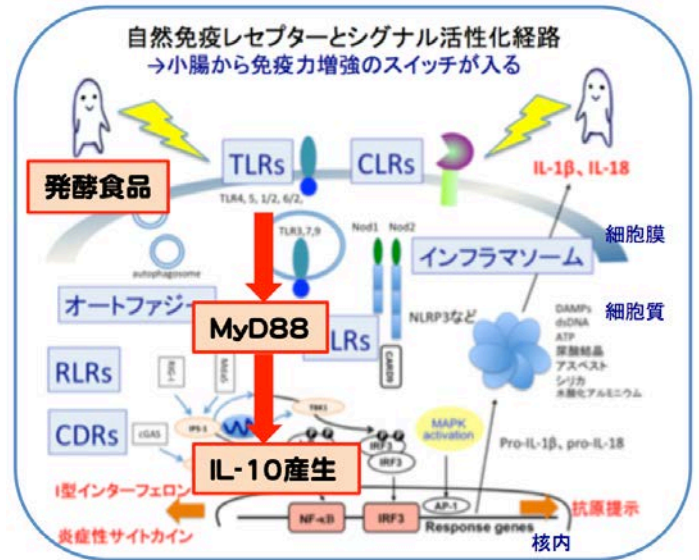


図3: 発酵食品成分は自然免疫活性化経路により免疫機能の成熟に寄与する

* 十分な科学エビデンスに基づく新たな食文化の提案

ヒトの自然治癒力を引き出す、社会全体での予防技術への取り組みに、本研究成果を活用していく。

ヒトフローラマウスを用いた食の評価系から、腸内細菌叢を指標とした「食と免疫」のガイドラインを作成する。伝統食成分を健康の維持増進に役立てるとともに、疾患リスクに対しても予防、早期診断やセルフメディケーションに役立つ「食と免疫」の提案を行い、それらを日常生活に組み込むことを可能とする産業基盤を確立していく。効果的な食生活のデザインが可能となり、公的医療費・介護費の削減が実現するとともに社会全体の幸福度(QOL)を高めることができる。(図4)

腸内環境によって生体高次機能が変わる

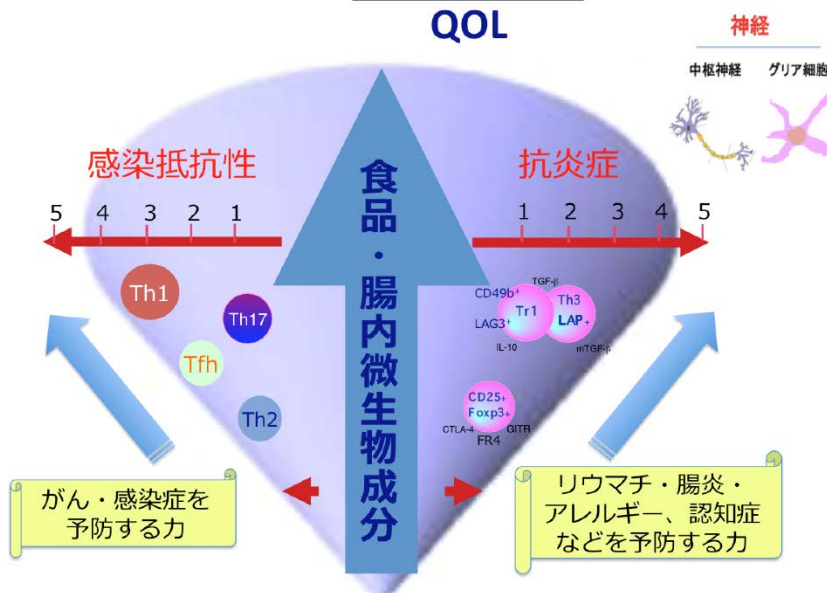


図4: 個体ごとに形成された環境適応能力や生体恒常性を維持するためには『一生を通じて』食物や腸内細菌などからの適切で継続的な刺激が必要であると理解されるようになった。腸内環境を安定に保つうえで食の役割は非常に大きい。

5. 発表実績

1. Kawashima T, Ikari N, Kouchi T, Kowatari Y, Kubota Y, Shimojo N, Tsuji NM. The molecular mechanism for activating IgA production by *Pediococcus acidilactici* K15 and the clinical impact in a randomized trial. *Sci Rep.* 8(1):5065. (2018) doi: 10.1038/s41598-018-23404-4.
2. Kawashima T, Ikari N, Watanabe Y, Kubota Y, Yoshio S, Kanto T, Motohashi S, Shimojo N, Tsuji NM. Double-Stranded RNA Derived from Lactic Acid Bacteria Augments Th1 Immunity *via* Interferon- β from Human Dendritic Cells. *Front Immunol.* 9:27. (2018) doi: 10.3389/fimmu.2018.00027. eCollection 2018.
3. Wang X, Li X, Ito A, Sogo Y, Watanabe Y, Hashimoto K, Yamazaki A, Ohno T, Tsuji NM. Synergistic effects of stellated fibrous mesoporous silica and synthetic dsRNA analogues for cancer immunotherapy. *Chem Commun (Camb).* 54(9):1057-1060. (2018) doi: 10.1039/c7cc08222c.
4. Masuoka H, Shimada K, Kiyosue-Yasuda T, Kiyosue M, Oishi Y, Kimura S, Ohashi Y, Fujisawa T, Hotta K, Yamada A, Hirayama K. Transition of the intestinal microbiota of cats with age. *PLoS One.* 2017 Aug 16;12(8):e0181739. doi: 10.1371/journal.pone.0181739. eCollection 2017.
5. Kamiya T, Watanabe Y, Makino S, Kano H, Tsuji NM. Improvement of Intestinal Immune Cell Function by Lactic Acid Bacteria for Dairy Products. *Microorganisms.* 2016 Dec 23;5(1). pii: E1. doi: 10.3390/microorganisms5010001.
6. Adachi T, Kakuta S, Aihara Y, Kamiya T, Watanabe Y, Osakabe N, Hazato N, Miyawaki A, Yoshikawa S, Usami T, Karasuyama H, Kimoto-Nira H, Hirayama K, Tsuji NM. Visualization of Probiotic-Mediated Ca²⁺ Signaling in Intestinal Epithelial Cells *In Vivo.* *Front Immunol.* 2016 Dec 16;7:601. doi: 10.3389/fimmu.2016.00601. eCollection 2016.
7. 辻 典子、平山和宏、安達貴弘 「乳酸菌と免疫恒常性」 炎症と免疫 25, 34(2017)
8. Tsuji NM, Double-Stranded RNA in Lactic Acid Bacteria Prime Protective Immunity *via* interferon-beta *Cytokine 2017* (Kanazawa, Oct 2017) (International, invited)
9. 辻 典子 日本の発酵食品の腸管および腸内細菌叢を介する機能性について アグリ技術シーズセミナー in 北陸 (農林水産・食品産業技術振興協会) (2017 12 月 招待)
10. 辻 典子 小腸と身体に優しい発酵食品 「和食と健康」～食と腸内細菌研究の新展開～ (和食文化国民会議、キャノン財団共催シンポジウム) (2018 年 2 月 招待)