

## 59. 免疫・上皮に強く影響する腸内細菌種の同定と応用

本田 賢也

慶應義塾大学 医学部 微生物学免疫学教室

Key words : 腸内フローラ, 腸管免疫

### 緒言

消化管腔には約 1,000 種の細菌が腸内フローラを構成し、宿主の生理機能に大きな影響を与えている。ヒトマイクロバイオームプロジェクト (HMP) や MetaHIT プロジェクトなどの大型プロジェクトが、米国や欧州において開始され、ヒト腸内フローラに含まれるすべての細菌のゲノム塩基配列を、次世代シーケンサーを用いて直接解読してゆくメタゲノム解析が進んでいる。この解析から、腸内フローラは、ヒトの 100 倍から 1,000 倍にも及ぶ遺伝子を保有していることが明らかになり、以前の予想を遙かに上回る多彩な機能を持つことがわかってきた。実際、腸内フローラは、宿主の腸管および全身性の生理活動や健康維持においてなくてはならない働きをしており、逆に、腸内フローラの機能異常は、様々な慢性疾患の原因・増悪因子となりうる。例えば、慢性炎症性腸疾患・関節リウマチ・気管支喘息・糖尿病・肥満・移植片対宿主病 (GVHD) ・肝硬変などの患者において、健常者と有意に異なる腸内細菌組成がみられることが報告されている。こうした疾患に関連する異常フローラは「dysbiosis」とよばれ、菌種の減少と単純化、さらには潜在的な病原性を持つ細菌（「pathobiont」と呼ばれる）の増殖がその特徴である。さらに最近、「便移植」が、難治性偽膜性腸炎に対して極めて効果的であったという無作為抽出試験が発表された。この便移植の有効性は、dysbiosis がある種の疾患の「原因」となることを示すと同時に、dysbiosis の改善が極めて強力な治療法となりうることをはっきりと示した proof of principle と言える。しかし世界的な大規模プロジェクトの進展にもかかわらず、今のところ腸内フローラを標的とした画期的な治療法は、便移植以外に見いだせていない。こうした状況は、腸内フローラを構成する個々の菌種の機能理解が進んでいないことに起因すると考えられる。実際、腸内フローラ構成菌種の半数以上がいまだに未分離・未培養の菌種であり、それぞれが宿主に与える機能は明らかになっていない。逆に言えば、個々の菌種の単離と機能解明が進めば、新たな疾病対策・治療開発に結びつく可能性が高いといえる。

我々は、ノトバイオーム技術・嫌気性菌培養技術・メタゲノム解析技術を組み合わせた統合的なフローラ解析法を樹立し、腸内フローラを細分化して宿主の生理機能と明確に関連づける研究を推進してきた。その一つの成果として、インターロイキン-17 を高産生する T 細胞 (Th17 細胞) を特異的に誘導するマウス腸内細菌として、セグメント細菌 (Segmented filamentous bacteria) を同定した<sup>1)</sup>。Th17 細胞は、細菌・真菌に対する感染防御に重要な役割を果たすと同時に、自己免疫・アレルギー・慢性炎症の原因となる。したがって Th17 細胞の分化を人為的に増加させることができれば、感染症制御に繋がり、逆に減少させることが出来れば、自己免疫疾患・アレルギー・慢性炎症治療に繋がると考えられる。

本研究では更に発展させるため、セグメント細菌による Th17 細胞誘導の細胞分子メカニズムを探索した。その結果、セグメント細菌は上皮に接着し、上皮を強く活性化することで Th17 細胞誘導していることが明らかになった<sup>2)</sup>。さらに、ヒト腸内細菌の中で Th17 細胞誘導する細菌種を探索し、潰瘍性大腸炎患者便から 20 種の細菌を単離した<sup>2)</sup>。これらヒト由来の 20 種類の細菌も、上皮に接着する特徴を持っていたことから、セグメント細菌と同様の機序で Th17 細胞を誘導すると考えられた。

### 方法

セグメント細菌による Th17 細胞誘導メカニズムの解明、及びヒト Th17 細胞誘導細菌の同定のため、本研究では、ノトバイオーム技術・嫌気性菌培養技術・次世代シーケンサーによる腸内細菌叢解析 (メタゲノム解析) の 3 つの技術を

組み合わせた統合的なアプローチを用いた。ノトバイオートとは、その動物が持っている微生物を完全に把握できている動物のことを意味する。特定の腸内細菌種を、無菌マウスに、無菌アイソレーター内で投与することで、投与した細菌種だけが存在するノトバイオートマウスを作製出来る。日本の多くの先達によって発展・確立してきたため、日本に大きな優位性がある。さらに日本には非常に優れた嫌気性菌の培養技術があり、単離した菌株ストックも充実している。そして、宿主に強く影響を与える腸内細菌種を絞り込む手順もある程度確立している。こうした独自の技術・知識・マテリアル基盤を、新たな解析システムに活用することで、世界をリードする腸マイクロバイオーーム研究を推進できる環境にある。我々は、ノトバイオート技術・嫌気性菌培養技術・次世代シーケンサーによる腸内細菌叢解析（メタゲノム解析）の3つの技術を組み合わせた統合的なアプローチにより、腸内細菌叢の複雑さと免疫細胞の機能を関係づける独自の方法論を開発した。この方法を用いることで、消化管 Th17 細胞を特異的に誘導する細菌種としてセグメント細菌を同定した<sup>1)</sup>。セグメント細菌はマウス小腸に生息し、その上皮に強力に接着する細菌である。セグメント細菌は、マウスだけではなく、ラットの消化管にも生息している。ラットに生息するセグメント細菌は、マウスのセグメント細菌と形態もゲノム配列も類似しているが、マウス SFB とは別の種に属する。そこで本研究では、マウス SFB とラット SFB を比較することで、マウス SFB による Th17 細胞誘導における、責任分子・メカニズムを解析・同定することを目的として研究を推進した<sup>2)</sup>。

さらに、Th17 細胞を誘導するヒトの腸管に常在する細菌種を同定するため、健康人及び潰瘍性大腸炎患者便を収集し、それぞれ無菌マウスに投与し Th17 細胞誘導が見られた便サンプルから更に Th17 細胞誘導細菌を絞り込んだ<sup>2)</sup>。

## 結 果

まず、セグメント細菌による Th17 細胞誘導メカニズムを明らかにすることを目的として研究を推進した。まずマウスセグメント細菌とラットセグメント細菌を、それぞれ無菌マウスに投与した。ラットセグメント細菌はマウス消化管内で増殖したもの、マウスセグメント細菌のような小腸上皮への接着は見られなかった。さらにマウスセグメント細菌が強力に Th17 細胞を誘導したのに対し、ラットセグメント細菌は Th17 細胞を全く誘導しなかった。小腸上皮細胞を採取して、mRNA 発現を RNA シーケンスによって検討したところ、セグメント細菌が接着したときに Serum amyloid A1 (SAA1) や RegIII の高発現が観察された<sup>2)</sup>。

次に、無菌ラットにマウスセグメント細菌とラットセグメント細菌を投与したところ、ラットセグメント細菌が上皮に接着し、Th17 細胞を誘導したのに対し、マウスセグメント細菌はラット上皮に接着せず、Th17 細胞も誘導できなかった。従って、セグメント細菌の上皮への接着は、宿主特異性があり、接着できない場合、Th17 細胞が誘導できないことが分かった。接着によって上皮に誘導される SAA1 等が Th17 細胞誘導に関与する可能性が示唆された<sup>2)</sup>。

腸管上皮への接着による Th17 細胞誘導は他の細菌種でも観察され、例えば、*Citrobacter rodentium* や大腸菌 O157 は、野生株は大腸上皮細胞に強く接着し Th17 細胞を誘導するが、上皮接着に関わる分子を欠損した *eae* 遺伝子欠損株は Th17 細胞を誘導することが出来ないことがわかった<sup>2)</sup>。

次に、Th17 細胞を誘導するヒト腸内細菌の同定・単離を試みた。健康或いは潰瘍性大腸炎患者に由来する便サンプルを無菌マウスに投与し、Th17 細胞への影響を FACS で検討した。それにより、ある潰瘍性大腸炎患者便サンプルを無菌マウスに経口投与した際、大腸粘膜固有層において強い Th17 細胞の誘導が観察された<sup>2)</sup>。更にこのマウスにアンマイシンやメトロニダゾールを投与すると、Th17 細胞は減少した。従って、Th17 細胞誘導菌はアンピシリンに耐性で、メトロニダゾール・バンコマイシンに感受性の菌であると考えられた。個々のマウスの腸内細菌叢を次世代シーケンサーにより解析し、潰瘍性大腸炎患者便を投与後、バンコマイシン・メトロニダゾール処理したマウスと、アンピシリン処理したマウスの腸内細菌叢は大きく異なっている事がわかった。Th17 細胞数と相関した菌種を単離するため、アンピシリン処理したマウスの回盲部内容物を培養した。培養は嫌気性菌チャンバーを使い、様々なメディウムを用いて培養した。それにより合計 20 種類の菌種を単離することが出来た。単離した 20 菌株はアンピシリン処理したマウスに定着した腸内細菌種の多くをカバーできていると分かった。単離した 20 菌種は、クロストリジウムやビフィドバクテリウム、ルミノコッカスやバクテロイデスなど広い範囲の菌種を含んでいた。単離した 20 菌株に Th17 細胞誘導能があるかを調べるため、20 菌株すべてを培養し、その混合液を無菌マウスに投与した。20 菌株を投与したノトバイオートマウスにおいて強力な Th17 細胞の誘導が観察された (図 1 A) <sup>2)</sup>。

また、Th17 細胞を誘導する 20 菌株を投与したマウスの腸管を走査電顕で観察したところ、よく洗浄した後でも、多くの細菌が上皮に強く接着していることがわかった (図 1 B) <sup>2)</sup>。その為、この腸管上皮への接着が Th17 細胞誘導に重要であると考えられた。

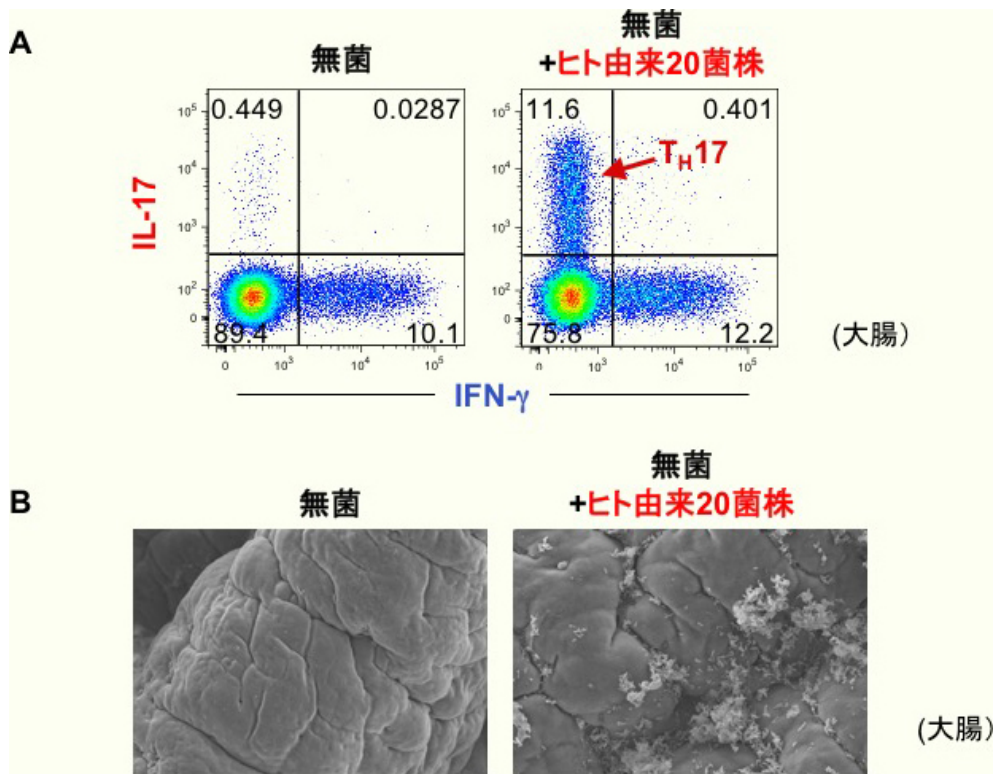


図1. 潰瘍性大腸炎患者便サンプルから単離された20菌株によるTh17細胞誘導

- A) 潰瘍性大腸炎患者便サンプルから単離された20菌株を無菌マウスに投与し、FACSで解析した。20菌株投与ノトバイオームマウス大腸粘膜固有層において、CD4陽性IL-17陽性のTh17細胞の顕著な増加が観察された。
- B) 上記マウスの大腸粘膜を透過電子顕微鏡観察した。20菌株投与ノトバイオームマウス大腸に多数の細菌の接着が観察された。

## 考察

マイクロバイーム研究に対する関心・期待は以前にも増して高まっている。潰瘍性大腸炎、クローン病、多発性硬化症、肥満、糖尿病、高脂血症、喘息、アトピー性皮膚炎、これらはすべて右肩上がり患者数が増加している疾患である。特に、潰瘍性大腸炎・クローン病・多発性硬化症は、厚生労働省の難病指定となっており、医療費助成の対象となっているが、今後このまま患者数が増加すれば、助成基準の厳格化や難病指定からの除外を考慮せざるを得ない状況も考えられ、社会問題となっている。このような罹患者数の漸増が、遺伝的要因によるとは考えにくく、外的要因、とくに腸内フローラの変化の関与が強く疑われている。腸内フローラを標的とした治療法の開発は、安価であるだけでなく、疾患の根本治療となる可能性があり、難治疾患の決定打となる可能性がある。また腸内フローラの理解は、健康維持や疾病予防という観点からも重要である。

Th17細胞は真菌や細胞外寄生細菌の排除に重要な働きをするヘルパーT細胞である。一方、Th17細胞の過剰な活性化は炎症性腸疾患や自己免疫疾患の発症につながる事が示唆されている。本研究成果は今後、効果的なTh17細胞誘導を導くプロバイオティクスへの応用や、腸内細菌の人為的操作による炎症性腸疾患や自己免疫疾患の治療や予防法の開発につながる事が期待される。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、慶應義塾大学医学部の新幸二、須田互、理化学研究所統合生命医科学研究センターの田之上大、永野勇治、成島聖子、渡辺栄一郎、大野博司、陣野原俊、近藤隆、ヤクルト中央研究所の梅崎良則、安藤稔、今岡明美、ミシガン大学医学部の鎌田信彦、Gabriel Nuñez、東京大学大学院新領域創成科学研究科の服部正平、理化学研

究所環境資源科学研究センターの豊岡公徳、岐阜薬科大学薬学研究科の杉山剛志、横山慎一郎、所俊志、森裕志、麻布大学獣医学部の森田英利、野口由里香、コロンビア大学医学部の Ivaylo I. Ivanov、マックスプランク進化人類学研究所の J. Gray Camp である。

## 文 献

- 1) Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*. 2009 Oct 30;139(3):485-98. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033. PubMed PMID: 19836068; PubMed Central PMCID: PMC2796826.
- 2) Atarashi K, Tanoue T, Ando M, Kamada N, Nagano Y, Narushima S, Suda W, Imaoka A, Setoyama H, Nagamori T, Ishikawa E, Shima T, Hara T, Kado S, Jinnohara T, Ohno H, Kondo T, Toyooka K, Watanabe E, Yokoyama S, Tokoro S, Mori H, Noguchi Y, Morita H, Ivanov II, Sugiyama T, Nuñez G, Camp JG, Hattori M, Umesaki Y, Honda K. Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell*. 2015 Oct 8;163(2):367-80. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.058. PubMed PMID: 26411289; PubMed Central PMCID: PMC4765954.