

第8回研究助成

日本人と欧米人の腸内細菌叢比較とプロバイオティクス効果の解析

研究代表者

植松 智 大阪市立大学

共同研究者

田中 廣壽 東京大学

井元 清哉 東京大学



左から研究代表者、右上段 田中氏、右下段 井元氏

1. 研究の背景と達成目標

昨今、「食」と「健康・長寿」を考える上で腸内細菌叢への関心が高まっている。欧米では大規模な腸内細菌叢データベースが存在するが、未だ日本人のものは構築されておらず、民族特有の腸内細菌叢のパターンやその健康・長寿への影響は解析されていない。現在、東京大学医科学研究所国際粘膜ワクチン開発研究センターでは、米にコレラトキシン B サブユニットを発現させた米型経口ワクチン MucoRice-CTB の臨床治験が行われている。本研究課題では、この治験の過程で収集した健康ボランティアの糞便に関して、腸内細菌及びウイルスの DNA を抽出し、シーケンシングによる全メタゲノム解析を行い、日本人健康者 100 名のメタゲノムデータベース構築を行うことを目的としている。また、マウスモデルを用いて、加齢にともなう腸内細菌叢および腸内細菌が産生する代謝物の変動メカニズムを検討し、プロバイオティクス摂取による長寿伸長効果の影響因子を探索し、その生理機能を解明する。腸内細菌の構成、遺伝子コピー数、糞便内代謝産物、各臓器における遺伝子発現などの生体データを若齢マウスと老齢マウスから取得し、統合的に解析することでこれまで明らかにできなかった加齢による腸内細菌叢の変化と老化の相互関係も解明する。これらの成果は、腸内細菌やその機能を標的とした新規の治療法、治療薬の開発にも繋がると考えている。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・日本人健康者 100 名のメタゲノムデータベース構築：同一糞便から細菌叢とウイルス叢を全ゲノム解析によって解析した世界初のメタゲノムデータベースを作成した。今後、様々な疾患のメタゲノム解析を行う上で、重要なコントロールとなる。

- ・メタゲノムデータベースを用いた腸内細菌—バクテリオファージの感染関係予測：腸内細菌叢のメタゲノムデータベースから prophage 配列と CRISPR-spacer 配列を検出し、宿主—寄生体の感染予測を行った。メタゲノムデータから腸内の細菌とバクテリオファージの感染関係を網羅的に明らかにした非常にインパクトの高い成果である。

- ・メタゲノムデータベースを用いた次世代ファージ療法の開発：*Clostridioides difficile* において prophage 配列を検索し、新規 *C. difficile* 特異的ファージを同定した。それらのバクテリオファージが有する抗菌酵素を同定し、*C. difficile* 特異的溶菌物質の開発を行った。

- ・マウスモデルにおけるプロバイオティクスの抗加齢効果の検証：マウスにおいて加齢による腸内細菌の変化、それに伴う腸内代謝物の変化、その生体に対する影響をオミクス解析によって明らかにした。マウスを用いて 2 年半という長期間にわたる腸内細菌叢の変化を検証した非常にインパクトの高い成果である。

3. 研究成果

日本人健康者 101 名の腸内微生物叢のデータベースを構築した。同一糞便から腸内細菌叢と腸内ウイルス叢の両方を解析した世界初のメタゲノムデータベースとなっている。日本人の健康な 101 人の細菌叢は、多様性に飛んだ健康パターンだった。一方、ウイルス叢を解析すると、一本鎖 DNA ウイルスである Microviridae を多く持つ人、二本鎖 DNA ウイルスである Caudovirales が多い人、2014 年に初めて報告さ

れた crAssphage 及び、その類縁ファージである crAss-like phage が多い人が見られた (Cell Host Microbe, Under revision)。

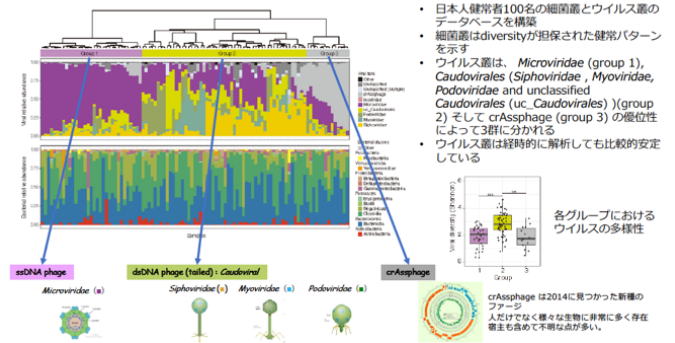
次に、細菌叢のプロファージおよび CRISPR スペーサーを検出することにより、腸内細菌とバクテリオファージとの間の宿主-寄生体関係も検討することが出来た。腸内ファージが感染しうる宿主腸内細菌に関する網羅的なデータの取得が出来た (Cell Host Microbe, Under revision)。

最近、腸内細菌叢の異常が様々な疾患と関連していることが分かっており、その制御法開発が求められている。さらに、クローン病における Adherent-invasive Escherichia coli (AIEC)、肥満・糖尿病における Clostridium ramosum など病気の発症に直接関与する腸内細菌の存在も報告されている。これらの腸内細菌は、共生病原菌 pathobiont と呼ばれ、新たな疾患治療の標的として注目されている。疾患の原因として因果関係ははっきりとした共生菌に関しては、胃潰瘍の場合の Helicobacter pylori と同様に除菌が考慮される。しかし、

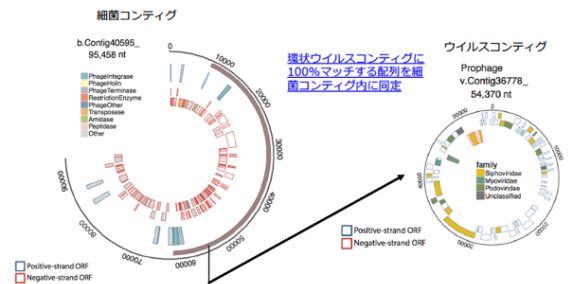
抗生物質の使用は、腸内の有益菌まで殺傷してしまう可能性があるため、pathobiont を特異的に殺傷できる治療法の開発が求められている。バクテリオファージは、その宿主特異性から細菌感染制御に古くから応用されており、ファージ療法と呼ばれている。ファージ療法は東欧において、広く用いられているが、西側諸国ではペニシリンの発見以降、廃れた。昨今、多数の薬剤耐性菌の出現にともない、ファージ療法が再び着目されている。今回えられた腸内ウイルス叢のデータベース及び宿主-寄生体関係は、腸内細菌制御のための新規ファージ療法の基盤となることが考えられる。Clostridium difficile は健康な人がごく少量持つ常在菌である。しかしながら、治療目的での抗生物質投与後に腸内で二次的に増殖し、毒素を産生することにより偽膜性腸炎を生じることがある。日本では、強毒株が存在しないため、抗生物質の投与を中止すると腸炎は改善することが多い。しかしながら、欧米では、binary toxin 陽性の強毒株が存在しており、難治性反復性の腸炎になることがある。この際に健康な人の糞便移植をすると改善することが報告されている。我々はブリガム・ウィメンズ・ホスピタルから糞便移植を受けた患者9名の移植前後の糞便及びドナー糞便を入手し、腸内細菌叢、ウイルス叢の変化の解析を行っており現在論文投稿中である。腸内ウイルス叢の観点から、糞便移植の治療機構が明らかになると考える。

作成したメタゲノムデータベースの治療応用例として、C. difficile に特異的に感染するファージを新規に同定している。これら C. difficile 特異的ファージが持つ抗菌酵素をメタゲノム情報から同定し、蛋白質精製を行い、抗菌効果を確認出来た。メタゲノムデータベースを用いた次世代ファージ療法の確立として報告を行なっている (Cell Host Microbe, Under revision)。

日本人健康者の同一糞便からの細菌叢とウイルス叢のデータベースの構築



新規の溶原ファージの同定



疾患メタゲノム解析: 偽膜性腸炎



本研究課題の2つめのプロジェクトとして、加齢性変化に対する probiotics の効果を明らかにするため、プロバイオティクス食品である LB81 ヨーグルトをマウスに長期投与し、腸内細菌叢、糞便代謝物、遺伝子発現などの様々な生体への効果を解析した。まず加齢に伴う腸内細菌叢、糞便代謝物、遺伝子発現の変化を詳細に解析した結果、腸内細菌叢の構成は加齢に伴い 21 ヶ月齢で変化した。腸内代謝物は炭水化物・SCFA に関する代謝パスウェイの一過的上昇と、アミノ酸・脂質に関する代謝パスウェイの低下が起こり、大腸・肝臓・脾臓で免疫関連遺伝子の発現が上昇した。次に、LB81 ヨーグルトの長期投与実験を行なった結果、Bacteroidetes to Firmicutes ratio の上昇など腸内細菌叢の構成が変化し、腸内のプロピオン酸や酪酸の代謝パスウェイが調整された。また腸管組織の抗菌ペプチド・粘膜バリア遺伝子の発現が改善し、さらに腸管だけでなく肝臓・脾臓で加齢変化とは異なる免疫遺伝子の発現が変化し、免疫機能の加齢性変化を調整する可能性が示唆された。

加齢性変化に対する probiotics の効果の解析の研究成果

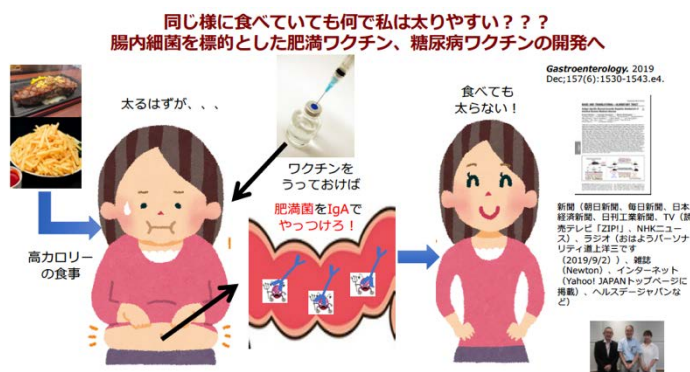


4. 今後の展開

次世代シーケンサーの開発に伴い、様々な疾患において腸内細菌の異常が認められることが明らかになっている。加えて、上述した様に疾患発症に直接関わる

pathobiont が、次々に同定されている。今後、腸内細菌の異常を是正し、有益菌を殺傷せず pathobiont を特異的に排除する新しい疾患治療法の開発が期待される。今回、構築した全ゲノム解析による日本人 100

名の細菌叢とウイルス叢のデータベースは、今後の疾患メタゲノム解析のコントロールとして非常に重要になると考える。これらを用いて、疾患の原因となる新規の pathobiont の同定がより効率的に行えると考える。また、構築したウイルス叢の解析基盤により、pathobiont に感染するファージの検出も可能となる。これらの情報から、ファージ由来の溶菌酵素を同定し、革新的かつ特異的な次世代ファージ療法の開発が可能になると考える。実際、このメタゲノムデータベースを用いて、肥満・糖尿病との関連が指摘されている C. ramosum に関して、日本人でも肥満者に顕著に増加していることを報告している。これらの情報を基盤として、C. ramosum を標的とした粘膜ワクチンの開発を進めている (Gastroenterology. 2019 Aug 21. pii: S0016-5085(19)41241-9.)。腸内微生物叢を標的とした革新的な治療法の創出につながっていくものとする。



実際に、このメタゲノムデータベースを用いて、肥満・糖尿病との関連が指摘されている C. ramosum に関して、日本人でも肥満者に顕著に増加していることを報告している。これらの情報を基盤として、C. ramosum を標的とした粘膜ワクチンの開発を進めている (Gastroenterology. 2019 Aug 21. pii: S0016-5085(19)41241-9.)。腸内微生物叢を標的とした革新的な治療法の創出につながっていくものとする。

5. 発表実績

【論文発表・出版】

1. Fujimoto K, **Uematsu S**. Development of prime-boost-type next-generation mucosal vaccines. *Int Immunol*. 2019 Dec 28. pii: dxz085.
2. Fujimoto K, Kawaguchi Y, Shimohigoshi M, Gotoh Y, Nakano Y, Usui Y, Hayashi T, Kimura Y, Uematsu M, Yamamoto T, Akeda Y, Rhee JH, Yuki Y, Ishii KJ, Crowe SE, Ernst PB, Kiyono H, **Uematsu S**. Antigen-specific Mucosal Immunity Regulates Development of Intestinal Bacteria-mediated Diseases. *Gastroenterology*. 2019 Aug 21. pii: S0016-5085(19)41241-9.

3. Usui Y, Kimura Y, Satoh T, Takemura N, Ouchi Y, Ohmiya H, Kobayashi K, Suzuki H, Koyama S, Hagiwara S, Tanaka H, Imoto S, Eberl G, Asami Y, Fujimoto K, **Uematsu S**. Effects of long-term intake of a yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 and *Streptococcus thermophilus* 1131 on mice. *Int Immunol*. 2018 Jun 26;30(7):319-331.
4. Ouchi Y, Patil A, Tamura Y, Nishimasu H, Negishi A, Paul SK, Takemura N, Satoh T, Kimura Y, Kurachi M, Nureki O, Nakai K, Kiyono H, **Uematsu S**. Generation of tumor antigen-specific murine CD8+ T cells with enhanced anti-tumor activity via highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing. *Int Immunol*. 2018 Apr 3;30(4):141-154.
5. Takemura N, Kurashima Y, Mori Y, Okada K, Ogino T, Osawa H, Matsuno H, Aayam L, Kaneto S, Park EJ, Sato S, Matsunaga K, Tamura Y, Ouchi Y, Kumagai Y, Kobayashi D, Suzuki Y, Yoshioka Y, Nishimura J, Mori M, Ishii KJ, Rothenberg ME, Kiyono H, Akira S, **Uematsu S**. Eosinophil depletion suppresses radiation-induced small intestinal fibrosis. *Sci Transl Med*. 2018 Feb 21;10(429). pii: eaan0333.

【講演】

1. **植松 智**、「腸内ウイルス叢の解析について」、第 83 回日本インターフェロンサイトカイン学会シンポジウム、平成 30 年 7 月 26 日、東京、日本
2. **植松 智**、「腸内微生物叢解析の最前線」、第 49 回日本小児消化管機能研究会、平成 31 年 2 月 16 日、大阪、日本
3. **植松 智**、「Dysbiosis 関連疾患の制御法の開発」、微生物ウィーク 2019、特別講演、2019/7/22、東京、日本
4. **植松 智**、「抗原特異的な粘膜免疫は腸内細菌が介在する疾患の発症を制御する」、第 13 回次世代アジュバント研究会、招待講演、令和 2 年 1 月 21 日、大阪、日本
5. **植松 智**、「革新的な粘膜免疫誘導型アジュバントの実用化研究」、令和元年度創薬基盤推進研究事業公開シンポジウム、招待講演、令和 2 年 2 月 3 日、東京、日本