

## 腸内フローラ研究におけるノトバイオト技術の貢献と進展

### Contribution and progress of the gnotobiotic technology in gut microbiome research

森田 英利

Hidetoshi Morita

岡山大学大学院環境生命科学研究科

Graduate School of Environmental and Life Science

SPF (Specific Pathogen Free) あるいはコンベンショナルな環境下で飼育された実験動物を用いた研究により偉大で有益な成果が報告されてきた。一方、常在細菌叢を形成しているマウスでは、経口投与した細菌や細菌叢が定着しなかったり、経口投与した細菌や細菌叢のみの影響かどうかを判定することが困難な場合があるため、腸内細菌叢研究における大きな障害となっていた。ノトバイオトマウスとは無菌 (Germ-free) マウスにアイソレータの中で特定の細菌のみを植菌し腸内細菌叢をもつマウスであるが、ノトバイオトマウスを用いることで、生体に対する腸内細菌叢の影響に関する研究が蓄積してきた。本稿では、著者が一部関与しノトバイオトマウスを用いた腸内細菌 (叢) 研究成果について紹

介する。

#### 1) プロバイオティクス乳酸菌のつくる抗菌物質ロイテリンの *in vivo* 検出<sup>1)</sup>

*Lactobacillus reuteri* はプロバイオティクス効果が数多く報告されている菌種であり、抗菌物質としてロイテリン (3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドなど) を産生する。*L. reuteri* JCM 1112 の全ゲノム解析からロイテリン合成酵素遺伝子 (*gupCDE* 遺伝子) を推定し、これらの遺伝子群のノックアウト株を作出した。その結果、*L. reuteri gupCDE* 遺伝子破壊株には 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド合成酵素活性がなくなり 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを産生できなかった。そこで、マウス消化管での 3-ヒドロキシプロピ

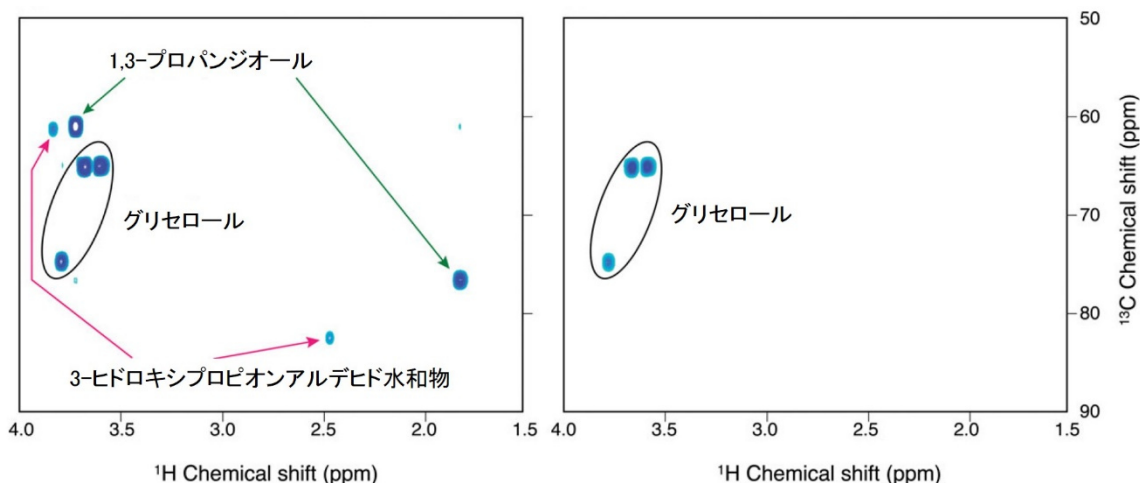


図 1.  $^{13}\text{C}_3$ -グリセロールを基質としたロイテリン (3-HPA 水和物：抗菌物質) の二次元核磁気共鳴法による *in vivo* 検出

哺乳動物の腸内に棲む乳酸菌 *L. reuteri* JCM 1112 とその *L. reuteri gupCDE* 遺伝子破壊株を、それぞれ無菌マウスに経口投与し、各菌株の消化管への単独定着マウスを作出した。それぞれの盲腸内容物を二次元核磁気共鳴法に供した結果、左図では 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド水和物を *in vivo* 検出し、右図のノックアウト株は 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを産生していない。

(参考文献 1 より一部改変して転用)

オンアルデヒドの *in vivo* 検出を試みたが、常在細菌を保有する SPF マウスなどでは望ましい結果が得られなかった。そこで、よりシンプルな系として、無菌マウスに、それぞれ *L. reuteri* JCM 1112 と *L. reuteri* *gupCDE* 遺伝子破壊株を単独で経口投与し、マウス盲腸内容物からロイテリンの主要成分である 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを二次元  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴法にて *in vivo* 検出を試みた。その結果、図 1 のとおり、*L. reuteri* JCM 1112 株を経口投与したマウス盲腸内容物からロイテリンの主要成分である 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを検出した<sup>1)</sup>。腸内細菌叢の構成細菌や経口投与したプロバイオティクスが消化管内で抗菌物質を産生している可能性が示された。

## 2) 腸管出血性大腸菌 O157 による腸管バリア機能増強による感染防御<sup>2)</sup>

無菌マウスに O157 を  $10^4$  ほどの細胞数を経口感染させると、マウスはほどなく感染死する。そこでビフィズス菌 (*Bifidobacterium* 属) を無菌マウスにあらかじめ経口投与しておく、そのノトバイオームマウスは O157 を経口投与しても感染死しなかった。一方で、あらかじめ経口投与しても、O157 感染死を予防できないビフィズス菌も存在し、菌種菌株によって O157 感染防御能に大きな違いがあった。なお、常在の腸内細菌叢をもつマウスでは、同細胞数の経口投与での O157 感染死は起こらなかった。

そういう背景の下、大野らを中心とする本研究グループは、最新のマルチオーミクス手法、すなわちゲノミクス、トランスクリプトミクス、メタボロミクスを駆使した統合解析手法により、ビフィズス菌が産生する酢酸が腸粘膜上皮の抵抗力を増強することで、マウスが O157 による感染死を免れることを明らかにしました。

そのさらなる追及として、感染防御可能なビフィズス菌と感染防御できないビフィズス菌の比較ゲノム解析から O157 感染防御に関する遺伝子群を推定した。その遺伝子破壊株によるノトバイオームマウスを作出し、酢酸合成を亢進するビフィズス菌の遺伝子の同定にも成功しました。

## 3) 17 型ヘルパー T (Th17) 細胞がヒト腸内細菌によって誘導されるメカニズム<sup>3)</sup>

近年、ノトバイオームマウスを用いて個々の細菌種が特定の免疫細胞の活性化を行い統率のとれた免疫システムの構築を担っていることがわかってきた。無菌マウスと SPF マウス

およびコンベンショナルマウスで、誘導される腸管 T 細胞に違いがみられたことから、まずマウスにおける 17 型ヘルパー T (Th17) 細胞が、マウス常在腸内細菌であるセグメント細菌 (SFB) により誘導されることが明らかにされた<sup>4)</sup>。マウス SFB およびラット SFB の特徴は、腸管細胞に突き刺さるという特徴をもつが、ヒトでは今のところ腸管細胞に突き刺さるような常在腸内細菌は検出されていない。ヒトにおいても Th17 細胞は誘導されることから、健全なヒト細菌叢を無菌マウスに経口投与して Th17 の誘導を指標に、腸内細菌を選択していった。ヒト腸内フローラを経口投与したノトバイオームマウスを用いた実験により、ヒトでの Th17 細胞の形成には、細菌の腸管接着による刺激が必須条件であることを、ノトバイオームマウスを用いた研究により明らかとなった。

## 4) 17 菌株のヒト腸内細菌による制御性 T (Treg) 細胞の形成<sup>5)</sup>

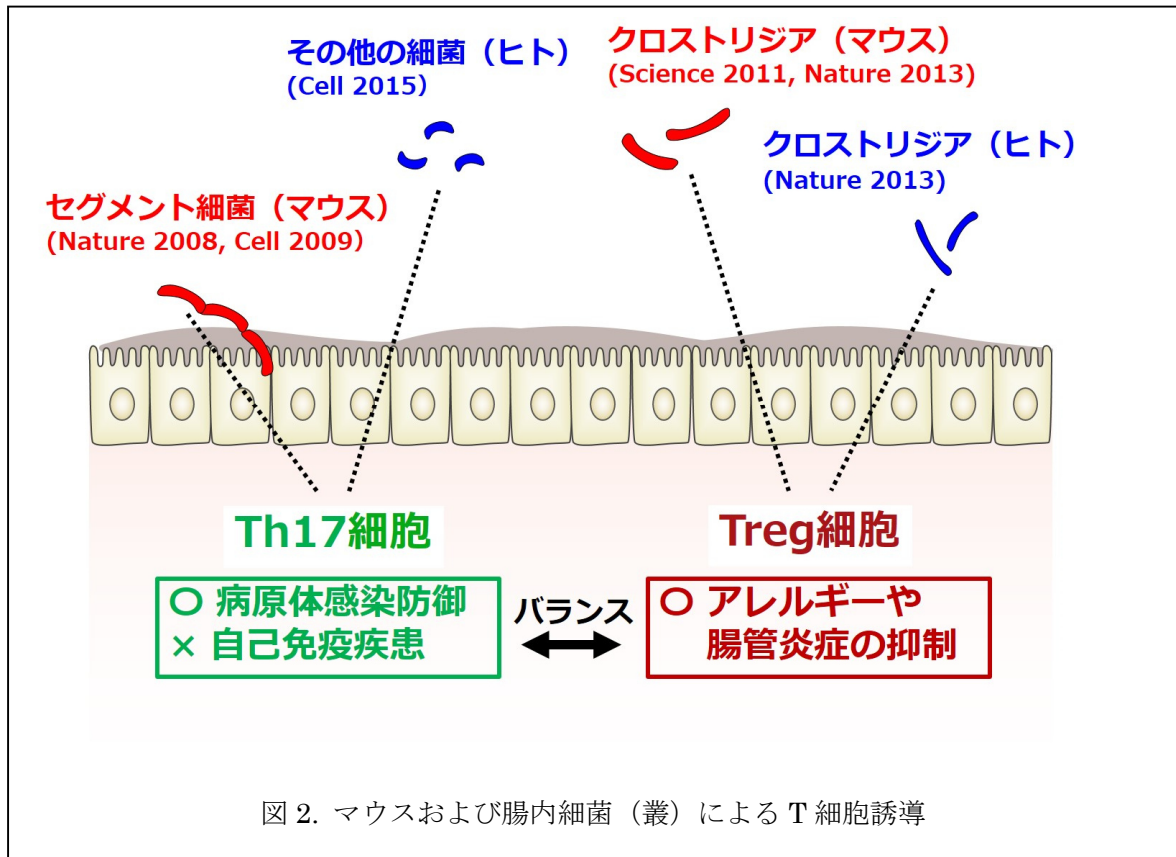
SPF マウスと比較して無菌マウスの大腸では Treg 細胞が顕著に減少しており、クロストリジウム (*Clostridium*) 属細菌を無菌マウスに投与すると大腸での Treg 細胞が強く増加したことから、マウス腸内細菌の中で主にクロストリジウム属が大腸 Treg 細胞の誘導を担っていた<sup>6)</sup>。

そこで、ヒトの腸内にも Treg 細胞の誘導を担う常在のクロストリジウム属細菌が存在していることも明らかになった。ヒトの大腸 Treg 細胞の形成にヒト腸内細菌叢の 17 菌株が関与していることが確認された<sup>5)</sup>。

## おわりに

大腸がんを自然発症するマウス (T-cell receptor  $\beta$  chain and p53 double-knockout mouse) を無菌化すると、大腸がんを発症しなくなる<sup>7)</sup>という興味深い論文があり、腸内細菌叢、すなわち細菌と生体は、本質的なところで密接な関係があるという研究が蓄積している。

本稿の 3) と 4) で記述した内容は図 2 に略記したが、今後、他の免疫担当細胞の形成にその宿主のもつ常在細菌が関与している可能性は非常に高いと推察される。また、免疫担当細胞にはたくさんの種類があるが、その中で T 細胞については常在する腸内細菌の存在で形成されることが見い出されてきたことにより、腸内細菌叢の構成パターンが崩れることは、免疫系のバランスの崩壊を引き起こし、炎症性腸疾患などの様々な疾患の発症の要因にな



ることが想像される。現在の社会における種々の疾病の中には、腸内細菌叢の機能低下 (dysbiosis) などによって引き起こされる疾病の知見が数多く蓄積してきており、今後、無菌マウスやノトバイオ技術を用いた研究は、非常に大きくこの研究分野にも貢献するものと考えられる。

#### 参考文献

- Morita H, Toh H, Fukuda S, Horikawa H, Oshima K, Suzuki T, Murakami M, Hisamatsu S, Kato Y, Takizawa T, Fukuoka H, Yoshimura T, Itoh K, O'Sullivan DJ, McKay LL, Ohno H, Kikuchi J, Masaoka T, Hattori M, Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production, *DNA Research*, 15: 151-161 (2008).
- Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H, Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate, *Nature*, 469: 543-547 (2011).
- Atarashi K, Tanoue T, Ando M, Kamada N, Nagano Y, Narushima S, Suda W, Imaoka A, Setoyama H, Nagamori T, Ishikawa E, Shima T, Hara T, Kado S, Jinnohara T, Ohno H, Kondo T, Toyooka K, Watanabe E, Yokoyama S, Tokoro S, Mori H, Noguchi Y, Morita H, Ivanov II, Sugiyama T, Nunez G, Camp JG, Hattori M, Umesaki Y, Honda K, Th17 cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells, *Cell*, 163: 367-380 (2015).
- Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR, Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria, *Cell*, 139: 485-498 (2009).
- Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M, Honda K, Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota, *Nature*, 500: 232-236 (2013).
- Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K, Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species, *Science*, 331:

- 337-341 (2011).
- 7) Intestinal microflora are necessary for development of spontaneous adenocarcinoma of the large intestine in T-cell receptor beta chain and p53 double-knockout mice, Kado S,
  - 8) Uchida K, Funabashi H, Iwata S, Nagata Y, Ando M, Onoue M, Matsuoka Y, Ohwaki M, Morotomi M, *Cancer Res.*, 61: 2395-2398 (2001).