がんと全身

1) 腸内細菌株を用いた
新規治療法の開発

本田 賢也

Key words 腸内細菌，免疫，がん免疫チェックポイント阻害療法

米国Human Microbiome Projectや欧州Meta-HITプロジェクト等，次世代シーケンサーを用いた大型プロジェクトが行われ，微生物叢研究の実施において必須な基盤情報の整備が進み，さまざまな疾患とヒト腸内細菌の状態との相関関係が見出された．さらに，健常人の糞便を患者に移植する便移植治療の有効性が実証され，腸内細菌叢がマニピュレーション可能であることが明らかになり，腸内細菌叢に着目した治療法開発が現実味を帯びている．そして，現在，微生物叢と宿主（ヒト）の相関関係の解明からさらに一歩踏み込んで，詳細なメカニズムの理解を進め，微生物叢の制御あるいは宿主に作用する機能性分子に着目した予防，治療技術の開発を加速させるべきフェーズにある．また，微生物叢の差異に着目することで，より精緻なプレシジョン・メディシン・サブグループ化の実現が期待されている．しかしながら，世界的なマイクロバイオーーム研究の進展にもかか

わらず，病態悪化や逆に病態改善へとつながる「causative」な菌種を同定できた例は数えるほどしかなく，菌株として臨床応用できている例は見当たらない．その要因は，腸内細菌叢を構成する細菌種の単離・培養研究が進んでいないことにあると考えられる．例えば，感染症の原因微生物を特定するとき，病巣から微生物を分離し，分離した微生物を動物に感染させて同じ病気を起こせるかどうかを検討するのが定石である．一方，腸内細菌叢研究は，情報収集が先行し，構成する菌種の多くは未分離未培養あるいは未解析のまま取り残されており，それぞれの特徴付けがなされておらず，「cause-and-effect関係」が明確ではない状況にある．さらに，わずか1種類の病原菌で発症する感染症とは異なり，腸内細菌叢の生理機能は複数の細菌種からなるコミュニティとして発序されることが多い．にもかかわらず，どの細菌種の組み合わせが機能的コミュニティとしての最小単位を構成

慶應義塾大学微生物学・免疫学

The 47th Scientific Meeting : Perspectives of Internal Medicine ; Internal medicine, to grasp disorders systemically ; 4. Cancer as a systemic disease ; 1) The next step towards microbiota therapeutics.

Kenya Honda : Department of Microbiology and Immunology, Keio University School of Medicine, Japan.

しているのか、未だほとんどわかっていない。よって、今日の次世代シーケンサーを用いたビッグデータから「相関」する関連菌を情報学的に割り出すデータ駆動型のトップダウンアプローチに加えて、個々の菌種の単離と機能解明というボトムアップ解析を進め、菌株の組み合わせによるコミュニティとしての働きを理解すれば、新たな疾病対策・治療開発の実現化・具体化の可能性はさらに高くなると言える^{1~7)}。

我々は、微生物叢-宿主相互作用の理解を加速・深化し、健康・医療技術を創出するために、免疫システム増強・粘膜バリア維持という課題に焦点を当て、目的とする表現型を維持しながら、できるだけ腸内細菌叢を絞り込み、最終的には本質的に重要な働きをする腸内細菌株セットの単離を試みている^{8~12)}。そのため、「特定の腸内細菌だけを持つ動物を作成する技術」(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)を組み合わせた統合的なアプローチにより、複雑な腸内細菌叢を細分・要素化し、宿主細胞の機能と明確に関係付ける方法をとっている。ヒト腸内細菌叢のほとんどを培養できる技術を用いることで、複雑な腸内細菌叢を培養菌株だけでマウスのなかで概ね再現することができる。従って、機能・表現型に紐付けられた腸内細菌株を得て、ノトバイオートマウスを作製することで、相関からさらに踏み込んだ「cause-and-effect関係」を明らかにすることができる⁴⁾。免疫システム増強・粘膜バリア維持において効果の高い細菌株カクテルを単離し、さらに、個別ゲノム解析(細菌が持つ遺伝子情報を得る)・トランスクリプトーム解析・メタボローム解析を組み合わせることにより、菌株に由来する責任生理活性物質及び細胞分子メカニズムを明らかにできる。

そのような取り組みの過程のなかで、我々は、インターフェロン(interferon: IFN)- γ を恒常的に産生するCD8陽性T細胞(IFN- γ^+ CD8 T細胞)

がマウスの消化管に非常に多く存在し、無菌マウスではこの細胞は著しく少なくなっていることを見出した。IFN- γ^+ CD8 T細胞誘導細菌を同定するため、計6人の健常ボランティア(A~F)から得た便サンプルをそれぞれ無菌マウスに投与したところ、ドナーB便を投与したマウス大腸でIFN- γ^+ CD8 T細胞が特に強く誘導された。そこで、B便投与マウスグループから最も強力にIFN- γ^+ CD8 T細胞誘導が観察されたB#5マウスを選択した。B#5マウスの腸内容物を別の6グループの無菌マウスに経口投与し、それぞれ異なる抗生物質を投与した。その結果、アンピシリンを投与したグループでIFN- γ^+ CD8 T細胞誘導が増強されることがわかった。アンピシリンを投与したグループから最も強力にIFN- γ^+ CD8 T細胞誘導が観察されたB5-Amp#2とB5-Amp#3の2匹のマウスを選択し、これらマウスの腸内容物を採取し、培養した。培養によって26菌株の細菌が単離できた。26菌株から、菌叢シーケンス解析とコンピュータによる相関解析によって、Spearman's indexのRho値が高い11菌株を選択した。ノトバイオートマウス作製によって、11菌株だけでIFN- γ^+ CD8 T細胞を十分に誘導できることがわかった。11菌株は、MyD88非依存性シグナル経路を使ってBatf3依存的樹状細胞及びIrf4依存的樹状細胞両方を活性化し、IFN- γ^+ CD8 T細胞を誘導することがわかった。また、11菌株はバクテロイデス7株と非バクテロイデス4株を含んでいるが、4株が実行菌株として働き、7株はサポーター菌株として働くことがわかった。メタボローム解析から、11菌株はmevalonateやdimethylglycineを産生することによってIFN- γ^+ CD8 T細胞を誘導すると考えられるデータが得られた。加えて、11菌株の経口投与は、病原性細菌である*Listeria monocytogenes*に対する感染に対して抵抗性を付与することがわかった。さらに、11菌株の複数回の経口投与は、MC38腺癌皮下投与モデル及びBraf/Pten変異メラ

ノーマ皮下投与モデルにおいて、抗PD-1 (programmed cell death 1) 抗体及び抗CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) 抗体投与による免疫チェックポイント阻害療法の効果を増強することがわかった。分離培養した11菌株は、免疫チェックポイント阻害療法の副作用として知られる腸炎の発症も抑制することがわかった。最後に、11菌株が健常者の腸内細菌叢にどの程度棲息しているかを調べた。公開されている複数のメタゲノムデータベースを検証したところ、これら11菌株は極めて稀少な細菌株であることがわかった。そのため、今回単離した11菌株は、多くの人に応用可能な（ほとん

どの人が持っていないため、投与すると効果がある可能性がある）、非常に貴重な細菌株であると考えられた。今後はサル等のよりヒトに近い実験動物を使い、同様の治療改善効果が認められるかの検証が必要と考えている。

このように、免疫系をある方向に人為的に誘導できる腸内細菌株コンソーシアムを得ることができれば、免疫疾患、感染症、がん等さまざまな疾患に対する新たな予防・治療シーズとなり得る。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本田賢也；研究費・助成金（武田科学振興財団, BiomX, Vedanta Biosciences, 三越厚生事業団）

文献

- 1) Mimee M, et al : Microbiome therapeutics - advances and challenges. *Advanced drug delivery reviews* 105 : 44-54, 2016. doi : 10.1016/j.addr.2016.04.032.
- 2) Kim S, et al : The intestinal microbiota : antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev* 279 : 90-105, 2017. doi : 10.1111/imr.12563.
- 3) Bhatt AP, et al : The role of the microbiome in cancer development and therapy. *CA Cancer J Clin* 67 : 326-344, 2017. doi : 10.3322/caac.21398.
- 4) Honda K, Littman DR : The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* 535 : 75-84, 2016. doi : 10.1038/nature18848.
- 5) El Hage R, et al : Emerging trends in "Smart Probiotics" : functional consideration for the development of novel health and industrial applications. *Front Microbiol* 8 : 1889, 2017. doi : 10.3389/fmicb.2017.01889.
- 6) O'Toole PW, et al : Next-generation probiotics : the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol* 2 : 17057, 2017. doi : 10.1038/nmicrobiol.2017.57.
- 7) Blander JM, et al : Regulation of inflammation by microbiota interactions with the host. *Nat Immunol* 18 : 851-860, 2017. doi : 10.1038/ni.3780.
- 8) Ivanov II, et al : Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139 : 485-498, 2009.
- 9) Atarashi K, et al : Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331 : 337-341, 2011.
- 10) Atarashi K, et al : Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature* 500 : 232-236, 2013.
- 11) Atarashi K, et al : Th17 cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells. *Cell* 163 : 367-380, 2015.
- 12) Atarashi K, et al : Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. *Science* 358 : 359-365, 2017.