

性化抑制であると考えられる。一方 α B crystallin は寛解状態との関連が注目されている。低分子量熱ショックタンパク質 (small heat shock proteins : small HSP) の一つであるが、同タンパクを欠損したマウスでは EAE が重症化し、同タンパクを投与すると臨床症状は軽快した。その分子メカニズムとしては、神経細胞やグリア細胞のアポトーシス抑制および炎症性サイトカイン抑制作用が考えられている²³⁾。

B 細胞の関与

MS 患者の髄液では、IgG 産生が亢進していること (IgG index の上昇) や髄腔内特異的な抗体の存在 (オリゴクローナルバンド : oligoclonal band : OCB) が知られ、B 細胞の関与が示唆されてきた。病理学的にも MS の脳病変が 4 種類に分類されるなかで、T 細胞・マクロファージ浸潤とともに IgG や補体成分の沈着を認める病変パターンが最も一般的であると報告されている²⁴⁾。また、B 細胞のマーカーである CD20 に対するモノクローナル抗体 rituximab が再発・寛解型 MS に有効であることが報告されている。rituximab は CD20 陰性の形質芽細胞や形質細胞には作用せず、また髄液 IgG 濃度低下や OCB 消失は伴わなかったことから、効果発現には B 細胞の抗原提示能やサイトカイン産生能の関与が推定されている。一部の 2 次進行型 MS の病理において髄膜リンパ濾胞様構造が認められる²⁵⁾。濾胞内には胚中心様構造もあることから、親和性成熟を伴う B 細胞クローン増殖が髄腔内でおこり、進行性の病態に関与している可能性が示唆される。IFN- β は液性免疫を活性化することが知られているが、IFN- β 投与 MS 患者の血清中の BAFF (B cell-activating factor belonging to the TNF family) 濃度の上昇が報告されている²⁶⁾。BAFF は B 細胞の生存や分化を促進する因子であり、IFN- β で悪化する病態には BAFF を介した B 細胞活性化が関与している可能性がある。

むすび

以上、主として MS の再発病態と Th 細胞の関与に焦点を当て解説した。MS の進行性の病態には未知の部分が多いが、自然免疫系の役割が注目され現在精力的に検討が進められている。また、古くから神経系・内分泌系・免疫系は生体の恒常性維持のためのシステムとして互いに密接に関連することが知られている。例えばステロイドはストレスホルモンであり、リンパ球は神経伝達物質の受容体を発現している。システムバイオロジーの一環として臓器連関が注目されており、今後の展開が期待される。

文 献

- 1) Weiner HL. The challenge of multiple sclerosis : how do we cure a chronic heterogeneous disease ? *Ann Neurol.* 2009 ; 65 : 239-48.
- 2) Sawcer S, Hellebrandt G, Pirinen M, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature.* 2011 ; 476 : 214-9.
- 3) Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003 ; 421 : 744-8.
- 4) Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol.* 2009 ; 27 : 485-517.
- 5) Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, et al. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 2005 ; 237 : 123-30.
- 6) Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol.* 2009 ; 10 : 1000-7.
- 7) Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, et al. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood.* 2009 ; 113 : 4240-9.
- 8) Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol.* 2011 ; 12 : 255-63.
- 9) Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2009 ; 66 : 390-402.
- 10) Peters A, Lee Y, Kuchroo VK. The many faces of Th17 cells. *Curr Opin Immunol.* 2011 ; 23 : 702-6.
- 11) Jager A, Dardalhon V, Sobel RA, et al. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol.* 2009 ; 183 : 7169-77.
- 12) Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, et al. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med.* 2010 ; 16 : 406-12.
- 13) Bartholomäus I, Kawakami N, Odoardi F, et al. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature.* 2009 ; 462 : 94-8.
- 14) Yokote H, Miyake S, Croxford JL, et al. NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora. *Am J Pathol.* 2008 ; 173 : 1714-23.
- 15) Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell.* 2009 ; 139 : 485-98.
- 16) Berer K, Mues M, Koutrolos M, et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature.* 2011 ; 479 : 538-41.
- 17) Takahashi K, Miyake S, Kondo T, et al. Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2001 ; 107 : 23-9.
- 18) Miyazaki Y, Miyake S, Chiba A, et al. Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int Immunol.* 2011 ; 23 : 529-35.
- 19) Croxford, JL, Miyake S, Huang YY, et al. Invariant V α 19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol.* 2006 ; 7 : 987-94.
- 20) Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, et al. MRL1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature.* 2012 ; 491 : 717-23.
- 21) Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature.* 2001 ; 413 : 531-4.
- 22) Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science.* 2001 ; 294 : 1731-5.
- 23) Steinman L. Immunology of relapse and remission in multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2014 ; 32 : 257-81.
- 24) Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, et al. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol.* 1996 ; 6 : 259-74.
- 25) Magliozzi R, Howell O, Vora A, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 2007 ; 130 : 1089-104.
- 26) Krumbholz M, Faber H, Steimmeyer F, et al. Interferon- β increases BAFF levels in multiple sclerosis : implications for B cell autoimmunity. *Brain.* 2008 ; 131 : 1455-63.

II. 基礎研究の進歩

多発性硬化症の動物モデル

—横断的アプローチによる病態解明と治療標的の探索—

大木 伸司 山村 隆

Experimental animal model of multiple sclerosis
—Transverse investigation of MS pathogenesis for therapeutic intervention—

Shinji Oki, Takashi Yamamura

Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system (CNS) in which autoreactive T cells ignites downstream pathogenic cascades. The orphan nuclear receptor, NR4A2, is identified to be a selectively upregulated gene in peripheral blood T cells from relapsing–remitting MS patients. Furthermore, selective upregulation of NR4A2 is observed in peripheral blood T cells and CNS–infiltrating T cells upon immunization with myelin peptide in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Intriguingly, IL–17–producing helper T cells exclusively express NR4A2, suggesting that NR4A2 expression represents a pathogenic T cells in autoimmunity. In addition, a NR4A2 blockade by RNA interference ameliorated EAE, implying the intrinsic roles of NR4A2 in MS/EAE, and could serve as a novel therapeutic target of the diseases.

Key words: multiple sclerosis, EAE, NR4A2, Th17 cell, IL–21

はじめに

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) は、中枢神経系 (CNS) の神経伝導障害に基づく疾患で、病原性 T 細胞の機能亢進に起因する髄鞘の障害が病態形成と密接に関わる。MS のゲノムワイド連鎖解析 (GWAS)¹⁾ において、T 細胞の機能制御遺伝子群との相関が明確に示されたことは、自己免疫疾患としての MS の理解を深め、免疫機能の異常の是正に基づく、MS の予防や治療への道を開いた。例えばリンパ節からのリンパ球の移出を抑制するスフィンゴシン 1 リン酸受容体アンタゴニストのフィンゴリモド、血管内

皮へのリンパ球の接着を阻害し、実質組織への細胞浸潤を抑制する抗 VLA–4 抗体製剤のナタリズマブ、改変ペプチド抗原あるいはミエリン塩基性タンパク質のデコイとして病原性 T 細胞の機能を抑制するペプチド製剤グラチラマー酢酸塩などは、病原性リンパ球の機能抑制を目的に開発されてきた MS 治療薬である。

実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) は、MS の病態解明や新規治療法の評価など、MS という疾患を理解するうえで極めて重要な動物モデルとして長い歴史をもつ²⁾。特に EAE は、自己免疫疾患としての MS の研究に欠かせない実験モデルであるが、上記の GWAS 解析の結果は、ミ

エリン抗原を免疫することで病原性T細胞を能動的に惹起し、病態を誘導するEAEのアプローチに一定の根拠を与えたといえる。その一方で、EAEがMS病態のすべての側面を再現できるわけではないことはいうまでもなく、EAEに由来するデータをいかにMS病態に反映させていくかは、MS研究に携わる研究者の手にほぼ完全に委ねられている。例えば、'EAE'をキーワードとしたPubMedサーチによる7,000報を超える報告の中には、EAEを*in vivo*での一般的な免疫応答の指標として用いている報告が数多く含まれる。MS病態に関連するとは限らないEAE単独の研究報告の解釈には注意が必要であり、数多の論文の中からMSの理解に真に有用な情報を、的確に選別することが重要である。

近年の新規MSの治療薬、あるいは治療薬候補の広がりには目を見張るものがあるが、その背景には新しいMSの病態形成メカニズムの解明があり、EAE研究が少なからぬ貢献をしていることは論を待たない。以前に著者らは、MS患者末梢血T細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、MS患者T細胞で発現亢進するオーファン核内受容体NR4A2を見いだした。引き続きEAEを用いたより詳細な解析から、NR4A2発現T細胞が自己反応性のTh17細胞であることや、NR4A2の機能を抑えることでEAE病態が著しく改善することなどが明らかとなった。

本稿では、MS病態を理解するうえでのEAEの有用性を、著者らがたどった研究の道筋に沿って紹介する³⁾。

1. MSの動物モデルとしてのEAE

—何が'わかり'何が'わからない'のか—

EAEの病態においては、炎症、脱髄、軸索障害、グリオーシス、炎症寛解、髄鞘再生など多くの免疫学的・神経病理学的過程を観察することができ、MSの様々な側面を反映しうる有用な動物モデルである。更に、用いる動物種、系統、誘導法などの組み合わせにより、単相型、再発寛解型、持続型などの多様な病型のEAEが誘導可能であり、介入研究の場合は、治療の

タイミング、回数、投与量などの様々なバリエーションにも対応しうる。例えば様々な遺伝子改変マウスの背景系統であるC57BL/6(B6)マウスに、MOG₃₅₋₅₅ペプチドを免疫することで誘導されるactive EAEは、EAE研究の領域で最も頻用されるモデルの一つであるが(図1-a)、特異な単相型の病態が、多様なMS病型とどのように対応するのについて、いまだに多くの議論がある。このほかに、病原性T細胞の解析に有用なモデルとして、*in vivo*で誘導したミエリン抗原特異的T細胞を未処理マウスに移入して誘導するpassive EAEがある。このように長い歴史に裏打ちされたEAEは、MSの様々な側面を反映した解析を可能にする一方で、MS特有の現象などに対しては、一転して無力さを露呈する。例えば、遺伝学的に均一なマウスEAEは、データのばらつきを最小限にとどめられる反面、ヒトの遺伝的背景を反映したMS病態の多様性の解析には不向きである。またナタリズマブ投与例で発症が報告された進行性多巣性白質脳症の原因となるJCウイルスや、MS病態との関連が示唆されているEBウイルスなどには種特異性があるため、EAEを用いた予測や評価は不可能である⁴⁾。

これまでに、EAEにおいて治療効果が検証され、MSの治療に使われるようになった薬剤として、IFN- β 、グラチラマー酢酸塩やナタリズマブなどのほか、フィンゴリド、ミトキサントロン、アザチオプリン、ラキニドなどが挙げられる一方で、EAEを改善したもののMSには無効だった薬剤としては、アナキンラ、TGF- β 、ウステクヌマブなどがある。経口寛容療法、T細胞ワクチン、改変ペプチド抗原などのEAEでは効果が認められた免疫療法も、MSでは奏効が得られていない。EAE研究では、一つあるいはごく少数のパラメーターが指標となることがほとんどであるが、*in vivo*の介入研究では評価の指標をできるかぎり広くとることが望ましい。例えばマクロファージの除去によりEAEが改善する一方で、発症後の神経・髄鞘の再生が抑制される。またプロスタグランジンE2やオステオポンチンは、病原性T細胞を活性化し

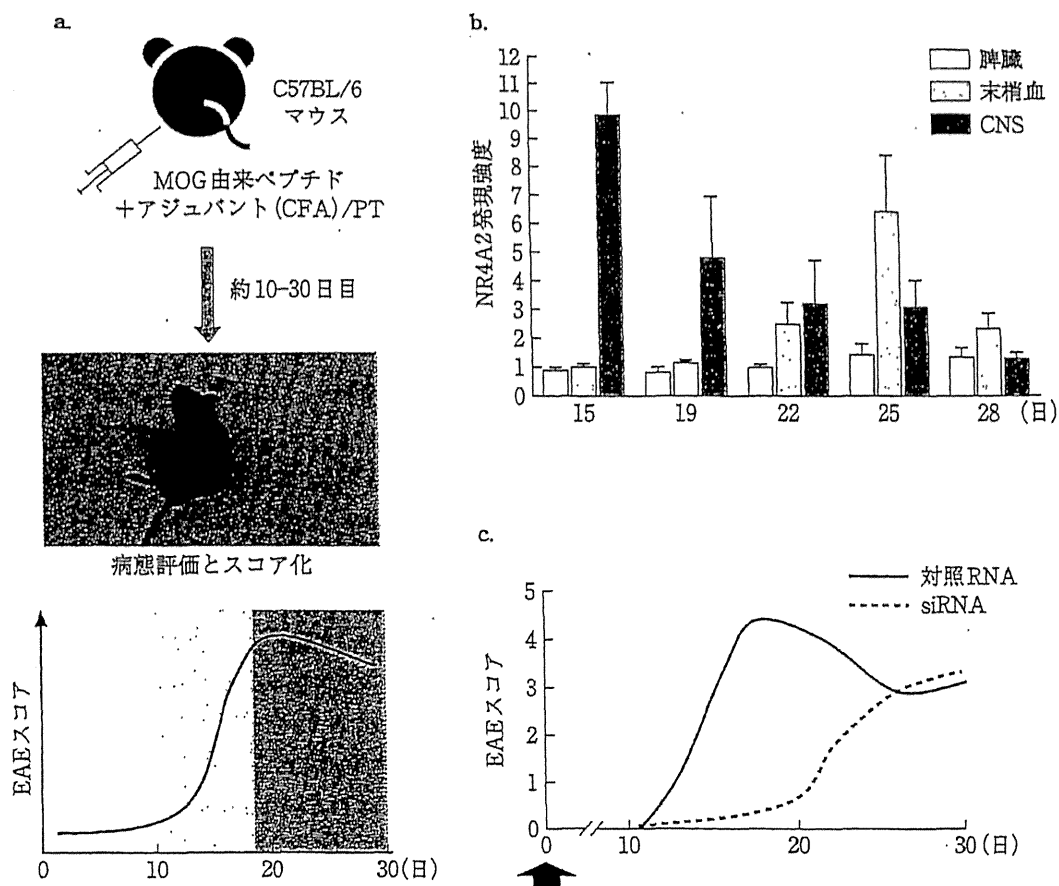


図 1 EAE 病態形成における NR4A2 発現 T 細胞の役割

a. C57BL/6 (B6) マウスに, MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを免疫することで単相型持続性の EAE が誘導できる。B6 マウスは様々な遺伝子改変マウスの背景系統であることから, MOG₃₅₋₅₅ ペプチドとの組み合わせによる EAE が最も頻用される。CFA: 完全フロイントアジュバント, PT: 百日咳毒素。

b. EAE 発症に伴って, まず CNS 浸潤 T 細胞で, 次に末梢血 T 細胞で NR4A2 の発現亢進を認めた一方, 脾臓由来 T 細胞では, NR4A2 の発現亢進を認めなかった。

c. MOG₃₅₋₅₅ ペプチド免疫時に, コラーゲンマトリクスに封入して安定化させた NR4A2 特異的 siRNA を静脈投与したところ, 顕著な EAE 病態の抑制が認められた。免疫 10 日後の投与でも, EAE 病態は抑制された (データ示さず)。

て EAE の増悪を導く反面, それぞれ血液脳関門の安定効果, 髄鞘再生・神経保護効果も有する。またサイトカイン類も, EAE 発症時に免疫系と神経系の双方に作用する場合があります。データの解釈に慎重を期す必要がある。例えば, TNF 中和抗体は EAE 病態を有意に抑制する一方で MS をむしろ増悪させる。最初の報告を注意深く読むと, TNF 中和抗体は受動 EAE にのみ有効であること, TNF 欠損マウスの EAE では発症が遅れるものの発症率への効果は低いことを読み取ることができ, 十分なデータの検証によりこのような事態は回避できると思われる。

例外的にその作用機序がいまだ謎に包まれているのが IFN- γ である。EAE と MS では正反対の効果を示す典型的な例であるが, 原因の究明は状況を十分説明できる段階には至っていない^{4,5)}。

2. MS/EAE と NR4A2 陽性 Th17 細胞

脳脊髄炎の惹起過程において, 炎症の遷延化を引き起こす自己反応性の病原性 T 細胞の役割は極めて重要である。抗原刺激を受けたナイーブ CD4⁺T 細胞は, 周囲のサイトカイン環境によって複数の機能的に異なるエフェクター T 細

胞に分化するが、このうち感染免疫の重要な担い手であるTh1細胞とTh17細胞は、MSなどの自己免疫疾患を引き起こす病原性T細胞ともなりうる。マウスEAEの研究から、IL-12あるいはIL-23の欠損マウスのEAE解析から⁶⁾、IL-23を分化誘導因子とするTh17細胞が主な病原性T細胞であることが示されている。更にTh17細胞のマスタート転写因子として知られているROR γ tの欠損によりEAE病態は改善するが⁷⁾、ROR γ tはLTiやILC3などの細胞群の分化を制御することでリンパ組織の構築にも関わるため、ROR γ t欠損マウスを用いた場合、この点にも留意が必要である。MSの病態形成過程にもTh17細胞をはじめとするT細胞の関与が予想されるが⁸⁾、高い可塑性を有するTh17細胞のサイトカイン産生は、炎症局所において容易にIL-17からIFN- γ へとシフトするため⁹⁾、IL-17産生を指標としてTh17細胞を解析する場合、最初から対象となる細胞をとらえそこなってしまう可能性がある。

このような背景を踏まえ、私たちはMS患者が保持していることが予想される病原性T細胞(=Th17細胞?)を標的として、患者末梢血を用いた解析を行った。すなわちDNAマイクロアレイ法を用いて、寛解期の再発寛解型MS患者末梢血より分離したT細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、健常者に比較して患者で発現亢進する遺伝子の一つとして、核内受容体分子NR4A2を同定した¹⁰⁾。NR4A2と自己免疫疾患との関連はほとんど未知であったが、転写因子としても働くNR4A2と自己免疫病態形成との関連を更に詳細に解析するために、以後EAEに移行して研究を進めた。B6マウスにMOG₃₅₋₅₅ペプチドを免疫して誘導されるEAEにおいて、CNS浸潤細胞で先行し、末梢血T細胞がこれに続くNR4A2の発現亢進を認めた(図1-b)。興味深いことに、所属リンパ節や脾臓のT細胞では、NR4A2の発現亢進は認められなかった。よってT細胞が標的臓器に集積する過程でNR4A2発現が増加し、EAE病態を引き起こした自己反応性T細胞が、その後末梢血に移行して一定期間維持されるものと考えられた¹¹⁾。

またNR4A2の発現はIL-17産生ヘルパーT細胞に限局しており、更に自己抗原を免疫したときにのみ誘導されたことから、NR4A2が自己反応性のTh17細胞を同定するための有用なマーカー分子となる可能性が示された。

3. RNA干渉法によるNR4A2の阻害によるTh17細胞機能とEAE病態の抑制

上記の解析から、NR4A2が自己反応性のTh17細胞に選択的に発現すること、EAE発症時にはこのNR4A2発現Th17細胞が、経時的にCNSから末梢血へと分布することが明らかとなった。そこで次に、Th17細胞機能に対するNR4A2発現の意義を解明するために、NR4A2特異的siRNAを新たに設計し、まずナイーブT細胞をIL-6/TGF- β 存在下に刺激して得られるTh17細胞の分化におけるNR4A2の作用を調べた。NR4A2特異的siRNA処理により、Th17細胞のIL-17産生はほぼ完全に阻害され、NR4A2が*in vitro*におけるTh17細胞の分化に必須の因子であることが明らかとなった。NR4A2遺伝子の相同性は種間で極めて高く、用いたNR4A2特異的siRNAの配列はヒト・マウス間で完全に一致していたことから、ヒト末梢血を用いて同様の阻害実験を行った。健常人あるいはMS患者の末梢血を用いたIL-17産生細胞の分化は、やはりsiRNA処理により有意に抑制され、NR4A2がヒトTh17細胞分化の鍵因子であることがわかった。更にTh17細胞の分化過程においては、c-mafの選択的発現、IL-21産生によるオートクリンな増殖、IL-23受容体発現によるTh17細胞の形質の安定化などが必要とされている¹²⁾が、NR4A2特異的siRNA処理により、*in vitro*で分化させたマウスTh17細胞におけるこれらの遺伝子発現はすべて消失した。更にsiRNA処理後に培養系にIL-21を添加すると、IL-17産生が回復することから、NR4A2によるTh17細胞の分化制御の機序としてIL-21の産生制御が重要であることが示された¹³⁾。

NR4A2が*in vitro*におけるTh17細胞分化の鍵因子であることが示されたことから、次に

NR4A2 特異的 siRNA の *in vivo* 投与による EAE 病態の抑制効果を解析した。市販のコラーゲンマトリクスに封入して安定化させた siRNA を、抗原免疫時に同時に静脈投与して EAE を観察したところ、顕著な病態の抑制が得られた(図 1-c)。更に抗原免疫 10 日後に siRNA を投与した場合も EAE 病態の抑制効果が認められ、*in vivo* における NR4A2 発現の抑制により、EAE が制御可能であることが示された。以上より、NR4A2 の発現制御により EAE 病態がコントロールできることが明らかとなった。

おわりに

MS の動物モデルとしての EAE を用いた研究の一例として、オーファン核内受容体 NR4A2 と Th17 細胞の連関、および自己免疫病態形成との関わりを解析した著者らの研究を紹介した。今後、疾患活動性をモニターするバイオマーカーおよび MS の治療標的としての NR4A2 の活用を図るべく、引き続き研究を進めていく必要がある。著者らの研究のように、MS 由来のデータを手がかりに、EAE を用いてより詳細な解析を進め、得られた結果をヒトで再検証するという作業を繰り返していくことは、MS の動物モデルとしての EAE の価値を最大限に高めるうえで極めて重要である。EAE 単独の解析から導きだされたデータ・結論と、実際の MS 病態との齟齬を極小とするためには最善の方法といえるだろう。ただ、'MS 解析から得られたデー

タを EAE で再現し、一方で EAE 解析から得られたデータを可能なかぎり MS で再検証する'ことは、基礎研究の典型ともいえる EAE 研究と、臨床の組上にある MS 研究を両輪とする車をまっすぐに走らせることにほかならず、時に困難を伴う場合もありうる。研究グループ内の意思疎通を保ち、万全な研究協力体制を構築することも重要である。

最初の EAE の報告がなされてからはや 80 年近くが経ったが、EAE 研究においても日進月歩は続いており、例えば最近 NMO の動物モデルが本特集 II-5 の稿に紹介されている。一方、EAE は主に再発寛解型の MS 病態解析に用いられてきており、進行型病態の動物モデルとして用いられた例はほとんどない。これは再発寛解型病態が EAE の守備範囲にある一方で、進行型病態が再発寛解型病態とは質的に全く異なる病態である可能性を想起させる。実際のところ、EAE に相当する動物モデルがない進行型病態の研究は、疾患そのものの理解と治療法開発の両面において再発寛解型病態より著しく遅れている¹⁴。unmet medical needs としての進行型病態の解明に、動物モデルがどのように寄与できるかを考えていくことが、EAE 研究に残された大きな課題の一つといえるだろう。適切な動物モデルの積極的な探索が進み、多様な MS 病態の理解と、対応する治療法の開発が更に進展することを期待したい。

文献

- 1) Sawcer S, et al: Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476(7359): 214-219, 2011.
- 2) Baxter AG: The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 7(11): 904-912, 2007.
- 3) Oki S: Towards understanding the role of orphan nuclear receptor NR4A2 in Th17 cell-mediated central nervous system autoimmunity: An experimental approach using an animal model of multiple sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol* 5: 137-148, 2014.
- 4) Constantinescu CS, et al: Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol* 164(4): 1079-1106, 2011.
- 5) Steinman L, Zamvil SS: Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends Immunol* 26(11): 565-571, 2005.
- 6) Cua DJ, et al: Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune

- inflammation of the brain. *Nature* 421(6924): 744-748, 2003.
- 7) Ivanov, et al: The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126(6): 1121-1133, 2006.
 - 8) Constantinescu CS, Gran B: The essential role of T cells in multiple sclerosis: a reappraisal. *Biomed J* 37(2): 34-40, 2014.
 - 9) Hirota K, et al: Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* 12(3): 255-263, 2011.
 - 10) Satoh J, et al: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 18(3): 537-550, 2005.
 - 11) Doi Y, et al: Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(24): 8381-8386, 2008.
 - 12) Bauquet AT, et al: The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* 10(2): 167-175, 2009.
 - 13) Raveney BJ, et al: Nuclear receptor NR4A2 orchestrates Th17 cell-mediated autoimmune inflammation via IL-21 signalling. *PLoS One* 8(2): e56595, 2013.
 - 14) Koch MW, et al: Treatment trials in progressive MS—current challenges and future directions. *Nat Rev Neurol* 9(9): 496-503, 2013.

ヒト腸内細菌叢の Metagenomics

はっとり まさひさ
■ 服部 正平

東京大学大学院 新領域創成科学研究科
情報生命科学専攻/オミクス情報センター



服部 正平
大坂市立大学(工学博士)
九州大学助手、スクリプス研究所とカリ
フォルニア大学サンディエゴ校研究員、
東京大学助教授、理化学研究所チーム
長、北海道大学教授等
2006年より現職
ヒトゲノム解読(31番染色体等)に貢献

Key words : メタゲノム, 腸内細菌,
次世代シーケンサー, 16S 遺伝子

Abstract

数百種類、数百兆個と見積られる人体に生息する常在細菌群(ヒト常在菌叢)の研究は、近年における国際的な大型プロジェクトの推進、次世代シーケンサーの進歩、Metagenomics(メタゲノム解析)等を背景にしたゲノム科学的アプローチにより大きく前進した。とくに、ヒト腸内細菌叢の微生物生態と機能面での全体像が描かれ、さらに、病態と腸内細菌叢の異常(dysbiosis)との関係も明らかとなって来た。これらの知見は、ヒト常在菌叢が従来の想像を越えて、宿主の生体恒常性に深く関わることを示唆する。

はじめに

近代細菌学はパスツールやコッホの時代に体系化された。従って、人体やさまざまな環境中に生息する細菌群の研究では、その初期においてそこに生息する個々の細菌の分離培養とそれらの系統や細菌学的特性の解析が主に行われた(図1)。その後、1980年代にDNAを扱う分子生物学的手法が出現し、培養を介さず細菌叢を解析する方法が汎用されるようになった。その主な方法はPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)を

用いて、構成細菌種の16S rRNA(16S)遺伝子を細菌叢DNAから選択的に一括増幅し、それらの配列多様性から、細菌種の特定や系統関係を調べるものである。この培養を介さない方法は、多くの難培養性細菌(実験室で分離培養することが困難または不可能な細菌)の検出に有効であったが、それらの性質を知るにはそれらを分離培養する必要があった。この培養法とメタ16S解析法のジレンマを打破する手法としてメタゲノム(全構成細菌の集合ゲノム)解析が1998年に提唱された。開発当初では、メタゲノムは主に特定の遺伝子を狙い撃ち的に同定するためのリソースとして利用された。その後2004年に、細菌叢を網羅的(ランダム)にシーケンシングして、そこに存在する遺伝子を情報学的に枚举する方法が開発された。今日、前者を環境ゲノミクスまたは機能メタゲノミクス、後者をメタゲノミクスとよぶ(図1)。ヒト腸内細菌叢のメタゲノム解析は2006年と2007年に米国と日本のグループにより相次いで論文となった^{1,2)}。その後、次世代シーケンサー(NGS: Next Generation Sequencers)の実用化にともない、大量データに基づいたヒト腸内細菌叢のメタゲノム研究が大きく前進した(表)。本稿では、ヒト腸内細菌叢のメタゲノム解析の現状といくつかの知見を紹介する。

Metagenomics of the human gut microbiome :

Masahira Hattori, Center for Omics and Bioinformatics, Graduate School of Frontier Science, The University of Tokyo

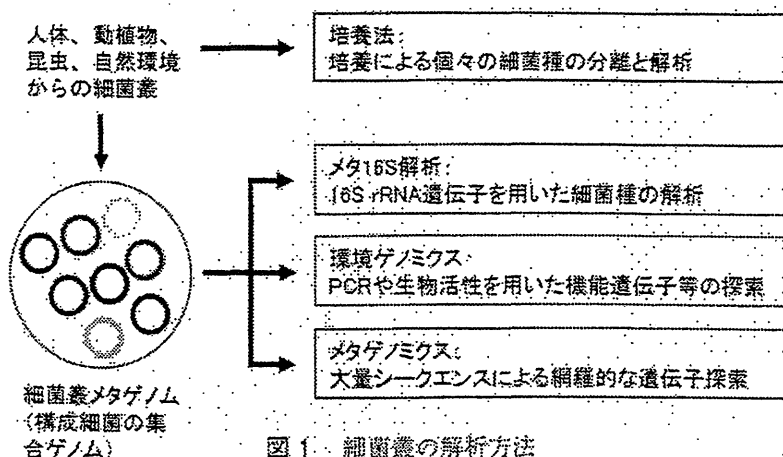


図1 細菌叢の解析方法

表 主なメタゲノム解析プロジェクトの現状

被験者国	被験者数	用いたシーケンサー またはシーケンス法	同定されたユニーク 遺伝子数(M百万)	発表年	文献
米国	2	サンガー法	0.65M	2005	1
日本	13	サンガー法	0.8M	2007	2
		国際コンソーシアムHMPの発足		2008	-
スペイン	39	HiSeq	3.3M	2010	5
デンマーク(1)	95	HiSeq	?	2013	13
デンマーク(2)	297	HiSeq	?	2013	13
中国	368	HiSeq	4.3M	2012	7
米国	90	HiSeq	4.9M	2012	6
ベネズエラ(南米) マラウイ(アフリカ)	15	454	?	2012	12
アイルランド	27	HiSeq	2.5M	2012	8
スウェーデン	145	HiSeq	6.0M	2013	9
ロシア	95	50UD	?	2013	10
日本	100	454/HiSeq/ION PGM	4.6M	-	未発表

1. NGS を用いた腸内細菌叢解析技術

今日汎用されている NGS を用いたヒト腸内細菌叢の解析法の全体概略を図2に示す。大きく3つの解析が行われ、それらは①16S 遺伝子データを元にしたメタ16S解析、②メタゲノム解析、③ヒトから分離された個々の細菌株のゲノム解析である。このほか、被験者の年齢や BMI、既往症、日頃の食事内容等のさまざまな

メタデータも収集されている。メタ16S データからは細菌種の特異性や菌種組成等の細菌データが得られる(詳細は後述)。メタゲノム解析からは上述した通り、遺伝子情報を元にした細菌叢の機能データが得られる(詳細は後述)。ヒト分離株のゲノムデータはメタゲノム及びメタ16S データの菌種帰属や菌種組成等の解析におけるリファレンスゲノムとして有用されている。これまでに6,000株以上が収集されており、データベースは日々アップデートされている(<http://www.hmpdacc.org/>)。

1-1. メタ16S解析

メタ16S解析の基本プロセスを図3に示す。16S 遺伝子の可変領域(本稿ではV1-V2領域を示す)を共通プライマーでPCR増幅し、増えた16SアンプリコンをNGSに供して、約5000リード/サンプルの16S配列データを得る。ついで、配列類似度(本稿では

96%類似度を閾値とした)を指標に16Sリードをクラスタリングし、配列が類似したリードをグループ化する。各グループは異なる16S配列、つまり異なる菌種ユニットを意味するので Operational Taxonomic Unit (OTU) とよぶ。得られる OTU 数は菌種数に近似され、細菌叢の多様性を調べる尺度になる。各 OTU の16S配列データを既知菌種の16Sデータベース及びゲノムデータベースに相関検索することで、各

OTU は配列類似度に依存して既知菌種あるいはもっとも近縁の既知菌種に帰属される。また、各 OTU を構成する 16S リード数は細菌叢でのそれぞれの相対的な割合とみなせる。つまり、これら一連の解析から、細菌叢を構成する菌種名とそれらの組成を知ることができる。このほか、各 OTU の 16S 配列から細菌叢を構成する細菌種の系統関係 (系統樹) も知ることができる。この系統樹を構成する菌種及び存在量を比較することで異なる細菌叢間の類似性を数値化でき、この解析法を UniFrac-距離及び主座標分析 (PCoA) と言う。UniFrac 解析は、例えば、疾患患者群の腸内細菌叢の異常 (dysbiosis) を健康者群との比較から評価することに有用される (図 4)。

メタ 16S 解析はメタゲノム解析よりもコストが安価であり、NGS を用いることで分量の配列データの取得と 100 サンプルのような多サンプルの同時解析 (数日内) も可能である。また、皮膚細菌叢のような微量の細菌叢 DNA にも対応できる。一方、メタ 16S 解析には PCR 増幅プロセスがあり、その増幅バイアスによる定量性の欠如を否めないが、それを軽減したヒト腸内細菌叢のメタ 16S 解析法も開発されている⁴⁾。

1.2. メタゲノム解析

メタゲノム解析は細菌叢メタゲノムの断片配列データを大量に収集し、その配列データから遺伝子等の機能情報を情報学的 (バイオインフォマティクス) に解析する手法である。基本

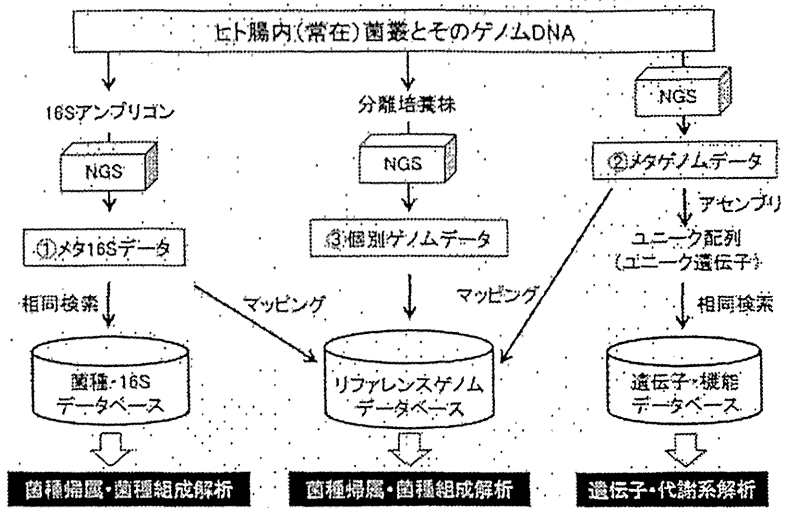


図 2 NGS を用いた腸内 (常在) 細菌叢解析法の全体概略

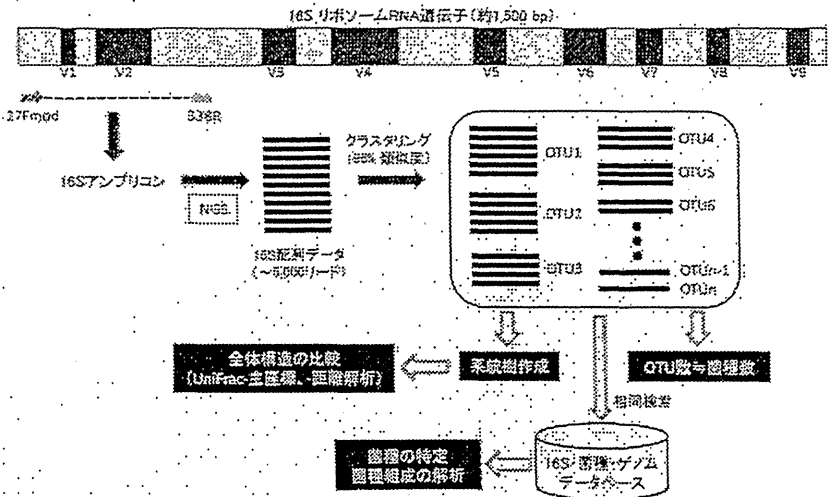


図 3 16S リボソーム RNA 遺伝子配列をベースとした細菌叢解析

的な操作は、NGS から得られる大量のメタゲノムリードをアセンブリして非重複 (ユニーク) ゲノム配列データ (コンティグとシングルトン) を取得する。ついで、その配列中に遺伝子予測プログラムを用いて遺伝子配列を同定する。得られた遺伝子配列をクラスタリングして高い

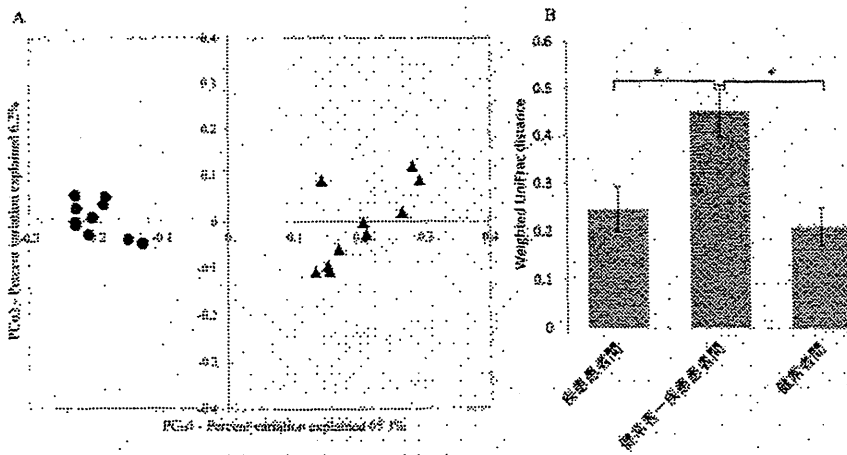


図4 腸内細菌叢の UniFrac 解析例

- (A) UniFrac 距離に基づく PCoA 解析。健康者群の各個人の腸内細菌叢 (●) とある疾患患者群の各個人の腸内細菌叢 (▲) がそれぞれ異なるクラスターを形成しており、両群は異なる構造の細菌叢を持つことを示す。
- (B) 平均 UniFrac 距離値。健康者群・疾患患者群間の UniFrac 距離の値が健康者群内および疾患患者群内と比較して有意に高く、同群の細菌叢が有意に異なることを示す。エラーバーは標準誤差を示す。
* は t test における統計学的有意性を示す (p<0.01)。

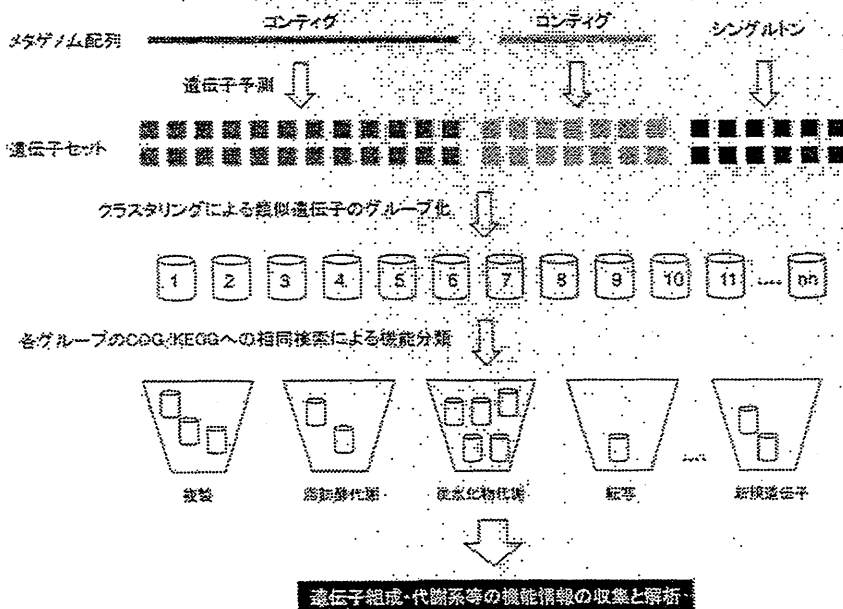


図5 ヒト腸内(常在)細菌叢メタゲノムデータの情報学的解析プロセス

配列類似度をもつ遺伝子群をグループ化する。ついで、それらを COG (Clusters of Orthologous Groups) や KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 等の機能既知遺伝子のデータベースに相同検索することで、各グループあるいはそれを構成する各遺伝子を機能分類し、細

菌叢がもつ代謝系等の機能特性を明らかにする(図5)。メタゲノム解析では、対象とする細菌叢の複雑さや多様性に依存して、取得する配列データ量を考慮する必要がある。少ないデータ量から検出される遺伝子の多くは優占菌種に由来することになり、細菌叢全体の機能特性を正確に評価することはできない。幸い NGS を用いることにより、今日では、検体あたり数百万リード以上(塩基数にして数億塩基以上)という大量のデータ取得も可能であり、1つのプロジェクトで100名程度のヒト腸内細菌叢から数百万のユニーク遺伝子が同定されている(表参照)。

菌叢がもつ代謝系等の機能特性を明らかにする(図5)。

メタゲノム解析では、対象とする細菌叢の複雑さや多様性に依存して、取得する配列データ量を考慮する必要がある。少ないデータ量から検出される遺伝子の多くは優占菌種に由来することになり、細菌叢全体の機能特性を正確に評価することはできない。幸い NGS を用いることにより、今日では、検体あたり数百万リード以上(塩基数にして数億塩基以上)という大量のデータ取得も可能であり、1つのプロジェクトで100名程度のヒト腸内細菌叢から数百万のユニーク遺伝子が同定されている(表参照)。

メタゲノム解析では、メタゲノムリードを上述したリファレンスゲノムに直接マッピング(相同検索、配列類似度閾値: $\geq 95\%$)することで、各リードの菌種帰属と各ゲノムにマップされるリード数から菌種組成を見積もることができる(図2)。本方法はそのプロセスに PCR 操作がなく、メタ16S解析(図3)よりもより定量性の高い細菌叢解析法となる。メタゲノムデータから得られた菌種組成や遺伝子組成データを主成分分析や階層式クラスタリング等の統計手法を駆使することで異なる細菌叢間の相違を調べることもできる。なお、今日のヒト腸内細菌叢のマッピングでは、メタゲノムリードの約80%がリファレンスゲノムにマップされる。

しかし、このマッピング法はリファレンスゲノムが十分に収集されていないマウスや他の環境の細菌叢にはあまり有効ではない。

2. ヒト腸内細菌叢メタゲノム研究の現状

我が国では、2005年に筆者らが中心となった Human MetaGenome Consortium Japan (HMGI) が発足し、同年パリでヒトマイクロバイオーム研究の最初の国際会議が開催された。そして、2006年に米国グループが、2007年に HMGI がヒト腸内細菌叢のメタゲノム解析を世界に先駆けて論文発表した¹⁾。これらの先駆的論文では、腸内細菌叢がヒト代謝系を補完する多くの代謝系を有することや腸内細菌叢に特徴的な機能遺伝子の特定等が行われた。その後、2008年に日米欧中などからなる International Human Microbiome Consortium (IHMC) が設立され、それと同時に、米国 NIH の Human Microbiome Project (HMP)、フランスを中心とした欧州連合 (EU) + 中国 BGI (Beijing Genomics Institute) の Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHIT) Project が開始された。これらのプロジェクトでは NGS を駆使し、100 名規模でのメタゲノム解析が進められた。2010年に MetaHIT が 124 名のスペイン人とデンマーク人の腸内細菌叢メタゲノムを発表した²⁾。2012年には HMP によるアメリカ人の腸内や皮膚、口腔等の 18 部位の常在菌叢³⁾、MetaHIT/BGI による 345 名の中国人⁴⁾、178 名のアイルランド人⁵⁾ の腸内細菌叢がそれぞれ論文となった。さらに、2013年には 145 名のスウェーデン人⁶⁾、96 名のロシア人¹⁰⁾ の腸内細菌叢が発表された (表)。筆者らも 100 名以上の日本人腸内細菌叢メタゲノムデータの解析を進めている (未発表)。これらの 1,000 名を超える被験者の腸内細菌叢からは 1,000 万以上のユニーク遺伝子が同定されて

おり、この数はヒト遺伝子数 (~2.5 万) をはるかに凌駕する。これらの研究では、健康者腸内細菌叢の基本的な全体構造^{3,4,11)}、年齢や地域あるいは食習慣等による構造の違い^{4,12)}、くわえて、2 型糖尿病や肥満等の疾患患者の腸内細菌叢の解析が行われた^{3,7,13)}。今日、腸内細菌叢の異常 (dysbiosis) が消化器系だけでなく代謝系や神経系を含む全身的な疾患と関係することが明らかになって来ている¹⁴⁾。

米国 HMP の第 2 期 (2013 ~) では、早産の経験者を含む妊婦の常在菌叢と宿主 (母子) の特性、炎症性腸疾患 (IBD) の腸内細菌叢と宿主の特性、前糖尿病状態から 2 型糖尿病への移行期にある患者の腸内細菌叢と宿主の特性について、ヒト多型、メタゲノム、メタトランスクリプトーム、メタボローム等の宿主データの収集も含めた研究が進められている¹⁵⁾。

3. ヒト腸内細菌叢の全体像

メタゲノム解析及びメタ 16S 解析からヒト常在菌叢の全体像がきわめて正確に明らかになって来た。構成細菌種の大部分は 4 つの門 (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria) の菌種で占められるが、その相対的な組成は個人間や生息部位、年齢によって高い多様性を示す^{6,16)}。例えば、Firmicutes 門は腸内の最優占菌種であり、Actinobacteria 門や Proteobacteria 門は口腔や皮膚、鼻腔でその組成比が高くなる。マイナー菌種である Fusobacteria 門は口腔細菌叢で相対的に多くなる。TM7 門のような口腔内でしか検出できない菌種もいる。個人間の多様性はこれら菌種の有無や組成比の違いに起因する。例えば、124 名の欧州人の腸内細菌叢メタゲノム解析では、124 名全員に共通した菌種はわずか 18 菌種であった²⁾。すなわち、常在菌叢にはヒトゲノムのような血縁同士の高い遺伝性はほとんど

どなく、きわめて個人に特異的である。一方ヒト腸内細菌叢は、*Bacteroides* 属、*Prevotella* 属、*Ruminococcus* 属の3属がそれぞれのタイプで優占菌種となる3つのエンテロタイプに分類できる。エンテロタイプは人種や地域に関係なく、一様に分布していると考えられているが、最近の筆者らの解析から、日本人の多くは *Ruminococcus* タイプであり、欧米人の多くは *Bacteroides* タイプであることが分かった。なお、*Prevotella* タイプはベネズエラやアフリカの原住民に多い。エンテロタイプは地域や食習慣によって、その分布状態が偏っているらしい(筆者ら、未発表)。

ヒト腸内細菌叢の遺伝子数については、上述したように、1,000万以上のユニーク遺伝子が検出されている。興味あることに、腸内細菌叢の菌種組成は各個人間で大きく異なるが(上述)、遺伝子(機能)組成はほとんど個人間で差がない。この事実は、各菌種がもつ遺伝子組成が腸内細菌叢の形成に大きく関係することを示唆している。上述した4門の優占菌種は、とくに人体での生息に適した遺伝子(機能)を獲得し、長い進化の中で選択されてきた菌種と考えられる。

ヒト腸内細菌叢を特徴づける遺伝子(機能)は、豊富な炭水化物代謝系の機能群である。このことから、腸内細菌の主なエネルギー源は宿主が消化できない植物由来の多糖類であると考えられる。また、その代謝産物は酢酸や酪酸、ビタミンなどのヒト細胞に有用なものである。つまり、ヒトと腸内細菌は相互扶助的な関係にある。もうひとつの特徴は、腸内細菌叢には鞭毛や化学走性などの細胞運動に関わる遺伝子群がきわめて少ないことである。腸内ではその蠕動運動のために自ら餌に向かって移動する必要がなく、宿主免疫のターゲットとなる鞭毛を持つ多くの病原菌との識別等、これらを持たな

い細菌種の選択と優占化は、常在菌叢が生体恒常性の維持に密接に関係することを示唆する。

おわりに

上述したように常在菌叢研究の国際化とNGSの実用化により、ヒト腸内細菌叢の構造実態と機能に関する多くの知見がこの5年間に蓄積された。また、疾患患者の腸内細菌叢解析から、消化管だけでなく、全身的な疾患にも腸内細菌叢の *dysbiosis* が密接に関係することが明らかになった。今後は、腸内細菌叢の *dysbiosis* に関わる外的内的要因の解明及びそのヒトへの作用機構を多面的に解明することがきわめて重要な課題になると考えられる。

文 献

- 1) Gill SR, Pop M, Deboy RT, *et al* : Science 312: 1355-1359, 2006.
- 2) Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, *et al* : DNA Res. 14: 169-181, 2007.
- 3) Hamady M, Lozupone C, Knight R: ISME J. 4: 17-27, 2010.
- 4) Kim SW, Suda W, Kim S, *et al* : DNA Res. 20: 241-253, 2013.
- 5) Qin J, Li R, Raes J, *et al* : Nature 464: 59-65, 2010.
- 6) Human Microbiome Project Consortium: Nature 486: 207-214, 2012.
- 7) Qin J, Li Y, Cai Z, *et al* : Nature 490: 55-60, 2012.
- 8) Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, *et al* : Nature 488: 178-184, 2012.
- 9) Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, *et al* : Nature 498: 99-103, 2013.
- 10) Tyakht AV, Kostyukova ES, Popenko AS, *et al* : Nat Commun. 4: 2469, 2013.
- 11) Arumugam M, Raes J, Pelletier E, *et al* : Nature 473: 174-180, 2011.
- 12) Yatsunenka T, Rey FE, Manary MJ, *et al* : Nature 486: 222-227, 2012.
- 13) Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, *et al* : Nature 500: 541-546, 2013.
- 14) Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R: Cell 148: 1258-1270 (2012).
- 15) Proctor LM: 米 国 NIH HMP (Human Microbiome Project) の概要、大野博司、服部正平(編)「常在細菌叢が換るヒトの健康と疾患」実験薬学増刊 32 (5) 38-40 (2014).
- 16) Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenka T, *et al* : Nature 457: 480-484, 2009.

特

集

腸内細菌叢と脳腸相関~Microbiome-Gut-Brain Axis~

Gastrointestinal
Research

ヒト腸内細菌マイクロバイオームの特徴

服部正平*** 西嶋 傑***

Summary

近年におけるメタゲノム解析法の開発、国際プロジェクトの進展や次世代シーケンサー(NGS)の進歩などにより、ヒト腸内細菌叢研究は体系だったマイクロバイオーム研究としてこの5~6年間で世界的に大きく前進した。これらの研究から、ヒト腸内細菌叢の全体構造やさまざまな疾患との関連、また、宿主に作用する機能菌種の特異性やその作用機構が明らかになってきた。これらの成果から、腸内細菌叢がこれまでの想像を超えて、宿主のさまざまな生理状態に密接に関与し、腸にとどまらず免疫系、代謝系、あるいは神経系などの全身にかかわることがわかってきた。

Key words

メタゲノム 腸内細菌 次世代シーケンサー (NGS)

はじめに

ヒトマイクロバイオーム(ヒト常在菌叢を構成する細菌種の集合ゲノム)を包括的に解析する計画は、わが国では、2005年にわれわれが中心となって設立されたHuman MetaGenome Consortium Japan(HMGJ)の発足にはじまる。同年パリでヒトマイクロバイオーム研究の最初の国際会議が日米欧などからの研究者が集まって開催された。そして、2006年に米国グループ¹⁾が、2007年にわが国のHMGJ²⁾がヒト腸内細菌叢のメタゲノム解析を世界に先駆けて論文発表した。これらの研究によって腸内細菌叢が有する遺伝子や代謝系(=機能)などが同定され、ヒト腸内マイクロバイオームの機能特性がはじめて明らかにされた。つ

いで、2008年には日米欧中などの研究者からなるInternational Human Microbiome Consortium(IHMC)が設立された³⁾。それと同時に、米国のHuman Microbiome Project(HMP)、欧州連合(European Union:EU)と中国Beijing Genomics Institute(BGI)のMetagenomics of the Human Intestinal Tract(MetaHIT)プロジェクトが開始された。HMPは口腔や皮膚、腸内などの全身の常在菌叢、MetaHITプロジェクトは腸内細菌叢に特化したプロジェクトである。本稿では、この5~6年間で世界規模に進められたヒト腸内細菌叢研究を解説する。

I ヒト腸内細菌叢研究の全体概要

今日のIHMCが進めているヒト常在菌叢研究

* HATTORI Masahira, NISHIJIMA Suguru/東京大学大学院新領域創成科学研究科情報生命科学専攻
** 東京大学大学院新領域創成科学研究科オーミクス情報センター

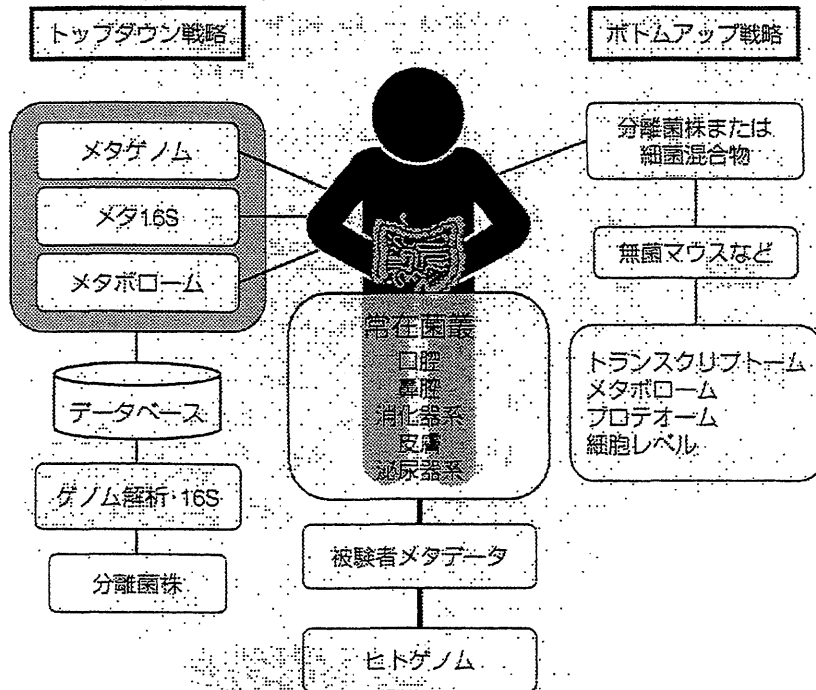


図 1. ヒト常在菌叢研究の全体概要

の全体概要を図1に示す。ヒトを対象とした研究では、健康および疾患患者からの常在菌叢（腸内細菌叢の多くは糞便から調製）のメタゲノム、16S ribosomal RNA (16S) 遺伝子、代謝物（メタボローム）を収集・解析する。また、ヒトのさまざまな部位から分離培養できたヒト常在菌株のゲノム解析もおこなう。このほか、被験者の遺伝的背景（多型情報など）や食習慣、年齢や body mass index (BMI)、既往症などのさまざまな宿主メタデータの収集も細菌叢データを解釈するうえできわめて大事である。

このような細菌叢のメタ 16S やメタゲノムデータの収集・体系化、疾患細菌叢の研究（後述）が進む一方で、宿主に作用する常在菌種の探索・特定や宿主-常在菌間相互作用のメカニズムの解明に関する研究も活発になってきた。たとえば、ヒト腸内細菌叢の優占菌種の一つである *Bifidobacterium* による大腸菌 O157 感染死の防御機構の解明⁹⁷、大腸癌と関連する *Fusobacterium* の特定⁹⁸、T細胞の分化にかかわる *Bacteroides*⁹⁹、マ

ウスの子グメント細菌 (segmented filamentous bacteria: SFB)⁹⁹、ヒト *Clostridium*⁹⁸、プロバイオティック *Clostridium* 株¹⁰⁰などの同定、より最近では、T細胞の分化にかかわる常在菌由来の酪酸の同定¹¹などがある。これらの研究では、おもにマウスなどのモデル動物を利用し、宿主の細胞や遺伝子レベルなどのさまざまなデータを統合したオミクスデータによるアプローチによるものが多い。このような生物学的実験から機能菌種を探索・特定する研究はボトムアップ戦略であり、上述した多数の細菌叢データを情報学や統計学で解析する研究はデータ駆動型のトップダウン戦略である。この二つの戦略が両輪となって常在菌叢研究は今後もさらに高度化され、想像を超えた常在菌（叢）の機能が明らかにされると見込まれる。

2 | 次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢解析

近年における次世代シーケンサー (Next Generation Sequencers: NGS) の進歩は、従来と

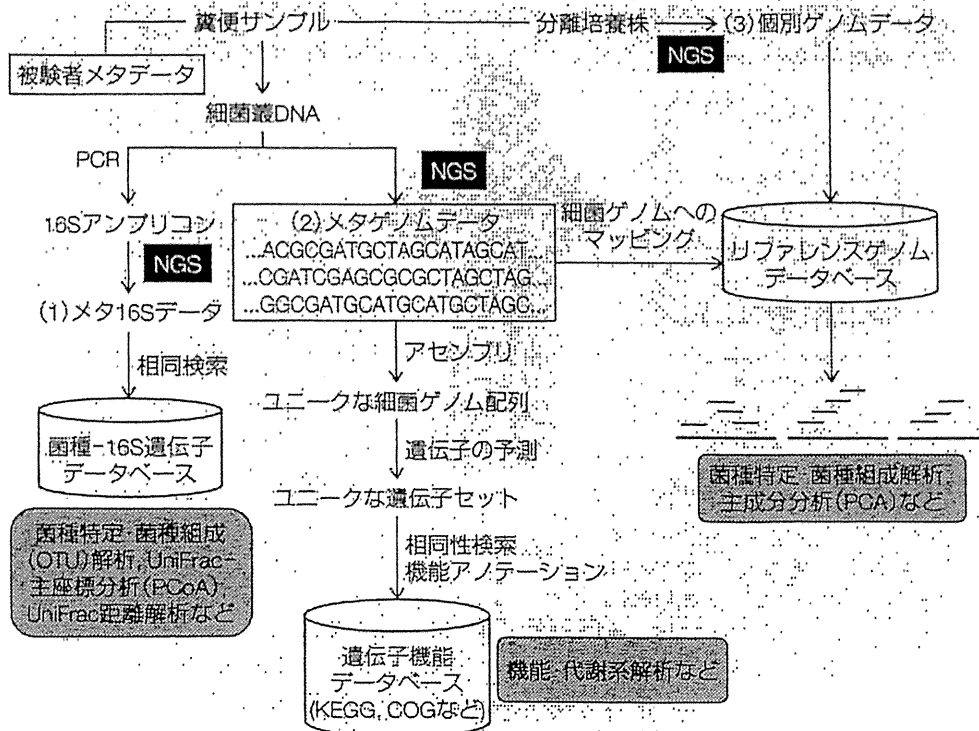


図 2. NGS を用いた腸内細菌叢解析法の概略

は桁違いの大量の菌種・遺伝子データを活用した腸内細菌叢研究を可能にした。図 2 に NGS を用いた腸内細菌叢の解析法の概略を示す。NGS による解析では、16S 遺伝子 (1)、細菌叢メタゲノム (2)、分離培養された細菌株の個々のゲノム (3) の収集・解析が主要テーマとなる。

メタ 16S 解析では、16S 配列データのクラスタリングによって形成される operational taxonomic units (OTU) の各代表配列の 16S 菌種データベースへの相同検索による菌種の特異性、各 OTU を構成する 16S データ数から細菌叢の菌種 (OTU) 組成比が求められる。また、OTUs から作成できる系統樹を用いて細菌叢間にある全体的な構造類似性を UniFrac-主座標分析や UniFrac 距離解析により調べる事ができる¹²⁾。一方、NGS を用いたメタ 16S 解析には 16S 配列の polymerase chain reaction (PCR) 増幅におけるバイアスや NGS データに含まれるシーケンスエ

ラーに起因した改良すべき定量性の問題があったが、合成細菌叢を用いた解析法の評価と検討から、高い定量性をもったヒト腸内細菌叢のメタ 16S 解析法が開発されている¹³⁾。

メタゲノム解析では、細菌叢 DNA を直接 NGS でショットガンシーケンスをおこない、アセンブリステップなどを経て、ユニーク配列を得る。ついで、遺伝子予測プログラムを用いてメタゲノム配列中に遺伝子配列を同定する。これら遺伝子を機能や代謝系のデータベース [Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) や Clusters of Orthologous Groups (COG)] に相同検索することで、細菌叢が有する遺伝子や代謝系などの機能プロファイルを得ることが出来る。また、これらのデータを細菌叢間で比較することで細菌叢に特徴的な機能を抽出することができる。このほか、メタゲノムリードを分離培養株のゲノム (リファレンスゲノムデータベース) に相同検索 (マッ

表 1. ヒト腸内 (常在) 細菌叢のメタゲノム解析

年	論文の主たるテーマ	検体数	シーケンサー	非重複塩基数 (Gb)	おおよその遺伝子数	文献
2006	米国人腸内細菌叢のメタゲノム解析	2	ABI3730xl	0.08	5万	1)
2007	日本人腸内細菌叢のメタゲノム解析	13	ABI3730xl	0.8	66万	2)
2008	国際コンソーシアム IHMC の発足					3)
2010	スペイン+デンマーク人腸内細菌叢のメタゲノム解析	124	Illumina	10.3	330万	14)
2012	米国人 (18 部位) 常在菌叢のメタゲノム解析	139	Illumina	17.7	490万	15)
	中国人のメタゲノムから?型糖尿病のマーカーの探索	145	Illumina	8.6	430万	16)
	アイルランド高齢者腸内細菌叢のメタゲノム解析	27	Illumina	2.2	250万	17)
2013	スウェーデン人腸内細菌叢のメタゲノム解析	145	Illumina	13.6	480万	18)
	ロシア人腸内細菌叢のメタゲノム解析	96	SOLID	3.4	—	19)
—	日本人腸内細菌叢のメタゲノム解析	167	454/Miseq/1cn PGM	10.8	460万	未発表

ピング) することで、菌種の特異性やメタ 16S 解析よりも定量的な高い菌種組成解析、その主成分分析 (principal component analysis: PCA) からは細菌叢間の構造比較が可能である。今日、3,000 以上のヒト常在菌株のゲノムデータ (<http://www.himpdacc.org/>) が収集・公開されており、今日、ヒト腸内細菌叢のメタゲノムデータの ~80% がこれらゲノムに有意にマップされる。さらなる個別ゲノムデータの収集がいまも進められている。なお、リファレンスゲノムが充実していないマウスなどの常在菌叢や他の環境細菌叢では、このマッピングによる菌種解析は有効でない。

メタ 16S 解析では機能解析はできないが、メタゲノム解析よりもサンプルあたりのコストが 1/10 程度と安価であり、多サンプルの菌種解析に適している。また、皮膚細菌叢のような微量の細菌叢 DNA の解析にも (PCR 増幅ステップがあるので) 対応できるという利点をもつ。

3 ヒト腸内細菌叢の大規模メタゲノム解析

上述した米国グループ¹⁾(2006年)¹⁾とわが国の

HMGJ (2007年)²⁾のヒト腸内細菌叢のメタゲノム解析では、まだ NGS が実用化されておらず、それぞれ 2名と 13名のサンプルがサンガー法を原理とした従来のキャピラリー式シーケンサーで解析された。その後、NGS が世界的に普及し、被験者・サンプル数や解析深度が著しく増大した (表 1)。IHMC 設立後の 2010 年には MetaHIT が炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) の患者を含む 124 名の欧州人 (スペイン人+デンマーク人) の腸内細菌叢メタゲノムを発表した¹⁴⁾。2012 年には HMP による 139 名の米国人の腸内や皮膚、口腔などの 18 部位の常在菌叢¹⁵⁾、MetaHIT による糖尿病を含む 345 名の中国人¹⁶⁾、178 名の高齢者アイルランド人¹⁷⁾の腸内細菌叢がそれぞれ論文となった。さらに、2013 年には糖尿病を含む 145 名のスウェーデン人¹⁸⁾と 96 名のロシア人¹⁹⁾の腸内細菌叢が論文となった。われわれも 100 名以上の日本人腸内細菌叢の NGS によるメタゲノムデータの解析を進めており、これを含めた 1,000 人以上の腸内細菌叢データの予備解析からは、1,000 万程度のユニーク遺伝子が同定された (筆者ら、未発表)。この数はヒト遺伝子数 (約

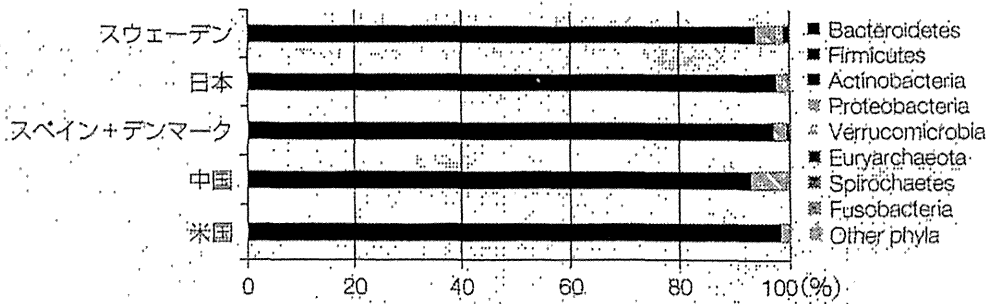


図3. 国別の平均ヒト腸内細菌叢の菌種組成 (門レベル)

2.2万)を遥かに凌駕しており、腸内細菌叢がヒトより遥かに多様な遺伝子をもっていることを示唆する。

4 ヒト腸内細菌叢のマイクロバイオーム構造

腸内細菌叢を含めたヒト常在菌叢の95%以上は4つの門 (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria)の菌種で占められる。この菌種組成は個人や地域間、生息部位ごとで大きく異なる¹⁴⁾¹⁵⁾。わが国と他の国の平均菌種組成 (門レベル)を比較したわれわれの解析から、わが国とスウェーデンでは Firmicutes が最優占菌種であるのに対して、米国や中国などでは Bacteroidetes が最優占菌種となった (図3)。この結果は、腸内細菌叢の菌種組成は必ずしも宿主間の遺伝的距離に相関しないことを示唆する。また、これらの菌種組成は欧米や中国の高脂質/低炭水化物の食事と日本人の低脂質/高炭水化物の食事と相関するが、スウェーデンに Firmicutes が優占することを明確に説明できない。また、日本人だけに Actinobacteria が他国にくらべて多いことも特徴である。2011年に、ヒト腸内細菌叢の菌種組成 (属レベル) が大きく三つのタイプ (エンテロタイプ) に分類できることが報告された²⁰⁾。Bacteroides (Type 1)、Prevotella (Type 2)、Ruminococcus (Type 3) の3属がそれぞれのタイプで優占菌種となる特徴をもつ。エンテロタイプは

人種や地域に関係なく、一様に分布していると考えられているが、最近のわれわれの解析から、日本人の多くは Type 3 であり、米国人や中国人の多くは Type 1 であることがわかった (筆者ら、未発表)。なお、Type 2 は南米やアフリカの原住民に多いタイプである。また、エンテロタイプは短期間の食事の変化にはほとんど影響を受けず、安定に保持される²¹⁾。

腸内細菌叢の菌種組成は個人間や地域集団間で大きく異なるが (上述)、それらがコードする遺伝子 (機能) 組成はほとんど同じである²²⁾。われわれの日本人 100 名の解析からも同様の結果が得られている (図4)。この事実は、菌種よりも遺伝子の機能が腸内細菌叢形成に大きく関与していることを意味する。上述した4門の優占種は、とくにヒト腸内での生息に適した遺伝子を獲得し、長い進化のなかで選択されてきたものと考えられる。

図4からもわかるように、ヒト腸内細菌叢を特徴づける機能は、豊富に存在する炭水化物代謝系の遺伝子群である²⁾。腸内細菌のおもなエネルギー源は、宿主の食事由来の多糖類であり、腸内細菌はこれらを代謝することでエネルギーを得ている。また、その代謝産物は酢酸や酪酸、ビタミンなどのヒト細胞に有用なものである。もう一つの特徴は、腸内細菌叢には鞭毛や化学走性などの運動にかかわる遺伝子群がきわめて少ないことである²⁾。このことは宿主免疫系と関係し、これらをもたない細菌種の選択と優占化は、宿主と腸内

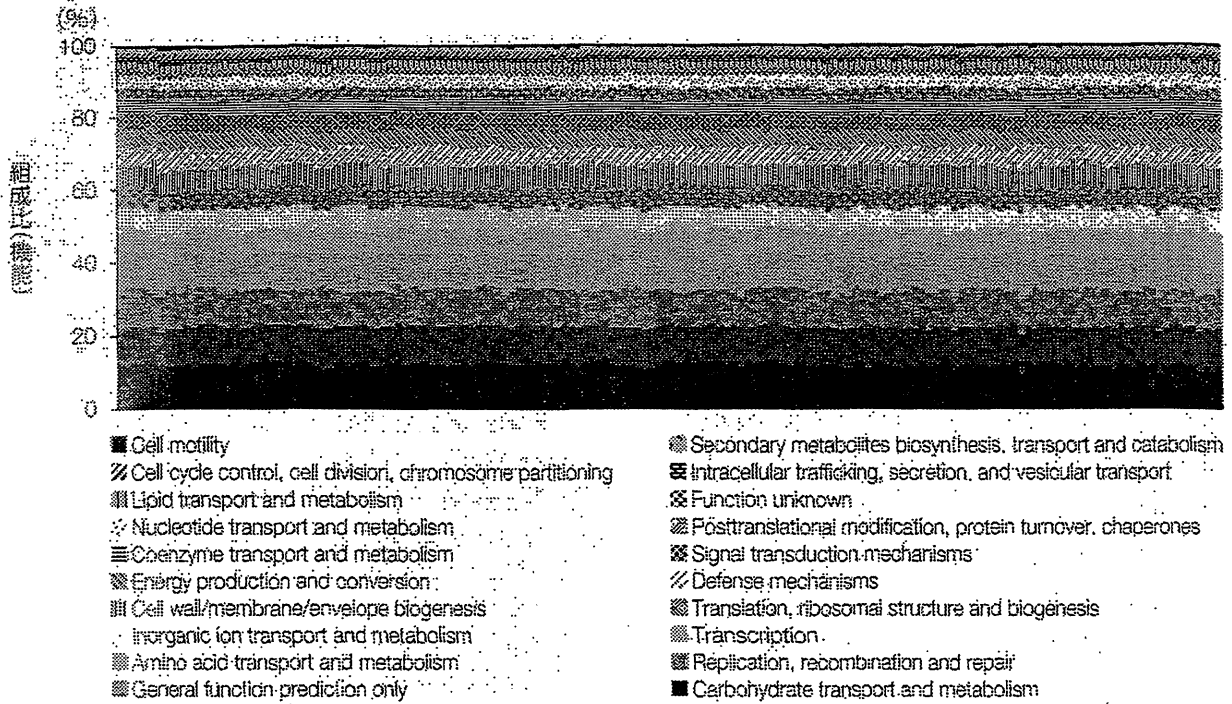


図 4. ヒト腸内細菌叢の遺伝子（機能）組成

横軸：被験者（100名の健康成人）、メタゲノムデータ数：100万以上/サンプル

細菌の両方にとって不利な炎症反応を最小限に抑える方向での進化があるようである。

5 ヒト腸内細菌叢と疾患

ヒト腸内細菌叢はさまざまな疾患（肥満^{22,23}、IBD²⁴、糖尿病¹⁶、自閉症²⁵、アテローム性動脈硬化症²⁶など）と密接に関係し、消化器系のみならず全身の代謝系や免疫系、神経系（脳機能）とリンクしている（表2）。これらの疾患の腸内細菌叢の多くは、健康者群とくらべて有意な菌種組成異常（dysbiosis）を示す。たとえば、IBDの腸内細菌叢では Firmicutes と Bacteroidetes が健康者群にくらべて有意に減少し、Proteobacteria が相対的に増加する²⁴。また、菌種数も有意に減少する（多様性の減少）。肥満では Firmicutes が増加し、Bacteroidetes が相対的に減少する²³。これらの細菌叢異常と宿主の生理状態は互いに影響し合うようである。たとえば、遺伝子欠損で肥満症になったマウスの腸内細菌叢は dysbiosis を起こ

表 2. 腸内細菌叢との関連を示す疾患例

肥満
メタボリック症候群
炎症性腸疾患 (IBD)
過敏性腸症候群
アテローム性動脈硬化症
リウマチ性疾患
糖尿病 (1型, 2型)
アレルギー
セリアック病
大腸癌
肝臓癌
多発性硬化症
自閉症

す。ところが、この dysbiosis した腸内細菌叢を遺伝的に健全な無菌マウスに移植すると、そのマウスも肥満症となった²³。このほか、乳児・幼児の成長期や女性の妊娠時でも腸内細菌叢が大きく変動する^{27,28}。これらのデータは、腸内細菌叢が

これまでの想像を遥かに超えて、宿主の全身的な生理状態に直接的に影響することを強く示唆するものである。

おわりに

NGSの驚異的な進歩により、今後も細菌叢の解析コストは低くなりスピードもさらに加速すると考えられる。よって、これまでの数百名規模の解析から今後は数万人規模のコホート研究も予想され、これらの研究からは想像を超えた腸内細菌叢の生理機能の新たな発見が期待される。そして、得られる知見は、これまでのヒト遺伝子産物をターゲットとした創薬概念とは違った、非自己である常在菌叢をターゲットあるいは活用した新たな治療法や予防法、診断法の開発につながると期待される。

文献

- 1) Gill SR, Pop M, Deboy RT *et al* : Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312 : 1355-1359, 2006
- 2) Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T *et al* : Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* 14 : 169-181, 2007
- 3) Mullard A : Microbiology : the inside story. *Nature* 453 : 578-580, 2008
- 4) Fukuda S, Toh H, Hase K *et al* : Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469 : 543-547, 2011
- 5) Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS *et al* : Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 22 : 292-298, 2012
- 6) Castellarin M, Warren RL, Freeman JD *et al* : *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* 22 : 299-306, 2012
- 7) Rouhd JL, Mazmanian SK : Inducible *Foxp3* regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 107 : 12204-12209, 2010
- 8) Ivanov IL, Atarashi K, Manel N *et al* : Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139 : 485-498, 2009
- 9) Atarashi K, Tanoue T, Oshima K *et al* : Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature* 500 : 232-236, 2013
- 10) Hayashi A, Sato T, Kamoda N *et al* : A single strain of *Clostridium butyricum* induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. *Cell Host Microbe* 13 : 711-722, 2013
- 11) Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S *et al* : Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504 : 446-450, 2013
- 12) Hamady M, Lozupone C, Knight R : Fast UniFrac : facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *ISME J* 4 : 17-27, 2010
- 13) Kim SW, Suda W, Kim S *et al* : Robustness of gut microbiota of healthy adult in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. *DNA Res* 20 : 241-253, 2013
- 14) Qin J, Li R, Rase J *et al* : A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464 : 59-65, 2010
- 15) Human Microbiome Project Consortium : Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486 : 207-214, 2012
- 16) Qin J, Li Y, Cai Z *et al* : A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490 : 55-60, 2012
- 17) Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S *et al* : Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488 : 178-184, 2012
- 18) Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I *et al* : Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 498 : 99-103, 2013
- 19) Tyakht AV, Kostryukova ES, Popenko AS *et al* : Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nat Commun* 4 : 2469, 2013