

健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌叢の解析に関する研究

研究分担者 國澤 純
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
ワクチンマテリアルプロジェクト・プロジェクトリーダー
研究協力者 細見 晃司
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
ワクチンマテリアルプロジェクト・特任研究員

<目的>

本研究では、食事や運動などの生活習慣、腸内細菌叢、腸管免疫、疾患発症との相互関係を明らかにするために健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌データベースの構築を目指している。初年度は、ヒト試料を対象に腸管免疫や腸内細菌叢の解析方法を確立し、データ収集を開始するための検討を行った。また、食事と腸管免疫という観点から、腸管での免疫応答を新しい食事成分としてビタミン B1 に着目し、腸管 IgA 産生における役割について解析を行った。

<方法>

採便および便の輸送方法を確立するために、採取したヒト便からすぐに DNA 抽出した場合と保存液に浸した状態で2日間室温に放置した便から抽出したDNAを用いた場合で腸内細菌叢の解析を行い、結果を比較した。また、本事業では扱う検体数が多いことから、自動抽出器による DNA 抽出の最適化を行った。腸管免疫因子として IgA 抗体を定量的に検出するためのサンドイッチ ELISA 法を確立し、冷凍や冷蔵などの保存方法の違いによる影響を検討した。ビタミン B1 がエネルギー代謝に必須であることから、IgA 抗体産生細胞の分化過程におけるエネルギー代謝産物のメタボローム解析を行い、代謝経路の変化とビタミン B1 への依存性について検討した。また、ビタミン B1 欠乏食で飼育したマウスを用いて、経口ワクチン（コレラ毒素）に対する免疫応答を検討した。

<結果と考察>

採便後すぐに DNA 抽出した場合に比べて保存液を用いることで Firmicutes/Bacteroides 比 (F/B 比) が減少する傾向にあった。また、市販のキットを用いて DNA 抽出した場合に比べて自動抽出した DNA では F/B 比が増加する傾向にあった。同様に属レベルでの菌叢解析においても Firmicutes 門や Bacteroides 門に属する菌の割合の変化が認められた。採便方法や DNA 抽出方法が腸内細菌叢の解析結果にある程度影響することが明らかとなった。今後、このようなサンプリングなどの解析方法による違いがサンプル間の比較解析に与える影響について検体数を増やして検討していく予定である。しかし、保存液を用いることで便を室温で保存・輸送しても腸内細菌叢を解析できたことから、初年度は保存液を用いた腸内細菌叢解析のデータ収集をすでに開始している。また、ヒト便を一晩冷凍、冷蔵保存したサンプルにおいて、採便後すぐに処理したサンプルと同程度に IgA 抗体を検出できた。

エネルギー代謝産物のメタボローム解析から、腸管に存在する IgA 抗体産生細胞はその前駆体であるナイーブ B 細胞に比べて、解糖系への依存度が高いことが明らかとなった。ビタミン B1 がクエン酸回路に関連することから、ビタミン B1 欠乏食で飼育したマウスにおいては腸管（パイエル板）のナイーブ B 細胞の著しい減少が認められた。また、ビタミン B1 欠乏食飼育マウスでは経口投与したワクチン抗原（コレラ毒素）特異的な糞便中 IgA 抗体の減少などの免疫応答の減弱が認められた。ビタミン B1 の摂取は日常の食事だけでなく腸内細菌や糖尿病などとも関連していることから、生活習慣、腸内細菌叢、腸管免疫、疾患発症の相互関係を理解する上でビタミンとエネルギー代謝が一つのキーワードになると考えている。

A. 研究目的

腸内細菌叢の変化や乱れがぜんそくなどのアレルギー疾患や肥満、代謝性疾患などに関連することがヒトや疾患モデルを用いた研究から明らかとなってきた。また、食事や運動といった生活習慣や腸管免疫の違いが腸内細菌叢を変化させることも報告されている。しかし、これらの研究成果の多くは欧米人を対象としたものであり、食文化や生活習慣が異なるわが国では異なった知見が得られる可能性がある。また、先行研究では参加者の生活習慣の違いは全く考慮されておらず、腸管免疫に関する個人差も明らかとなっていない。本研究では、生活習慣病やアレルギー疾患の新しい予防法確立に資する健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌データベースの構築を目的に、食事や運動などの生活習慣と生活習慣病との関係に関するコホート研究から得られたヒトの便サンプルを用いて、次世代シーケンサーを用いた16Sメタゲノム解析および免疫因子(IgA抗体や抗菌分子)などを測定する免疫学的手法(ELISAなど)を確立し、解析を開始する。腸内細菌や腸管免疫と関連する食事・栄養成分に関する新規知見を得ることを目的に、ビタミンB1の腸管における役割について解析する。

B. 研究方法

B-1 腸内細菌叢の解析プロトコルの確立

家庭での採便を考慮して、便サンプルを室温で保存・輸送し腸内細菌叢を解析するプロトコルについて検討した。ヒト便をテクノスルガから市販されている採便キット(保存液入り)を用いて採取し、保存液に浸した状態で室温で2日間保存した場合と採便後にすぐにDNA抽出した場合で菌叢解析を行い、結果を比較した。DNA抽出はガラスビーズ破砕した便サンプルからISOFEALキット(ニッポンジーン)を用いて行った。

腸内細菌叢の解析方法を以下に示す。便から抽出したDNAを12.5 ngをテンプレートにプライマー(forward; 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGCGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'、reverse; 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3')とPCR酵素 KOD plus (Toyobo)を用いて95 30sec-55 30sec-68 1min:25サイクルの条件で16SのV3-V4領域の約550 bpを増幅した。Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter)を用いてPCR産物の精製を行い、Nextera XT Index Kit v2 set A (Illumina)を用いてライブラリーを調整した。シーケンスはMiseq Reagent Kit v3 (Illumina)を用いてMiseq (Illumina)で行った。得られたFastqファイルから、イルミナ社のクラウドサービス(Basespace)上の16S metagenomicsを利用してGreengenesデータベースをもとに菌種を同定し、菌叢解析を行った。

B-2 核酸自動抽出器を用いた便からのDNA抽出

出条件の最適化

本事業では取り扱う検体数が多いこと、DNA抽出におけるヒューマンエラーを防止するという観点から、核酸自動抽出器GENE PREP STAR (クラボウ)を用いた便からのDNA抽出の最適化を行った。マウス便を採便キット(テクノスルガ)を用いて採取、ガラスビーズ破砕し、ISOFEALキットもしくはGENE PREP STARで抽出したDNAを用いて菌叢解析を行い、結果を比較した。また、保存液の持ち込みによる影響が懸念されることから、保存液を除く目的でサンプルを遠心分離もしくはPBS洗浄し、自動抽出するという群を加えて検討を行った。

B-3 ヒト便中の腸管免疫因子(IgA抗体)の検出法の確立と便の保存方法による影響の検討

サンドイッチELISA法により以下の5つの条件で保存した便サンプルからIgA抗体を検出した。

ヒト便を採取し、採取後すぐに調整した。

-30 で2日間冷凍保存。

4 で1日間冷蔵保存後、-30 で1日間冷凍保存。

室温で1日間放置後、-30 で1日間冷凍保存。

採便キットを用いて保存液に浸した状態で室温保存。

以下に試料の調整方法とサンドイッチELISAの条件を示す。ヒト便に100 mg/mlとなるようにPBSを添加し、ボルテックスにより4 で10分間懸濁した後、3,000 x g、4 で10分間遠心分離を行った上清を-30 で保存し、試料として用いた。

サンドイッチELISAは、プレート: NUNC-IMMUNO PLATE (Thermo Scientific)、固着化抗体: Goat anti-human Ig(H+L)-UNLB (Southern Biotech)(1,000倍希釈)、ブロッキング: 1% BSA添加PBS、検出用抗体: Goat anti-human IgA-HRP (Southern Biotech)(4,000倍希釈)、基質: TMB (フナコシ)で行った。

B-4 ビタミンB1の腸管における機能解析

マウス腸管のパイエル板から回収したナイーブB細胞と絨毛組織から回収したIgA産生細胞のエネルギー代謝物(クエン酸やグルコース1リン酸など)を測定した。ビタミンB1欠乏餌と通常餌で3週間飼育したマウスの腸管のパイエル板と絨毛組織におけるナイーブB細胞数およびIgA産生細胞数を測定した。ビタミンB1欠乏餌もしくは通常餌飼育マウスに飼育開始後14、21日目にコレラ毒素を経口免疫し、最終免疫から10日後に便中のコレラ毒素特異的IgA抗体および腸管組織のコレラ毒素特異的IgA抗体産生細胞数を測定した。その間、最終免疫後の10日間の飼育は通常餌にて飼育した。

(倫理面への配慮)

ヒトサンプルを用いた解析、マウスを用いた動物実験について、いずれも所属する研究所において申請を行い、承認後に研究を開始している。

C. 研究結果

C-1 腸内細菌叢の解析プロトコルの確立

採便キットを用いて採取し、保存液に浸した状態で室温で2日間保存した場合（保存液群）では採便後にすぐにDNA抽出した場合（対照群）を比較した結果、腸内細菌叢の多様性の指標となるSannon species diversityは保存液群で2.635、対照群で2.554であり、保存液群で252菌種、対照群で237菌種が同定された（表1）。Firmicutes/Bacteroides比（F/B比）は保存液群で0.67、対照群で1.01であった（図1）。同様に属レベルでの菌叢解析においても、保存液群で*Bacteroides*の割合が増加し、Firmicutes門に属する*Faecalibacterium*の割合が減少していた（図2）。

C-2 核酸自動抽出器を用いた便からのDNA抽出条件の最適化

以下の4群を設定し、菌叢解析の結果を比較した。

- 1) ISOFECALキットを用いた手動による抽出
- 2) 自動抽出（前処理なし）
- 3) 遠心分離したサンプルから自動抽出
- 4) PBS洗浄したサンプルから自動抽出

Sannon species diversityは1)のISOFECALキットを用いた手動による抽出では1.973、2)の自動抽出器を用いた抽出では2.130、3)の遠心分離した群では2.214、4)のPBS洗浄した群では2.372であり、手動による抽出に比べて自動抽出の方が高い傾向にあった（表2）。1)では214菌種、2)では266菌種、3)では180菌種、4)では200菌種が同定された（表2）。F/B比は1)で0.34、2)で0.59、3)で0.74、4)で1.71であり、自動抽出において遠心分離やPBS洗浄といった前処理を行うことで高くなった（図3）。同様に3)や4)では2)に比べて、*Bacteroides*門に属する*Parabacteroides*や*Bacteroides*の割合が減少し、Firmicutes門に属する*Lactobacillus*の割合が増加していた（図4）。

C-3 健常な日本人の腸内細菌叢データの収集と20検体の測定例

2015年12月31日時点で39検体を収集し、39検体すべてのDNA抽出を完了し、そのうちの20検体についてはシーケンスを行い、16S配列データを取得した。また、1月以降も集まった検体から順にDNA抽出を行っており、抽出したDNAを保管している。

すでにデータを取得した20検体の測定例について、各検体につき200菌種以上が同定された（表3）。サンプルID 6230、6228、6222は*Parabacteroides*タイプのエンテロタイプを示し、その他の17検体は*Bacteroides*タイプに大別す

ることができた（図5）。

C-4 ヒト便中の腸管免疫因子（IgA抗体）の検出法の確立と便の保存方法による影響の検討

サンドイッチELISAによりヒト便中のIgA抗体を検出することができた。方法B-3に示すやの冷凍や冷蔵で保存した場合は、の採便後すぐに試料を調整した場合と同程度にIgA抗体が検出されたが、の室温で保存した場合では発色強度（OD450nm）の減弱が認められた（図6）。の採便キットを用いた場合は、発色強度が顕著に減弱していた（図6）。

C-5 ビタミンB1の腸管における機能解析

マウスのパイエル板から回収したナイーブB細胞と腸管絨毛組織から回収したIgA産生細胞のエネルギー代謝物を測定した結果、解糖系代謝物であるグルコース1リン酸がナイーブB細胞に比べてIgA産生細胞で多く検出された。一方で、クエン酸回路の代謝物であるクエン酸やコハク酸は両細胞で変化は認められなかった。

ビタミンB1欠乏餌で飼育したマウスでは通常餌で飼育したマウスに比べてパイエル板が小さく、B220陽性のナイーブB細胞が減少していた。一方で腸管絨毛組織に存在するIgA産生細胞の組織内分布および細胞数の変化は認められなかった。ビタミンB1欠乏餌飼育マウスでは便中のコレラ毒素特異的IgA抗体が減少し（図7）、腸管組織のコレラ毒素特異的IgA抗体産生細胞数も減少していた。

D. 考察

C-1の検討において、保存液を用いることでF/B比の減少や一部の菌の割合の変化が認められた。この原因は保存液に含まれるグアニジン塩などのタンパク変性剤によって一部の菌が溶菌したためではないかと考えられる。しかし、採便キットを用いることでヒト便を室温で保存・輸送しても腸内細菌叢を解析できることが確認されたので、本年度の本事業においてはサンプリングや輸送の観点から、採便キットを用いた採便が妥当であると考えた。また、採便キットを用いることで家庭での採便が可能となり、協力者の精神的な負担の軽減とそれに伴う参加者の増加が期待できる。

C-2の検討において1)ISOFECALキットを用いた手動による抽出に比べて、2)自動抽出の方がSannon species diversityが高く、多くの菌種を同定できるという結果であった。DNA抽出時に使用しているdetergentの違い等が影響したと考えられる。また、前処理の影響については、遠心分離やPBS洗浄などの前処理を行うことで検出できる菌の数が減るといった結果であった。この結果はグラム陰性菌などの保存液で溶菌してしまう菌のDNAを遠心分離やPBS洗浄の過程でロスした結果を反映していると考えられる。以上の検討から、採

便方法やDNA抽出方法が腸内細菌叢の解析結果に影響を及ぼすことが明らかとなった。今後、このようなサンプリングなどの解析方法による違いがサンプル間の比較解析に与える影響について検体数を増やして検討していく予定である。しかし、保存液中の便から前処理を行わずに自動抽出したDNAを用いて菌叢解析が可能であると考えられることから、本事業では採便キットを用いて採便し、検体は室温で保存・輸送し、核酸自動抽出器を用いて抽出したDNAにより解析を進めている。昨年未までに39検体のDNA抽出とそのうち20検体のシーケンスを完了している。また、16S配列データの取得だけではなく、抽出したDNAや便そのものを冷凍保管しており、バンクとしての活用も可能ではないかと考えている。

C-4の検討からサンドイッチELISA法によるヒト便中のIgA抗体の検出方法を確立した。冷凍や冷蔵で保存した便サンプルからIgA抗体を検出でき、多少室温で放置しても大きな影響がないことが明らかとなった。しかし、腸内細菌叢解析用の保存液に浸した便からはIgA抗体の検出が困難であると考えられることから、腸管免疫因子の解析には便を採便後すぐに冷凍するなどの方法を確立する必要があると考えられる。また、IgA抗体以外にdefensinなどの抗菌分子の検出も検討していく予定である。

ビタミンB1は水溶性ビタミンの一種で欠乏すると脚気になることが知られている。しかし、腸管における役割や欠乏の影響は十分に理解されていなかった。一方で、IgA抗体は腸管をはじめとする粘膜面での生体防御の中核を担う因子であり、腸内細菌叢の構成などにも影響することが報告されている。ビタミンB1がクエン酸回路に必須な因子であることから、腸管免疫担当細胞のエネルギー代謝と機能に着目し解析を行った結果、ナイーブB細胞はIgA産生細胞へ分化する過程においてエネルギー代謝が変化することが明らかとなった。その結果として、ナイーブB細胞はIgA産生細胞に比べてビタミンB1への依存性が高いと考えられる。さらに、ビタミンB1の欠乏により、ワクチン抗原に対する免疫応答(抗原特異的IgA抗体産生)が減弱することが明らかとなった。食事や栄養状態が腸管免疫に大きく影響することが明らかとなり、ビタミンB1の摂取が日常の食事だけでなく腸内細菌や糖尿病などとも関連していることから、生活習慣、腸内細菌叢、腸管免疫、疾患発症の相互関係を理解する上でビタミンとエネルギー代謝が一つのキーワードになると考えている。ビタミンB1は本事業における検討項目の一つになり得ると考えられる。

E. 結論

本年度の検討から腸内細菌叢の解析プロトコルを確立し、すでにデータの取得を進めている。IgA抗体などの腸管免疫因子を解析するためには採便や便の輸送方法の改良が必要で

ある。

腸管免疫と生体防御という観点からビタミンB1の新たな機能と重要性が明らかとなり、本事業における評価項目の一つとなり得ることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kunisawa J, Sugiura Y, Wake T, Nagatake T, Suzuki H, Nagasawa R, Shikata S, Honda K, Hashimoto E, Suzuki Y, Setou M, Suematsu M, Kiyono H: Mode of bioenergetic metabolism during B cell differentiation in the intestine determines the distinct requirement for vitamin B1. *Cell Rep* 2015; 13:122-131

Suzuki H, Kunisawa J: Vitamin-mediated immune regulation in the development of inflammatory diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2015; 15:212-215

2. 学会発表

國澤純、栄養を介した免疫制御と創薬・機能性食品開発への展開 日本薬学会第136年会 横浜(パシフィコ横浜)(2016年3月28日)

國澤純、腸内環境を介した免疫制御の基礎的解明と創薬、機能性食品開発への展開 第97回日本栄養・食糧学会関東支部会大会シンポジウム 東京(東京大学)(2016年3月12日)

Jun Kunisawa, Diet-Commensal Crosstalk for the control of gut immunity Environment controlling normal and diseased hematopoietic and immune systems (Yokohama, RIKEN, 2 March, 2016)

國澤純、栄養 腸内フローラネットワークを介した免疫制御と疾患 BMFHシンポジウム2016 東京(東京大学)(2015年2月13日)

國澤純、腸から眺めるヘルスサイエンス 第3回先進イメージング医学研究会・学術集会 神戸(有馬温泉ホテル)(2015年2月12日)

國澤純、免疫制御における腸内環境の影響と免疫創薬、機能性食品、ワクチンへの展開 第6回学際的脂質創生研究部会講演会 徳島(徳島大学)(2015年1月22日)

國澤純、医薬・健康・栄養の複合的観点

から見たヘルスサイエンス 彩都産学
官連携フォーラム2016 大阪(千里ライ
フサイエンスセンター) (2016年1月20
日)

國澤純、腸内環境を介した免疫制御とア
ジュバント開発への展開 第9回 次世
代アジュバント研究会 大阪(千里ライ
フサイエンスセンター) ((2016年1月1
9日)

國澤純、食と腸管免疫を起点とした機能
性食品、創薬に向けた新たな展開 HiH
A第5回ワークショップ 広島(広島大
学) (2015年11月27日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

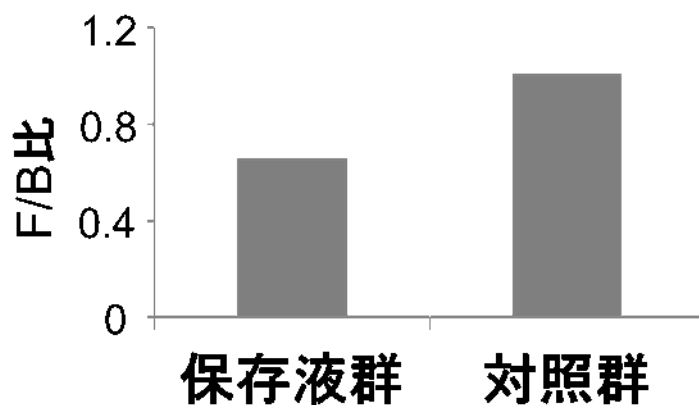


図1. 採便キットを用いた菌叢解析の検討 (Firmicutes/Bacteroides比)(C-1)

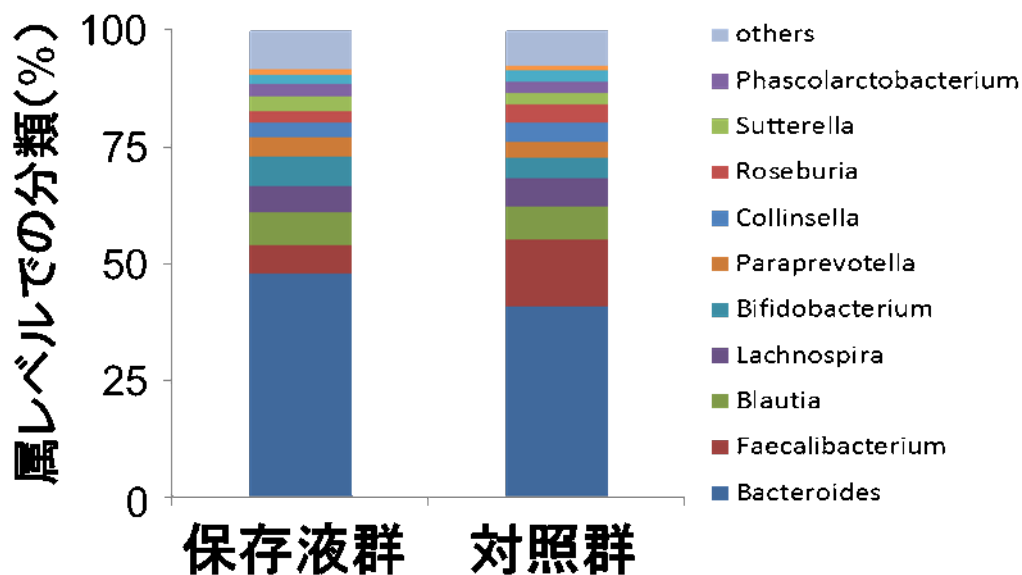


図2. 採便キットを用いて採取したヒト便の菌叢解析(C-1)

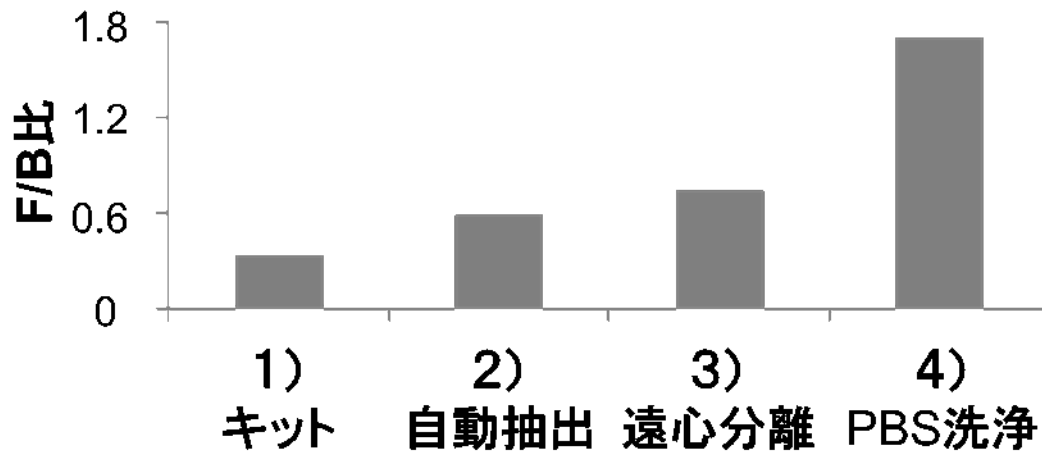


図3. 核酸自動抽出器を用いた菌叢解析の検討 (Firmicutes/Bacteroides比)(C-2)

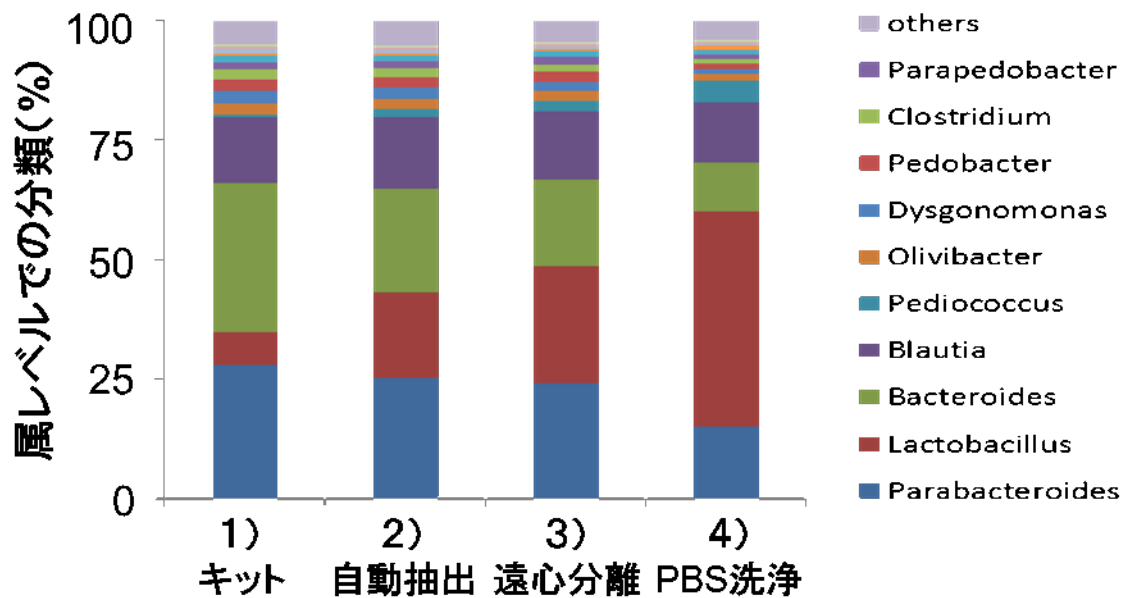


図4. 核酸自動抽出器を用いて採取したヒト便の菌叢解析(C-2)

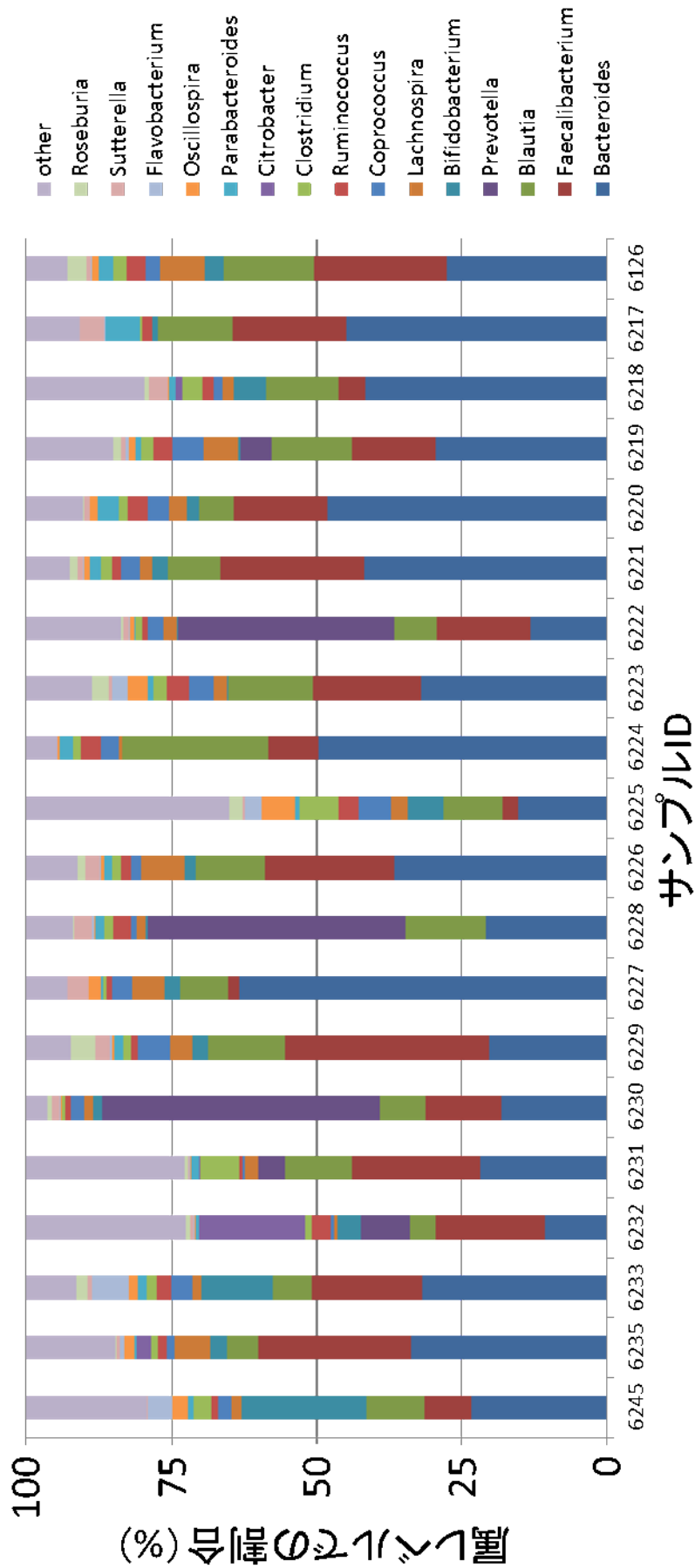


図5. 最初に解析を終えた20サンプルの測定例(C-3)

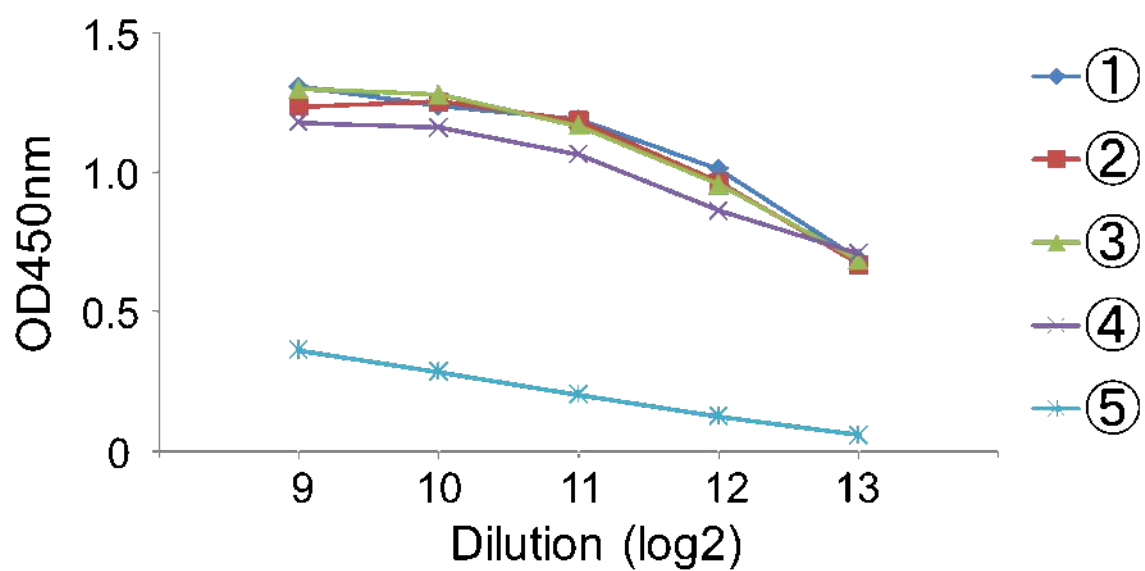


図6. ヒト便中のIgA抗体の検出

- ①採便後すぐ ②冷凍2日間 ③冷蔵1日間、冷凍1日間
 ④室温1日間、冷凍1日間 ⑤保存液で室温2日間

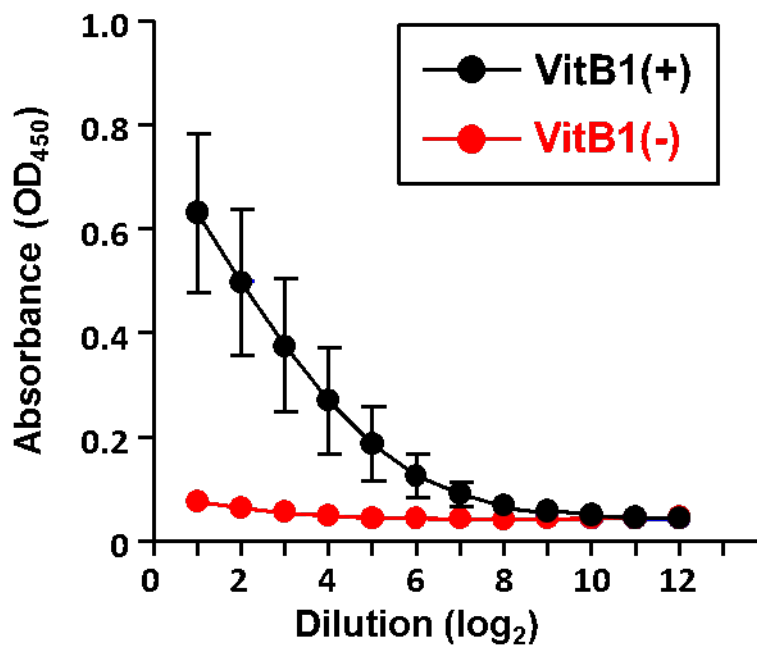


図7. 経口ワクチンに対する腸管IgA応答における
ビタミンB1の効果

ビタミンB1欠乏餌、もしくはコントロール餌で3週間飼育した。その間、Day 14と21にコレラトキシンを経口免疫した。Day 31に糞便を回収し、コレラトキシン特異的IgAをELISA法にて測定した。両群ともDay 21から31までは通常餌で飼育した。

表1. 多様性の指標の比較(C-1)

	Sannon species diversity	同定菌種数
保存液群	2.635	252
対照群	2.554	237

表2. 多様性の指標の比較(C-2)

	Sannon species diversity	同定菌種数
1)ISOFECALキット	1.973	214
2)自動抽出	2.130	266
3)遠心分離	2.214	180
4)PBS洗浄	2.372	200

表3. 同定できた菌種の数(C-3)

サンプルID	菌種数
6245	429
6235	344
6233	406
6232	408
6231	320
6230	266
6229	298
6227	243
6228	267
6226	283
6225	432
6224	253
6223	318
6222	370
6221	296
6220	334
6219	406
6218	344
6217	225
6126	301