

46. マルチオミクス解析による腸内細菌共生システムの解明

中西 裕美子

Key words: 腸内細菌, オミクス統合解析,
メタボローム解析, ノトバイオートマウス

*慶應義塾大学
大学院政策・メディア研究科

緒 言

ヒト腸内には数 100 種類, 100 兆個の腸内細菌が生息しており, それら腸内細菌叢の改善はヒトの健康維持・増進に有益であると同時に, 腸内細菌叢の破綻や異常は病原菌の感染, アレルギー, 生活習慣病など多くの疾患の発症に関与することが報告されている。腸内細菌叢を改善するプロバイオティクス等投与によりこれら疾患の改善・予防効果が高まることは多数報告されているが, 複雑な腸内細菌全体の挙動を一度に明らかにし腸内環境全体を把握することは極めて困難であり, その分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。われわれは, 腸内細菌が産生する代謝物の機能性に着目し, 腸内細菌をターゲットとしたメタボローム解析を行い, 腸内細菌間, 腸内細菌-宿主間における代謝産物の機能性について明らかにしてきた^{1,2)}。本研究では, 腸内細菌を正常化できる最小単位モデルである 8 種類の細菌で構成された Altered Schaedler Flora (ASF)³⁾ を用いることで, 腸内環境を正常化する細菌の機能性物質の探索や正常化の機構について解析を行う。ASF 細菌を無菌マウスに定着させると, 無菌マウスで起こる盲腸の肥大化が抑制されると共に, 免疫応答の抑制に重要な役割を果たす制御性 T 細胞 (Treg 細胞) の分化・誘導を促すことが報告されており⁴⁾, ASF 細菌が宿主粘膜免疫系において重要な役割を果たしていることから, 腸内細菌叢の最少単位モデルとして最適である。本研究では, ASF8 菌種を定着させたノトバイオートマウス (ASF 定着マウス) を作製し, ASF フローラマウスの宿主-腸内細菌間相互作用について, ASF 定着マウスの腸内細菌叢解析とメタボローム解析を統合したマルチオミクス解析手法を用いて, ASF 細菌による腸内環境正常化機構を明らかにすることを目的に解析を行った。

方法および結果

1. ASF 細菌の定着と盲腸サイズはマウス系統により異なる

腸内細菌叢の一般的な通常化指標として盲腸サイズの標準化があげられる⁵⁾。無菌マウスに ASF 細菌を定着させると盲腸サイズが縮小し, コンベンショナルマウスの腸内に類似した機能性を示すとの報告^{3,6)}もあることから, 本実験でも ASF 細菌を定着させたマウスの盲腸サイズについて調べた。IJI/Jic(IJI), C57BL/6J(B6J), BALB/c(BALB) の無菌マウスに, ASF 細菌が定着した IJI マウスの糞便懸濁液を 8 週齢にて経口投与し, 盲腸重量/体重の割合を調べた (図 1A)。通常の SPF マウスやコンベンショナルマウスでは体重 25 g~30 g, 盲腸重量は 1 g 以下 (盲腸重量/体重の割合として 0.03~0.04) であることから B6J マウスでは盲腸の肥大が抑制されていないことが分かった。そこで, 定着を開始する時期の影響を考え, より幼少期 (3 週齢) の B6J マウスに ASF 細菌を定着させて比較したところ, 3 週齢で ASF を定着させたマウスでは個体差が大きく有意差はなかったが, 盲腸重量が減少する傾向があったことから (図 1B), ASF 細菌の定着時期も腸内環境の通常化に必要な要因であることが示唆された。次に, 各マウス系統に定着した ASF 細菌の細菌叢を調べた。ASF 細菌を定着させたマウスの糞便から DNA を抽出し, ASF 細菌に特異的なプライマー³⁾ を作製し定量 PCR 法により各細菌の数を調べたところ, 各系統により定着する ASF 細菌の数がかなり異なることが分かった (図 1C)。すべての系統で ASF519 (*B. distasonis*-*Porphyromonas*) が細菌叢全体の 50%以上を占めることが分かった。ASF360 (*Lactobacillus* sp.) は B6J マウスや BALB マウスではほとんど検出されなかった。

*現所属: 理化学研究所 統合医科学研究センター 粘膜システム研究グループ

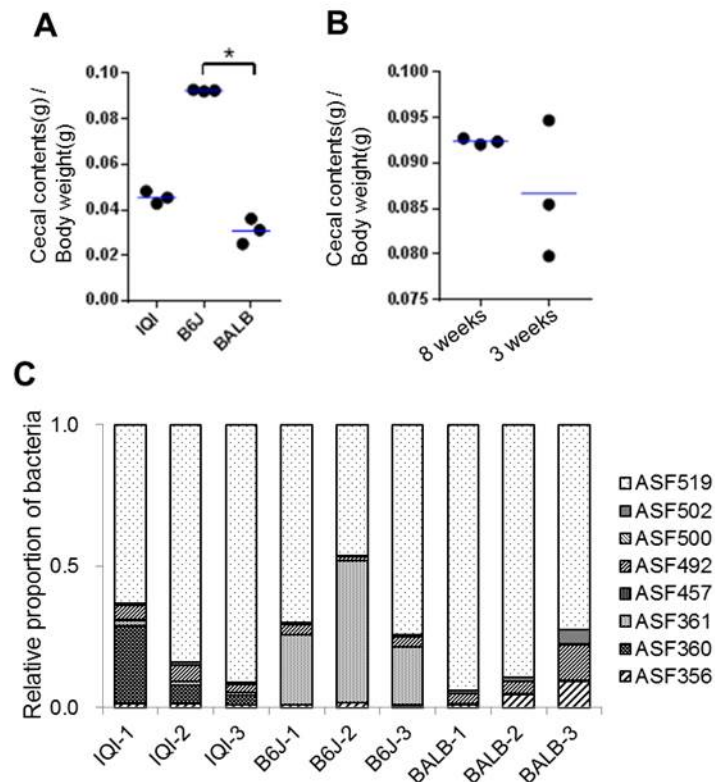


図1. ASF 定着マウスの盲腸サイズと細菌叢。

A) 無菌 IQI マウス, 無菌 B6J マウス, 及び, 無菌 BALB マウスに 8 週齢で ASF 細菌を経口投与し, 17 週齢で盲腸重量と体重を計測した. 盲腸重量 (g) / 体重 (g) の割合を示す. (* $P < 0.01$, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test). B) 無菌 B6J マウスに 8 週齢, または, 3 週齢で ASF 細菌を経口投与し, 17 週齢, または, 12 週齢で盲腸重量と体重を計測した. 盲腸重量 (g) / 体重 (g) の割合を示す. C) ASF 細菌を経口投与した 3 系統のマウスの糞便中の腸内細菌叢を示す. ASF 細菌特異的プライマーを用いて定量 PCR 法により腸内細菌叢を解析した. グラフは総菌数を 1 としたときの各 ASF 細菌の割合を示す.

2. *In vitro* 培養下の ASF 細菌の有機酸産生

ASF 細菌を *in vitro* 培養し, 腸内細菌の主要な代謝産物であり様々な機能性をもつ有機酸⁷⁾の産生量を調べた (図 2). ASF 細菌をそれぞれ嫌気培養し, 回収した菌体から水溶性代謝物を抽出し, キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) により代謝物を計測した. *In vitro* 培養条件下で, ASF356 (*Clostridium* sp.), ASF492 (*Eubacterium plexicaudatum*), ASF519 の細菌が Butyric acid を産生することがわかった. Butyric acid は, 結腸上皮におけるタイトジャンクションタンパク質の発現を増加させ, 腸管上皮細胞のバリアー機能を増加させることや⁷⁾, Treg 細胞の分化を促すことも報告されており⁸⁾, ASF356, ASF492, ASF519 が腸内細環境の正常化に重要な役割をしている可能性がある.

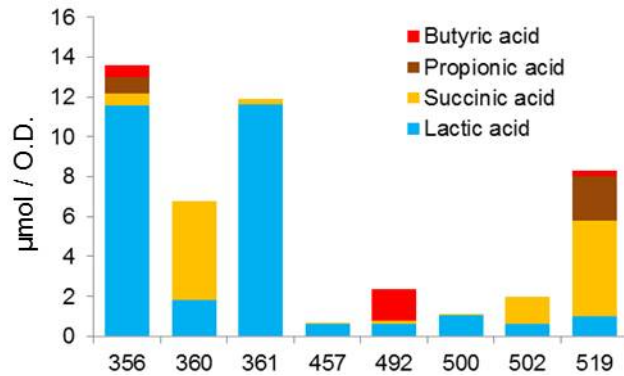


図2. *In vitro* 培養下の ASF 細菌の有機酸産生量.

縦軸は ASF 細菌の有機酸産生量 ($\mu\text{mol}/\text{O.D.}$) であり, 各 ASF 細菌を培養し, $\text{OD}_{600}=1.0$ の培養液 1 ml 中の有機酸量を示す. 横軸は ASF 細菌 8 種の番号を示す.

3. メタボローム解析による ASF 定着マウスの生理的評価

ASF 定着マウスの生理状態を評価するため, ASF 定着 B6J (ASF-B6J) マウスと SPF-B6J マウス (SPF 施設で飼育した C57BL/6J マウス) の肝臓中代謝物の比較を行った (図3). 肝臓中の ATP 濃度, グルコース 6 リン酸 (G6P), グルコース 1 リン酸 (G1P), フマル酸 (Fumarate) 等の解糖系や TCA 回路の関連物質濃度が ASF-B6J マウスと SPF-B6J マウスでほとんど変わらなかったことから, ASF 定着マウスは肝臓でのエネルギー代謝やグルコース代謝が SPF マウス同様に正常な状態であることがわかった. さらに, 肝臓の重要な働きとしてアミノ酸の異化が挙げられるが, アミノ酸に関しては Arg が SPF-B6J マウスと ASF-B6J マウスで差が見られたものの, その他のアミノ酸は大きな差は見られなかったことから, アミノ酸代謝も正常な状態であることがわかった.

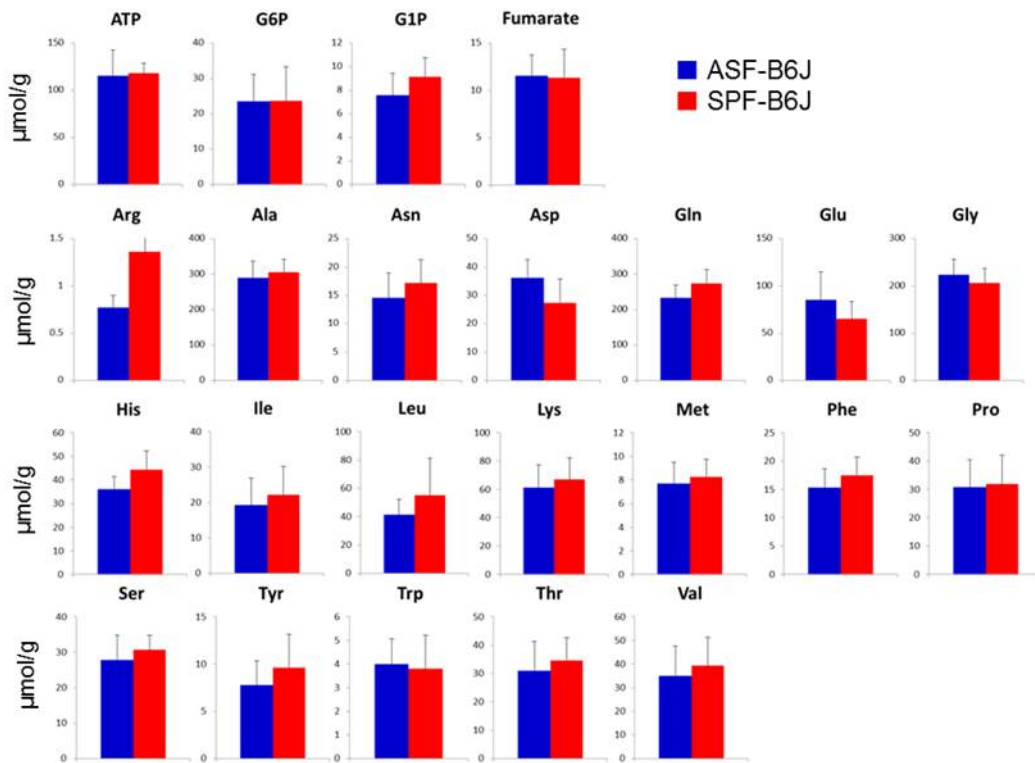


図3. ASF-B6J マウスと SPF-B6J マウスの肝臓中の代謝物濃度.

無菌 B6J マウスに 3 週齢で ASF 細菌を経口投与し ASF-B6J マウスを作製した. SPF-B6J マウスは 3 週齢の SPF マウスを購入し, 12 週齢まで無菌アイソレーター内で維持した. それぞれ 12 週齢にて解剖し肝臓を採取した. 採取した肝臓から水溶性代謝物を抽出し CE-TOFMS により代謝物を計測した.

さらに, ASF-B6J マウスと SPF-B6J マウスの血清中と尿中の Trimethylamine *N*-oxide 濃度を調べた. 必須栄養素である Choline は食物中に多量に含まれており, 腸内細菌は Choline を代謝し腸管内で Trimethylamine に変換する. 吸収された Trimethylamine は肝臓で Trimethylamine *N*-oxide (TMAO) に変換されるが, TMAO は肝臓と心臓血管疾患のリスクに関与することが報告されており⁹⁾, 腸内細菌叢の変動とこれら疾患にかかわるバイオマーカーとして評価できる. 血清中と尿中共に, ASF-B6J マウスでは SPF-B6J マウスよりも TMAO 濃度が低かった. 次に, マウスの糞便中の代謝物を計測し腸内で機能性をもつビタミンや有機酸等の有用物質の産生量を分析した (図4). 有機酸では Propionic acid と Butyric acid が ASF 定着マウスでは SPF-B6J マウスよりも濃度が低かった. Nictineamide も ASF 定着マウス (ASF-B6J マウスと ASF-IQI マウス) では SPF-B6J マウスよりも濃度が低かった.

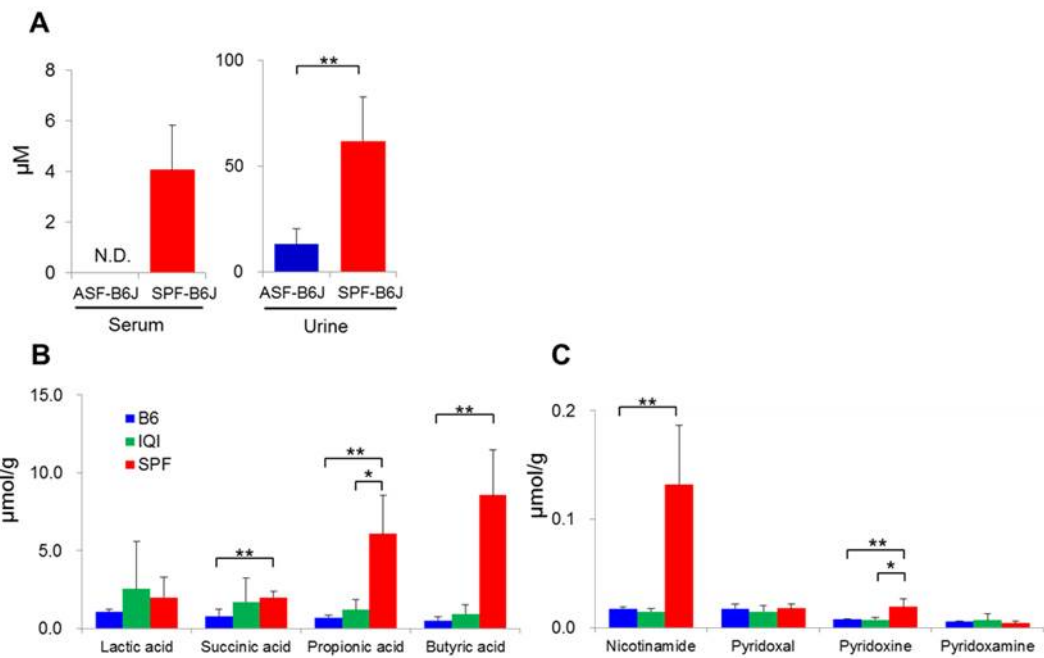


図4. ASF 定着マウスと SPF マウスの血清，尿，糞便中の代謝物濃度。

A) ASF-B6J マウスと SPF-B6J マウスの血清中と尿中の TMAO 濃度 (** $P < 0.01$, Mann-Whitney U test). B) ASF-B6J マウス， ASF-IQI マウス， 及び SPF-B6J マウスの糞便中の有機酸とビタミンの濃度 (** $P < 0.01$, * $P < 0.01$, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test).

考 察

腸内環境正常化の指標である盲腸のサイズについてはマウス系統間で差があることが分かった。B6J マウスの結果から腸内細菌叢が定着する時期がより早いほど、盲腸サイズが縮小する傾向がみられたことから、腸内細菌叢の定着時期も腸内環境正常化には重要な要因であることが示唆された。腸内細菌叢解析からマウス系統により定着する細菌が異なるため、腸内細菌叢の構成も盲腸サイズに影響を与えている可能性が考えられた。また、ASF 定着マウスと SPF マウスの生体サンプルのメタボローム解析から、ASF 定着マウスの糞便中代謝物では有機酸やビタミンの生産量が SPF マウスよりも低く、ASF8 菌種では SPF マウスと同程度の腸内環境にはならない可能性が示唆されたが、肝臓中の代謝物に大きな差異は見られないことから、ASF 定着マウスは栄養や生理的な恒常性は正常な状態であることが示唆された。今後は、マウスの系統ごとにメタボローム解析を行い比較していくことで、それぞれの系統の遺伝的差異が腸内細菌定着にどのように関わるかを評価していきたい。

共同研究者

本研究は、公益財団法人 実験動物中央研究所の野津量子氏，植野昌未氏，小倉智幸氏，何 裕遥氏，及び慶應義塾大学先端生命科学研究所の福田真嗣博士との共同研究として実施した。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Nakanishi, Y., Fukuda, S., Chikayama, E., Kimura, Y., Ohno, H. & Kikuchi, J. : Dynamic omics approach identifies nutrition-mediated microbial interactions. *J. Proteome Res.*, **10** : 824-836, 2011.
- 2) Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M. & Ohno, H. : Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, **469** : 543-547, 2011.

- 3) Dewhirst, F. E., Chien, C. C., Paster, B. J., Ericson, R. L., Orcutt, R. P., Schauer, D. B. & Fox, J. G. : Phylogeny of the defined murine microbiota: altered Schaedler flora. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65** : 3287-3292, 1999.
- 4) Geuking, M. B., Cahenzli, J., Lawson, M. A., Ng, D. C., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K. D. & Macpherson, A. J. : Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity*, **34** : 794-806, 2011.
- 5) Itoh, K. : Production of the standard intestinal flora for experimental animals raised under barrier sustained conditions. *Experimental animals*, **39** : 1-8, 1990.
- 6) Deloris, A. A., Orcutt, R. P. Henry, J. C. Baker, J. Jr, Bissahoyo, A. C. & Threadgill, D. W. : Quantitative PCR assays for mouse enteric flora reveal strain-dependent differences in composition that are influenced by the microenvironment. *Mammalian Genome*, **17** : 1093-1104, 2006.
- 7) Fukuda, S. & Ohno, H. : Gut microbiome and metabolic diseases. *Semin. Immunopathol.*, **36** : 103-114, 2014.
- 8) Furusawa, Y., Obata, Y. Fukuda, S. Endo, T. A. Nakato, G Takahashi, D. Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N. N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., Hase, K. & Ohno, H. : Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, **504** : 446-450, 2013.
- 9) Koeth, R. A., Levison, B. S., Culley, M. K., Buffa, J. A., Wang, Z., Gregory, J. C., Org, E., Wu, Y., Li, L., Smith, J. D., Tang, W. H., DiDonato, J. A., Lusis, A. J. & Hazen, S. L. : gamma-Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO. *Cell Metabo.*, **20** : 799-812, 2014.