

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

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
腸内環境システムプロジェクト
プロジェクトリーダー

< 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。採便キット（保存液）を用いた腸内細菌叢の解析プロトコルに関する検討結果を研究論文としてまとめ、プロトコルを公開する。また、研究期間の最終年度となる 29 年度は、腸管免疫と腸内細菌の分析を進め、目標である 600 名分の分析を完了する。また得られたデータの一部を用い、腸内細菌と関連のある生活習慣を検索する。

< 方法 >

前年度までに確立した保存液を用いたサンプル収集とサンプルからの DNA 抽出方法を学術論文に投稿した。また同方法を用い、ヒト糞便を対象に次世代シーケンサーを用いた糞便中の菌叢解析を行った。また Bioplex や ELISA 法を用いて血液サンプル中のサイトカイン、IgG および IgA 抗体、抗菌ペプチドなどの免疫因子を測定した。さらに本研究班で構築したデータベースを用いて腸内細菌叢と食事成分や免疫因子の関連を解析した。

< 結果と考察 >

保存液を用いて採取した便からの菌叢解析においては、採便量に注意し、便の複数か所から採取した便を保存液とよく混和し、できれば採便から 1 週間以内に前処理を行わずに抽出した DNA を用いて菌叢解析することが望ましいという結果を研究論文として公表し、さらに、関連機器メーカーのホームページで公開した。

またこれまでに収集したヒト試料（糞便、血液）について腸内細菌と免疫因子の分析を進め、目標である 600 名分以上（腸内細菌叢 722 名分、免疫因子 646 名分）のデータ取得を行い、データベースに収載した。本データベースを用いた解析から、Bacteroidetes の割合と正の相関もしくは負の相関を示す食事成分や血中の炎症性サイトカイン濃度と負に相関する腸内細菌を同定した。今後、これらの知見をもとに介入試験や動物モデルを用いた試験が行われ、因果関係や機能が解明されることで食事や腸内細菌を介した新規の疾患の予防法や治療法の開発に繋がると期待できる。

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動物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健康に関するコホート研究から得られたヒトの便サンプルについて次世代シーケンサーを用いた 16S メタゲノム解析を行うと共に、血液サンプルについて免疫因子（サイトカインや抗菌分子）などを免疫学的手法（ELISA など）を用いて分析する。

また、腸内細菌の研究分野において簡便か

つ安定に試料を採取・保管し、腸内細菌叢を分析できる方法の確立が求められている。そこで、本事業で確立した保存液を用いた解析プロトコルを論文などで公表し、さらに多くの研究者が活用できるようにする。

また得られたデータをデータベースに収載し、腸内細菌と関連のある生活習慣や生体機能を検索する。

B．研究方法

ヒト便をテクノスルガ・ラボ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、ビーズ破砕（ガラスビーズ、4,260 rpm、50秒）および核酸自動抽出器GENE PREP STAR（クラボウ）によってDNAを精製し、16SのV3-V4領域を増幅し、シーケンスを行った。シーケンスはMiseq Reagent Kit v3 (Illumina)を用いてMiseq (Illumina)で行い、得られたFastqファイルから、Qiimeなどの解析パイプラインを用いて菌種を推定した。

保存液を用いた採便においては、以下の点に注意が必要である（詳細は平成28年度に報告済み）。

- 1．便の複数か所からサンプリングを行う。
- 2．採便量は0.1 g/ml以下にする
- 3．保存液の希釈を避ける
- 4．保存液と便をよく混和する
- 5．保管期間は短い方が望ましい
- 6．前処理を行わずにDNAを抽出する

これらの検討結果を研究論文として公表し、さらに本プロトコルと関連しているメーカーであるクラボウ、ニッポンジーン、イルミナの各社のホームページでプロトコルを公開した。

また、採取した血液から血清を分離し、サイトカインや抗菌ペプチドなどをELISAやBioplexを用いて測定した。さらに質問票やBDHQなどを用いて対象者の食事などの生活習慣に関する情報を取得した。得られたデータをデータベース化し、ピアソンの相関係数などを用いて相関解析を行った。

（倫理面への配慮）

ヒトサンプルを用いた解析について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 健常な日本人の腸内細菌および腸管免疫

データの収集

平成27年度から平成29年度の研究期間において、糞便と血液をそれぞれ746検体収集した。すべての糞便からDNA抽出を完了しており、そのうちの722検体についてはシーケンスを完了し、16S配列データを取得した。また、余剰のDNAおよび便サンプルは-30℃で凍結保管している。

これまでに収集した血液サンプルのうち、646検体のサイトカイン・ケモカイン、抗菌ペプチドの測定を完了した。余剰の血液サンプル（血清および血漿）は-80℃もしくは液体窒素で凍結保管している。

C-2 腸内細菌と食事や免疫因子との関連

健常者20名のデータを用いて食事成分と腸内細菌の相関を解析した結果、食事成分AがそれぞれBacteroidetesと負に相関することが明らかとなった（図1。未発表データのため食事成分名は明示せず）。さらに、腸内細菌と免疫因子の相関を解析した結果、炎症性サイトカインであるMIP-1 α やIL-4と負の相関を示す腸内細菌が同定された（図2。未発表データのため食事成分名は明示せず）。

D．考察

C-1の通り、722名分の腸内細菌叢、646名分の腸管免疫因子の分析を完了し、600名という目標を達成できた。さらに、予備的な検討ではあるが、腸内細菌と食事成分や免疫因子の関連が明らかになってきたことから、今後、これらのデータをもとに介入試験や動物モデルを用いた試験が行われ、因果関係や機能が解明されることで食事や腸内細菌を介した新規の疾患の予防法や治療法の開発に繋がると期待できる。

E．結論

本研究の検討から採便キットを用いた腸内細菌叢の解析プロトコルを最適化し、論文発表した。さらに関連メーカー各社のホームページでプロトコルを公開し、広く活用してもらえ体制が構築できた。データベースの構築においては、目標である600名を超える722名分の腸内細菌叢、646名分の腸管免疫因子の分析を完了し、データベースを用いた解析から腸内細菌と食事成分や免疫因子の関連を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 T. Nagatake, Y. Shiogama, A. Inoue, J. Kikuta, T. Honda, P. Tiwari, T. Kishi, A. Yanagisawa, Y. Isobe, N. Matsumoto, M. Shimojou, S. Morimoto, H. Suzuki, S. Hirata, P. Steneberg, H. Edlund, J. Aoki, M. Arita, H. Kiyono, Y. Yasutomi, M. Ishii, K. Kabashima, and J. Kunisawa, 17,18-EpETE- GPR40 axis ameliorates contact hypersensitivity by inhibiting neutrophil mobility in mice and cynomolgus macaques. *J Allergy Clin Immunol* (2018, in press)
- 2 N. Shibata, J. Kunisawa, K. Hosomi, Y. Fujimoto, K. Mizote, N. Kitayama, A. Shimoyama, H. Mimuro, S. Sato, N. Kishishita, K. J. Ishii, K. Fukase, and H. Kiyono. Lymphoid tissue-resident *Alcaligenes* LPS induces IgA production without excessive inflammatory responses via weak TLR4 agonist activity. *Mucosal Immunol* (in press)
- 3 K. Hosomi, H. Ohno, H. Murakami, Y. Natsume-Kitatani, K. Tanisawa, S. Hirata, H. Suzuki, T. Nagatake, T. Nishino, K. Mizuguchi, M. Miyachi, and J. Kunisawa, Method for preparing DNA from feces in guanidine thiocyanate solution affects 16S rRNA-based profiling of human microbiota diversity. *Sci Rep* 7(1):4339, 2017
- 4 Shibata N, Kunisawa J*, and Kiyono H. Dietary and microbial metabolites in the regulation of host immunity. *Front Microbiol* 8: 2171, 2017
- 5 S. Hirata and J. Kunisawa, Gut microbiome, metabolome, and allergic diseases. *Allergol Int* S1323-8930(17) 30086-2, 2017
- 6 K. Hosomi and J. Kunisawa, The specific roles of vitamins in the regulation of immunosurveillance, allergy, and inflammation in the gut. *Immune Netw* 17: 13-19, 2017
- 7 長竹貴広、國澤純 免疫・ワクチン応答

を左右する腸内環境因子としての栄養と腸内細菌 医学のあゆみ 264(5): 403-410, 2018

- 8 松永安由、國澤純 腸内フローラや食品成分を介した免疫グロブリンA産生制御 *Clinical Neuroscience* 35(11): 1285-1287, 2017
 - 9 平田宗一郎、國澤純 腸内環境を介したリポクオリティの形成とアレルギー疾患の制御 アレルギーの臨床 37(129) 49-52, 2017
 - 10 粕淵真由、木村郁夫、國澤純 腸内環境と腸管免疫・生体防御に関する新しいトピックス 消化と吸収 39(2): 66-70, 2017
- ### 2. 学会発表
- 1 國澤純、微生物の排除と共生を司る腸管免疫システムの理解と応用 日本薬学会第138年会 金沢(ホテル金沢)(2018年3月28日)
 - 2 國澤純、食と腸内細菌から考える栄養科学の新展開 第90回日本栄養評議会 東京(ホテルグランドヒル市ヶ谷)(2018年3月14日)
 - 3 國澤純、食と腸内細菌が織りなす腸内環境の構築と健康科学への新展開 第15回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム 東京(東京大学)(2018年3月9日)
 - 4 Jun Kunisawa, Involvement of Diets and Commensal Bacteria in the Regulation of Lipid-mediated Immune Regulation for the Control of Health and Diseases 4th Microbiome R&D & Business Collaboration Congress Singapore, Singapore (March 6, 2018)
 - 5 國澤純、食と腸内フローラが織りなす腸内環境とあなたの健康 国立健康・栄養研究所セミナー 東京(よみうりホール)(2018年2月25日)
 - 6 國澤純、ビッグデータから紐解く未病状態の理解と食による制御の可能性 JSPS「食による生体恒常性維持の指標となる未病マーカーの探索戦略」委員会 2017

- 年度 第 3 回研究会 東京 (東京大学)
(2018年2月9日)
- 7 國澤純、食と腸内細菌が織りなす腸内環境の構築と健康長寿社会の実現に向けた挑戦 一般財団法人キヤノン財団共催調査・研究部会シンポジウム「和食と健康」～「食」と今話題の腸内細菌研究の新展開～ 東京(富士ソフトアキバプラザ)
(2018年2月6日)
- 8 國澤純、健康科学における食と腸内フローラの可能性と双生児研究との連携 双生児研究学会 大阪(大阪大学)(2018年1月27日)
- 9 國澤純、食事成分と腸内細菌が形成する免疫環境と健康・長寿研究「健康長寿食品研究開発プラットフォーム」H29年度第4回公開ワークショップ 東京(COREDO日本橋)(2018年1月26日)
- 10 國澤純、食と腸内フローラから考える健康科学の最前線 第26回 アジア栄養科学ワークショップ 福岡(中村学園大学)
(2018年1月20日)
- 11 國澤純、食と腸内細菌が織りなす腸内環境と健康科学への新展開 ロートクロスイノベーションフォーラム 京都(ロートリサーチビレッジ京都)(2017年12月21日)
- 12 國澤純、腸内環境と免疫システムから考える健康科学の最前線 第1回 最先端粘膜免疫学シンポジウム 仙台(佐勘)
(2017年12月11日)
- 13 國澤純、栄養・腸内細菌を介した免疫制御と創薬・健康科学へのチャレンジ CVMW2017 大阪(大阪国際交流センター)
(2017年12月9日)
- 14 國澤純、食と腸内フローラが織りなす腸内環境の構築と健康科学への挑戦 早稲田大学セミナー 東京(早稲田大学)
(2017年11月28日)
- 15 國澤純、食と腸内フローラが織りなす腸内環境の形成と健康科学への新展開 平成29年度 日本臨床栄養研究会 徳島(アスティ徳島)(2017年11月26日)
- 16 國澤純、食と腸内細菌が織りなす腸内環境の構築と生体応答・疾患 第26回 東海
新生児研究会 名古屋(名古屋市立大学病院)(2017年11月25日)
- 17 國澤純、あなたのお腹は大丈夫? 健康増進における腸内環境の重要性と健康科学への新展開 立教大学ブランディング事業セミナー 東京(立教大学)(2017年11月21日)
- 18 國澤純、食事成分と腸内細菌が形成する免疫環境の理解と健康・長寿研究への展開 第16回ホスファチジルセリン研究会 東京(日比谷コンベンションホール)
(2017年11月2日)
- 19 國澤純、腸内環境を起点とする創薬・食品研究の現状と将来展望 第7回食品薬学シンポジウム 京都(京都薬科大学)
(2017年10月28日)
- 20 國澤純、健康科学におけるマイクロバイオームの可能性と将来展望 第4回関西バイオ医療研究会 大阪(産総研)(2017年10月23日)
- 21 國澤純、次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢解析のためのサンプル調整法と腸内細菌叢データを活用した健康科学への展開 イルミナウェビナー 東京(イルミナ)(2017年10月18日)
- 22 國澤純、腸内環境を介した生体構築とヘルスサイエンスへの展開 第44回 佐島シンポジウム 東京(慶応義塾大学)
(2017年10月13日)
- 23 國澤純、食と腸内フローラを介した健康維持と疾患 BioJapan2017 横浜(みなとみらい)(2017年10月13日)
- 24 國澤純、腸内環境に関するビッグデータの集積と機能性食品開発 食品開発展2017記念セミナー 東京(東京ビッグサイト)(2017年10月4日)
- 25 國澤純、食と微生物を介した腸内環境の構築と生体応答・疾患 第59回歯科基礎医学会学術大会 長野(松本歯科大学)
(2017年9月18日)
- 26 國澤純、質量分析技術を活用した腸内環境の理解とヘルスサイエンスへの展開 第42回 日本医用マスペクトル学会年会 東京(一橋講堂)(2017年9月14日)
- 27 Jun Kunisawa, Establishment of gut

- environment by dietary materials and commensal bacteria in the regulation of host immune responses AMED-Leibniz Workshop in the Life Sciences Ettal, Germany (September 10, 2017)
- 28 Jun Kunisawa, Crosstalk between diets and commensal bacteria for the creation of immunologic environment in the gut Cold Spring Harbor Asia Suzhou, China (September 6, 2017)
- 29 國澤純、ビタミンを介した免疫制御と健康科学への展開 第3回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会 東京 (海運クラブ) (2017年8月25日)
- 30 國澤純、食品と腸内細菌を起点に形成される生体構築と疾患 第7回 オルソオルガノジェネシス検討会 熊本 (熊本大学) (2017年8月24日)
- 31 國澤純、ヒトマイクロバイオームビッグデータ集積と健康医療応用の現状と展望 日本マイクロバイオームコンソーシアム設立記念シンポジウム 東京 (The Grand Hall 品川) (2017年7月28日)
- 32 Jun Kunisawa, Establishment of gut environment by dietary materials and commensal bacteria in the regulation of host immune responses Frontiers in agricultural immunology Sendai (Tohoku University) (July 24, 2017)
- 33 國澤純、ビタミンB1による生体防御メカニズムとコホートデータを活用した健康科学への展開 食肉と健康を考えるフォーラム 東京 (東郷記念館水交クラブ) (2017年7月18日)
- 34 國澤純、病原性細菌と共生細菌に対する免疫応答と制御 第64回トキシンシンポジウム 神戸 (兵衛向陽閣) (2017年7月10日)
- 35 國澤純、腸から考える健康増進と疾患 第18回日本毒性学会生涯教育講演会 横浜 (パシフィコ横浜) (2017年7月9日)
- 36 國澤純、アレルギー疾患における腸内環境の影響と健康科学への展開 第48回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術集会 福井 (AOSSA) (2017年6月30日)
- 37 國澤純、腸内細菌と食事を介した免疫環境の構築とヘルスサイエンスへの展開 第17回日本NO学会学術集会 徳島 (阿波観光ホテル) (2017年5月20日)
- 38 國澤純、腸内環境に関連するビッグデータの集積と健康科学、創薬、機能性食品開発への展望 第383回CBI学会研究講演会 大阪 (グランフロント) (2017年5月12日)
- 39 國澤純、お腹から始まる生体反応の摩訶不思議 生物資源工学研究所 特別セミナー 石川 (石川県立大学) (2017年4月24日)
- 40 國澤純、食や腸内フローラが形成する腸内環境と免疫制御、健康科学への展開 第76回 関西耳鼻咽喉科アレルギー研究会 大阪 (難波御堂筋ホール) (2017年4月22日)
- 41 國澤純、健康維持・増進に関わる腸内環境の摩訶不思議と創薬・機能性食品への展開 ~腸(お腹)から健康を考える~ 第151回 彩都バイオサイエンスセミナー 大阪 (彩都バイオヒルズセンター) (2017年4月14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

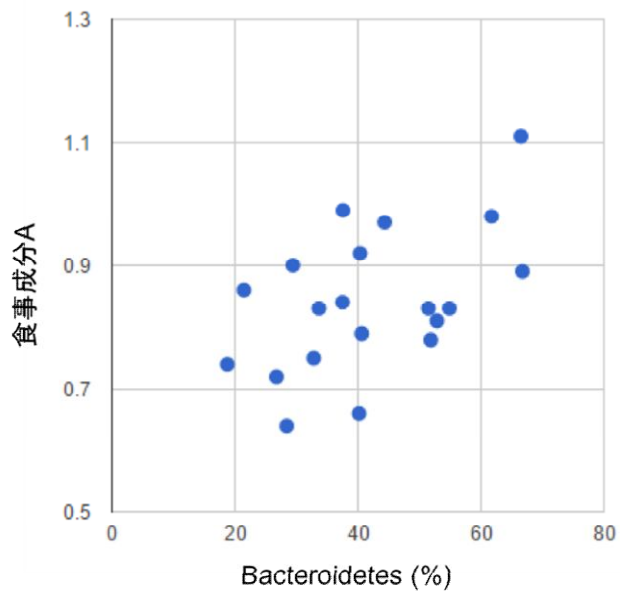


図1. 食事成分と腸内細菌の関連

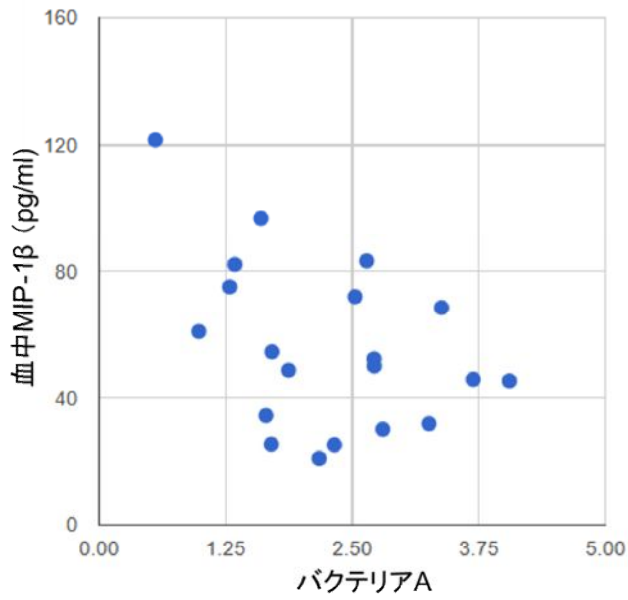


図2. 免疫因子と腸内細菌の関連