

「生体恒常性維持・変容・破綻機構のネットワーク的理解に基づく  
最適医療実現のための技術創出」

平成 24 年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告
----------------

本田 賢也

東京大学大学院医学系研究科・准教授

腸内常在細菌特性理解に基づく難治性疾患新規治療法の開発

## §1. 研究実施体制

### (1)「本田」グループ

① 研究代表者: 本田 賢也 (東京大学、准教授; (独)理化学研究所、客員研究員)

#### ② 研究項目

- [1] マウスクロストリジウム属菌と同等の作用を持つ、**Treg**誘導性ヒト腸内細菌を同定・単離する。
- [2] マウスセグメント細菌と同等の作用を持つ、**Th17** 誘導性ヒト腸内細菌を同定・単離する。
- [3] **Th17** 細胞・**Treg**細胞以外の、消化管にユニークな免疫細胞と腸内細菌の影響の検討。

### (2)「大島」グループ

① 主たる共同研究者: 大島 健志朗 (東京大学、特任助教)

#### ② 研究項目

- [1] **Treg**誘導性ヒト腸内細菌のゲノム配列決定とゲノム情報解析を行なう。
- [2] **Th17** 誘導性ヒト腸内細菌のゲノム配列決定とゲノム情報解析を行なう。

### (3)「森田」グループ

① 主たる共同研究者: 森田 英利 (麻布大学、教授)

#### ② 研究項目

- [1] 「本田」グループで実験・調製されたマウスの糞便・回盲部の細菌叢由来ゲノム DNA を精製する。
- [2] 健常者および各種疾病患者の腸内細菌・唾液細菌叢由来ゲノム DNA を精製する。

## §2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

### ヒト消化管に由来する Treg 細胞誘導性細菌種を同定・単離とその characterization

本年度研究開始時点に於いて、健康ボランティア(日本人・男性)の便を、無菌マウスに投与し、大腸 Treg 細胞の集積誘導が確認できていた。さらに便投与したマウスの回盲部内容物を、クロロホルム処理した後、希釈し、別の無菌マウスに投与したところ、そのマウスに於いても大腸 Treg 細胞の誘導が観察された。このクロロホルム処理・希釈・投与を繰り返した。このマウスの回盲部内容物を、次世代シーケンサーによるメタ 16S 解析を行ったところ、約 20 種類のクロストリジウム綱に属する細菌によって構成されていることがわかった。この Treg 細胞誘導菌種が濃縮されたマウスの回盲部内容物を、嫌気性菌培養チャンバー内で様々な培養液を用いて培養し、約 500 個のコロニーを単離した。単離コロニーの 16S rRNA 遺伝子配列を解析した結果、合計 31 菌株が単離できているとわかった。31 菌株の系統樹解析から、それらはいずれもクロストリジウム綱に属しており、8 菌株は他の菌株と相同性が高く、残りの 23 菌株は互いに独立した菌種に属することがわかった。そして 23 菌株は、先の約 20 種類のクロストリジウム綱のほとんどをカバーできているとわかった。そこで、23 菌株をそれぞれ培養した後混合し、菌株混合液を無菌マウスに投与したところ、極めて強力な Treg 細胞誘導が観察された。メタ 16S 解析を行ったところ、23 菌株混合液を投与したマウスには、17 菌株が定着していることがわかった。そこで次に 17 菌株だけでも Treg 細胞を誘導できるかどうかを調べるため、その混合液を無菌マウスに投与したところ、同じように Treg 細胞の誘導が観察された。さらに 17 菌株を投与したマウスは、アレルギー性腸炎モデルや、TNBS 腸炎モデルに対して抵抗性を持つことがわかった。従って現在までに 17 菌株の Treg 細胞誘導性ヒト腸内細菌の単離に成功し、かつそれらは少なくともマウスに於いてアレルギーや炎症性腸疾患に対する抑制効果を持つことがわかった。

次に、17 菌株のゲノム DNA 配列を決定した。その為、それぞれの菌株から単離したゲノム DNA を、次世代シーケンサーによって 2 度解析し、比較的精度の高いドラフト配列を得た。得られたドラフトゲノム配列から遺伝子を予測し、予測遺伝子内には毒素や病原因子が含まれていないことを確認した。従って、臨床応用に際し安全性の高い菌株であると考えられた。

今後、17 菌株による Treg 細胞誘導分子メカニズムを明らかにする。

### ヒト消化管に由来する Th17 細胞誘導性細菌種を同定・単離とその characterization

健康ボランティア(日本人・男性)の便を、無菌マウスに投与したところ、大腸 Th17 細胞の集積誘導が確認できた。この Th17 細胞誘導は、便をクロロホルム処理すると消失したことから、クロロホルム処理に感受性のある細菌が Th17 細胞誘導を担っていると考えられた。今後、Th17 細胞誘導菌種を同定し、単離する。

以上に於いて、各種サンプルからの細菌叢由来ゲノム DNA の精製と細菌培養を森田グループ

が、次世代シーケンサーによる解析を大島グループが、それ以外を本田グループが担当した。次世代シーケンサーによるデータ解析においてより信頼性を高くする方法を開発した(原著論文 4、5)。

#### Th17 細胞・Treg 細胞以外の、消化管にユニークな免疫細胞と腸内細菌の影響の検討

腸内細菌は宿主免疫系に大きく影響を与える。本年度、腸内細菌の存在しない無菌マウスや抗生物質投与マウス、さらには幾つかの遺伝子欠損マウスを用いることで、次のような研究結果を得た。腸内細菌由来の核酸によって、宿主消化管からのサイトカイン(TSLP や IL33)が産生されることや(原著論文 1)、腸内細菌由来の ATP によって Th17 細胞が誘導されることを明らかにした(原著論文 2)。さらに CD4CD8 を共に発現する特殊な上皮間リンパ球が、腸内細菌によって誘導されることも見出した(原著論文 3)。また現在、消化管に存在する自然免疫リンパ球(innate lymphocytes, ILC)も、腸内細菌によって誘導されているという結果を得ているので、今後更にその責任細菌や分子の同定を推進する。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Negishi, Hideo; Miki, Shoji; Sarashina, Hana; Taguchi-Atarashi, Naoko; Nakajima, Akira; Matsuki, Kosuke; Endo, Nobuyasu; Yanai, Hideyuki; Nishio, Junko; Honda, Kenya; Taniguchi, Tadatsugu. Essential contribution of IRF3 to intestinal homeostasis and microbiota-mediated Tslp gene induction. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2012, 109(51), p. 21016-21021. (DOI: 10.1073/pnas.1219482110)
2. Kusu, Takashi; Kayama, Hisako; Kinoshita, Makoto; Jeon, Seong Gyu; Ueda, Yoshiyasu; Goto, Yoshiyuki; Okumura, Ryu; Saiga, Hiroyuki; Kurakawa, Takashi; Ikeda, Kayo; Maeda, Yuichi; Nishimura, Jun-ichi; Arima, Yasunobu; Atarashi, Koji; Honda, Kenya; Murakami, Masaaki; Kunisawa, Jun; Kiyono, Hiroshi; Okumura, Meinoshin; Yamamoto, Masahiro; Takeda, Kiyoshi. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7 controls Th17 cell responses through regulation of luminal ATP in the small intestine. J. Immunol. 2013, 190(2), p. 774-783. (DOI: 10.4049/jimmunol.1103067)
3. Mucida, Daniel; Husain, Mohammad Mushtaq; Muroi, Sawako; van Wijk, Femke; Shinnakasu, Ryo; Naoe, Yoshinori; Reis, Bernardo Sgarbi; Huang, Yujun; Lambolez, Florence; Docherty, Michael; Attinger, Antoine; Shui, Jr-Wen; Kim, Gisen; Lena, Christopher J; Sakaguchi, Shinya; Miyamoto, Chizuko; Wang, Peng; Atarashi, Koji;

- Park, Yunji; Nakayama, Toshinori; Honda, Kenya; Ellmeier, Wilfried; Kronenberg, Mitchell; Taniuchi, Ichiro; Cheroutre, Hilde. Transcriptional reprogramming of mature CD4(+) helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Nat. Immunol.* 2013 14(3), p. 281-289. (DOI: 10.1038/ni.2523)
4. Fukao, Masanori; Oshima, Kenshiro; Morita, Hidetoshi; Toh, Hidehiro; Suda, Wataru; Kim, Seok-Won; Suzuki, Shigenori; Yakabe, Takafumi; Hattori, Masahira; Yajima, Nobuhiro. Genomic analysis by deep sequencing of the probiotic *Lactobacillus brevis* KB290 harboring nine plasmids reveals genomic stability. *PLoS ONE* 2013, 8(3), e60521. (DOI: 10.1371/journal.pone.0060521)
5. Kim, Seok-Won; Suda, Wataru; Kim Sangwan; Oshima, Kenshiro; Fukuda, Shinji; Ohno, Hiroshi; Morita, Hidetoshi; Hattori, Masahira. Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. *DNA Res.* (in press)

### (3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)