=教育講演2=

宿主-腸内フローラ相互作用

大野 博司

(独立行政法人理化学研究所)

Host-Gut Microbiota Interaction

Hiroshi OHNO

(RIKEN, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045)

はじめに

われわれを含む動物の皮膚や粘膜面などの体表面には膨大な数の細菌群が常在している。特にヒト大腸では、内容物1グラムにつき100億~1兆個と地球上のあらゆる環境と比較しても飛び抜けて高密度の細菌群が定着しており、このいわゆる腸内フローラは500~1,000種類、総数100兆個以上にも達する¹⁶⁾ (図1)。これは、約40兆個と試算される、ヒト個体を形成する体細胞数⁴⁾の約3倍にのぼる。さらに、ヒトの遺伝子数が2万数千であるのに対し、腸内フローラは上述のように500~1,000種類の異なる細菌の群集であることから、その総遺伝子数はヒト一人あたり数十万と¹⁸⁾、ヒトのそれをはるかに凌駕する。このように多種多様な腸内フローラ構成菌が菌同士で相互作用し、肝臓に勝るとも劣らない代謝系を形成するとともに、さらに宿主との相互作用により「腸エコシステム」と呼ばれるユニークな環境系を構築している。いみじくもノーベル医学生理学賞を受賞した微生物学者・分子生物学者Joshua Lederberg博士は、動物が真核細胞のみからなるのではなく、腸内フローラに代表される共生微生物との相互作用の上に成り立つ「超生命体(superorganism)」と述べている¹³⁾。すなわち、ヒトの生理・病理を理解するためには、超生命体の本質とも言える腸エコシステムの理解が不可欠と考えられる。本稿では、近年の解析技術の著しい進歩により明らかにされつつある宿主-腸内フローラ相互作用について概説する。

1. メタゲノムによる腸内フローラ遺伝子解析

腸内細菌の分類には、従来は個々の菌を単離培養し、その栄養要求性や代謝産物の生化学的性状解析など、いわゆる細菌学的なアプローチが取られてきた¹⁵⁾。単離培養した菌から十分量のDNAを抽出・精製して塩基配

列を決定することにより、細菌が持つ遺伝子の同定も可能となる。しかし、腸内細菌は嫌気性菌が多く難培養性のものも多いことから、その培養には特殊な嫌気培養装置や技術、労力を要し、さらに従来のサンガー法による塩基配列決定にはかなりの時間とコストを要したことから、腸内フローラの遺伝子解析は限られた優勢菌の情報にとどまっていた。

しかし、微量の水溶液中で一つのDNA断片からPCRによる増幅と塩基配列決定を同時に行うことのできる、いわゆる次世代シーケンサーの台頭とともに、少量のDNAサンプルを用いて、大量の塩基配列情報が比較的 low コストで得られるようになり、今世紀に入ってその様相は一変した。この方法では、個々の菌を単離培養して均一なDNAを用意することなく、腸内フローラ全体からDNAを抽出、断片化し、細菌集団の遺伝子配列を一気に解析可能である。この「メタゲノム解析」がEUやアメリカでは国家プロジェクトとして数年前から推進され、多くのデータが蓄積されつつある。そこでわかってきたことは、病的肥満や炎症性腸疾患などの患者群では正常対照群と比較して、腸内フローラ組成が変化すると

図1. ヒト常在フローラ
(<http://leib.rci.riken.jp/riken/index.html> より引用.)

ともに、菌の多様性も減少する，ということである^{10, 18, 21)}。このような腸内フローラ組成の変化は動脈硬化^{11, 22)}，2型糖尿病^{12, 19)}などでも指摘されている。すなわち，生活の欧米化とともにアレルギーやいわゆる生活習慣病が本邦を含めた先進国で急速に増加してきた背景には，きれいな飲水，抗生物質の汎用（特に幼少期），母乳授乳の減少，核家族化などによる綺麗な衛生環境が危険因子となるとする，いわゆる「衛生仮説」に代わり最近では，人類の長年の狩猟採集・農耕生活とともに共進化してきた腸内フローラの一部が，最近の生活習慣の急激な変化により失われバランスが崩れることで発症リスクが高まるとする「フローラ喪失仮説」が有力視されつつある⁵⁾。

2. 腸内フローラの機能解析法としての統合オミクス手法

メタゲノム解析により腸内フローラを構成する菌群が有する遺伝子配列は明らかとなってきた。しかしこれは，腸内フローラの遺伝子カタログの整備であり，ヒトゲノム全配列解析が完了しても決してヒトの機能の全容が明らかとなったわけではないと同様，メタゲノム解析は腸内フローラ機能解析に向けた第一歩にすぎない。すなわち機能の理解には，各遺伝子がどのように発現し，そのコードする蛋白質がどういう機能を持ち，その結果エフェクターとしての機能を持つどのような低分子代謝物が作られるか，といったことを明らかにする必要がある。

このような腸内フローラの機能解析に向けてわれわれは，網羅的ゲノム配列解析であるメタゲノム解析に加え，ゲノムワイドのエピゲノム解析，網羅的遺伝子発現解析であるトランスクリプトーム・メタトランスクリプトーム解析，代謝物定量解析であるメタボローム解析など，異なる階層の網羅的解析を組み合わせた統合オミクス解析を提唱してきた（図2）。

図2. 統合オミクス手法のイメージ図
(<http://leib.rci.riken.jp/riken/index.html>より引用。)

3. 酪酸によるマウス腸管出血性大腸菌感染死の予防

500～1,000種類にも及び，かつ未知の菌を多数含む腸内フローラを統合オミクス手法で解析しても，得られた結果が正しいか否かを判断することは難しい。そこで，統合オミクス手法が腸内フローラの機能解析に適した手法であるか否かを確認するために，腸内フローラや皮膚のフローラなどの常在細菌叢が全く存在しない無菌マウスに，腸管出血性大腸菌 O157 とビフィズス菌のみを定着させたマウスモデルを解析した⁸⁾。

常在フローラを有する通常環境のマウス (conventional) ないし SPF マウスでは，経口投与された O157 は腸内フローラとの競合に勝てずに増殖することなく排菌され，マウスは無症状である。しかし無菌マウスでは，O157 は十分増殖して志賀毒素を産生し，マウスは血中に移行した毒素により死亡する。一方，無菌マウスにあらかじめビフィズス菌を経口投与しておくと，その後の O157 によるマウス感染死を予防できる株（予防株）と予防できない非予防株が存在する²³⁾。予防株，非予防株ビフィズス菌存在下において，O157 は単独投与時とほぼ遜色なく増殖し，また志賀毒素産生量もほぼ同等であるが，血中に移行する志賀毒素量は予防株定着マウスでは非予防株定着マウスと比較して著しく低値となる。また，詳細な病理組織学的検討の結果，O157 単独投与群および非予防株+O157 投与群で大腸末端部に上皮細胞のアポトーシスと軽度の炎症が見られたが，予防株+O157 投与群では炎症像は全く認められなかった⁸⁾。これらのことから，O157 感染により大腸下部に惹起される炎症が予防株の存在により抑えられるために，炎症による組織損傷部位からの志賀毒素の血中への移行も抑えられ，結果としてマウス感染死が予防されたと考えられた。

上記の予防株と非予防株の違いが，両者がマウス腸管内で産生する代謝物の違いに起因するとの仮定のもと，予防株および非予防株定着マウスの糞便の網羅的低分子代謝物解析（メタボローム解析）を行ったところ，予防株群では非予防株群と比較して有意な糖の減少と酢酸の増加が認められた。酢酸基が共有結合しており，摂取すると徐放性に酢酸を遊離する酢酸加でんぷんを非予防株定着マウスに混餌で与えると，その後の O157 による感染死を予防できることから，酢酸が予防株による O157 感染死のメカニズムの少なくとも一端を担っていることが示唆される⁸⁾。

予防株・非予防株定着マウスから調整した大腸上皮のトランスクリプトーム解析，ならびに大腸上皮細胞株に酢酸と O157 を添加した培養系を用いた実験から，酢酸が大腸上皮細胞に作用して，エネルギー代謝・抗炎症作用関連遺伝子群の発現を亢進させることで，O157 感染による上皮細胞のアポトーシスを阻止していることがわかった。さらに，予防株・非予防株の全ゲノム配列の比

較解析と炭素源をブドウ糖あるいは果糖に限定した培養アッセイから、予防株、非予防株ともブドウ糖トランスポーターを有しており、効率よくブドウ糖を代謝して酢酸を産生するが、果糖トランスポーターは予防株のみが保持しており、その結果果糖を炭素源とした場合には予防株のみが効率的に酢酸を産生できることがわかった⁸⁾。

以上まとめると、大腸上部までは予防株・非予防株とも豊富に存在するブドウ糖を利用してO157による上皮細胞死を抑制するのに十分量の酢酸を産生するが、ブドウ糖が不足する大腸下部においては果糖トランスポーターを有する予防株のみが果糖を利用して十分量の酢酸を産生するのに対し、果糖トランスポーター遺伝子を欠損する非予防株定着マウスでは酢酸産生量が不十分となり、O157感染による上皮細胞死を伴う炎症部位から志賀毒素が体内に移行してマウスは感染死する(図3)。この結果はまた、はじめから酢酸に照準を当てるといったバイアスをかけることなく、網羅的解析を組み合わせて結論を導き出せるという点において、統合オミクス手法が宿主-腸内フローラ相互作用の機能解析に適した研究手法であることを示すものである。

4. 腸内フローラが産生する酪酸による 大腸制御性T細胞誘導促進

宿主-腸内フローラ相互作用の一つに、宿主免疫系への影響がある。主要な腸内フローラ構成菌群の一つであるFirmicutes門に属するClostridiales目細菌群によって大腸の末梢誘導性の制御性T細胞(peripherally derived regulatory T cell; pTreg)数が増大することが示された^{2, 3)}。TregはCD4陽性T細胞の1サブセットであり、過剰・異常な免疫応答を負に制御し、自己免疫、アレルギー、遷延する炎症などを抑制することで免疫恒常性を

保つために重要である²⁰⁾。Tregの分化にはマスター転写因子Foxp3の発現が必要であり、Foxp3を発現することでT細胞はTregへと分化する。Tregの分化には、胸腺で自己抗原に強く反応するT細胞受容体(TCR)を発現するT細胞が選択されて成熟した後に末梢に現れる胸腺由来のtTreg (thymus-derived Treg)と、他のCD4陽性ヘルパーT細胞サブセット同様、ナイーブT細胞から末梢で抗原+TGF β などのサイトカイン刺激により分化するpTregの二つの異なる経路がある^{1, 14)}。

無菌マウスの特徴の一つとして、保水性に富み粘調な難消化性食物繊維が貯留することによる盲腸の膨満がある。無菌マウスにClostridiales目を定着させると大腸pTregの増加と同時に盲腸サイズの正常化が起こる。そこで、難消化性食物繊維のClostridialesによる代謝産物がpTregの分化促進に重要ではないかと考え、高繊維餌と低繊維餌で飼育したClostridiales定着マウスの大腸pTreg数を比較したところ、低繊維餌群では高繊維餌群と比較してpTreg数が有意に低かった。低繊維餌群と高繊維餌群の盲腸内容物中の低分子量代謝物をNMRによるメタボロームで比較解析した結果、短鎖脂肪酸のうち酪酸、プロピオン酸、酪酸、ならびにアミノ酸のうちロイシン、イソロイシン、 γ アミノ酪酸が高繊維餌群で特に多く検出された。そこでこれらの物質のTreg誘導能を検証した結果、*in vitro*および*in vivo*のTreg誘導系において酪酸が強く、プロピオン酸は中等度にTreg誘導活性を示し、酪酸ならびにアミノ酸には活性は認められなかった⁹⁾。

酪酸はヒストン脱アセチル化酵素(histone deacetylase; HDAC)の阻害活性を有することは古くから知られている^{6, 7)}。HDACによりヒストンC末が脱アセチル化されると、DNAのヒストンへの巻きつきがきつくなり、DNAへの転写因子のアクセスがしにくくなる。逆に、

図3. 予防株と非予防株の違いのイメージ図
詳細は本文参照。(http://leib.rcai.riken.jp/riken/index.html より引用。)

図4. 腸内細菌が産生する酪酸によるpTregの分化促進と腸管免疫工場製の維持のイメージ図
詳細は本文参照。(http://leib.rcai.riken.jp/riken/index.html より引用.)

アセチル化ヒストンに対してはDNAの結合は弱まるため、転写因子がアクセスしやすくなる。すなわち、酪酸存在下では後者の状態に傾くため、一般には転写が活性化すると考えられる。そこで、酪酸の存在下・非存在下に *in vitro* Treg 誘導培養を行ったT細胞に対する抗アセチル化ヒストンH3抗体によるクロマチン免疫沈降-シーケンス (ChIP-seq) 法により、Foxp3 遺伝子領域のヒストンアセチル化を比較検討した結果、酪酸存在下でFoxp3のプロモーターおよびエンハンサー領域のヒストンアセチル化が有意に亢進していた⁹⁾。

さらに、Rag1欠損マウスなどT/B細胞を持たない免疫不全マウスに野生型マウスから調整したナイーブT細胞を静脈内移入することによる実験腸炎マウス¹⁷⁾に酪酸化でんぷんを混餌投与して大腸pTregを誘導すると、pTregは抗炎症性サイトカインであるIL-10を分泌して腸炎の症状を抑えることがわかった⁹⁾。すなわち、Clostridiales目に代表される腸内細菌が産生する酪酸は、大腸粘膜内でのpTregの分化を促進する。この際、Tregの分化にはTCRによる腸内細菌抗原の認識を必要とする。こうして分化したpTregはIL-10を産生することで免疫抑制機能を発揮して腸管免疫恒常性の維持に働く(図4)。

5. 将来の展望

以上述べてきたように、統合オミクス手法は宿主-腸内フローラ相互作用の理解に適した解析法である。今後さらなる網羅的解析手法の進歩・改良によって、無侵襲あるいは軽度の侵襲で採取できる唾液、尿、糞便、血液などのサンプルを対象としたヒト統合オミクス解析手法を確立できれば、疾患発症マーカーとしての菌群やその代謝物の同定につながり、ひいてはそれらを対象とした発症予防法の開発も夢物語ではないかもしれない。

文 献

- 1) Abbas, A. K., Benoist, C., Bluestone, J. A., Campbell, D. J., Ghosh, S., et al: Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat. Immunol.*, **14**, 307-308 (2013)
- 2) Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., et al: Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*, **331**, 337-341 (2011)
- 3) Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., et al: Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature*, **500**, 232-236 (2013)
- 4) Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., et al: An estimation of the number of cells in the human body. *Ann. Hum. Biol.*, **40**, 463-471 (2013)
- 5) Blaser, M. J., Falkow, S.: What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nat. Rev. Microbiol.*, **7**, 887-894 (2009)
- 6) Candido, E. P., Reeves, R., Davie, J. R.: Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell*, **14**, 105-113 (1978)
- 7) Davie, J. R.: Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J. Nutr.*, **13**, 2485S-2493S (2003)
- 8) Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., et al: Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, **469**, 543-547 (2011)
- 9) Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., et al: Commensal microbe-derived butyrate induces colonic regulatory T cells. *Nature*, **504**, 446-450 (2013)
- 10) Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., et al: Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*, **60**, 631-637 (2011)
- 11) Karlsson, F. H., Fåk, F., Nookaew, I., Tremaroli, V., Fagerberg, B., et al: Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat. Commun.*, **3**, 1245 (2012)
- 12) Karlsson, F. H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C. J., et al: Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*, **498**, 99-103 (2013)
- 13) Lederberg, J.: Infectious history. *Science*, **288**, 287-293 (2000)
- 14) Lee, H. M., Bautista, J. L., Hsieh, C. S.: Thymic and peripheral differentiation of regulatory T cells. *Adv. Immunol.*, **112**, 25-71 (2011)
- 15) 光岡知足: 腸内菌叢研究の歴史. *実験医学*, **32**, 14-19 (2014)
- 16) Peterson, C. T., Sharma, V., Elmén, L. and Peterson, S. N.: Immune Homeostasis, Dysbiosis and Therapeutic Modulation of the Gut Microbiota. *Clin. Exp. Immunol.*, **179**, 363-377 (2015)
- 17) Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddle, L. B., Coffman, R. L.: Phenotypically distinct subsets of CD4+ T

- cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int. Immunol.*, **5**, 1461–1471 (1993)
- 18) Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S. et al.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, **464**, 59–65 (2010)
 - 19) Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., et al.: A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, **490**, 55–60 (2012)
 - 20) Shevach, E. M.: Biological functions of regulatory T cells. *Adv. Immunol.*, **112**, 137–176 (2011)
 - 21) Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., et al.: A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, **457**, 480–484 (2009)
 - 22) Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B. J., Koeth, R., Levison, B. S., et al.: Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, **472**, 57–63 (2011)
 - 23) Yoshimura K, Matsui T, Itoh K.: Prevention of *Escherichia coli* O157:H7 infection in gnotobiotic mice associated with *Bifidobacterium* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **97**, 107–117 (2010)