

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08384

研究課題名(和文) 腸管生息古細菌(アーキア)がヒトの健康と炎症性腸疾患に与える影響の検討

研究課題名(英文) A study for intestinal archaea in human health and disease

研究代表者

三島 義之(MISHIMA, YOSHIYUKI)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：30397864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ヒト腸管アーキアのプロファイリング、炎症性腸疾患へ及ぼす影響の検討、未知アーキアの培養と機能解析を試みることである。研究期間内に、当大学では100名以上の患者からサンプル採取が終了した。産業技術総合研究所においては、様々な新規の微生物検出・培養技術を駆使して検討を重ねており、予備実験としてのマウスを用いた解析では、小腸に分布するアーキアの検出や、一部のアーキアの培養には成功した。しかし、ヒトのサンプル解析では、検体からの微生物DNA量がごく少量であり、新規DNA増幅技術を駆使したさらなる検討が必要と考えられ、現在も進行中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では最新の高性能な機器や試薬を用いて、消化管に生息する未知の微生物の検討を重ねてきた。しかし、そのDNA抽出と培養過程が想定以上に困難であり、微生物解析・培養法のさらなる進化が必要と感じられた。現在、マウスを用いた予備実験で使用した方法をさらに進化させる検討が進行しており、うまくいけばヒトサンプルの解析に入る予定である。これにより炎症性腸疾患に対する消化管アーキアの役割の解明と、その経路を介した治療応用につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to characterize human intestinal archaea, examine their effects on inflammatory bowel disease (IBD), and attempt to culture and functionally-analyze unknown archaea. During the study period, we (Shimane university) have completed sampling from more than 100 IBD patients. At the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, we have carefully investigated and tried to analyze with new microbial detection methods and culturing techniques. With these new methods, we successfully detected and cultured some archaea species from the mouse intestine as a preliminary experiment. However, the amount of microbial DNA in the human biopsy specimens was too small to be further analyzed. Thus, another attempt using new DNA amplification technology is currently in progress.

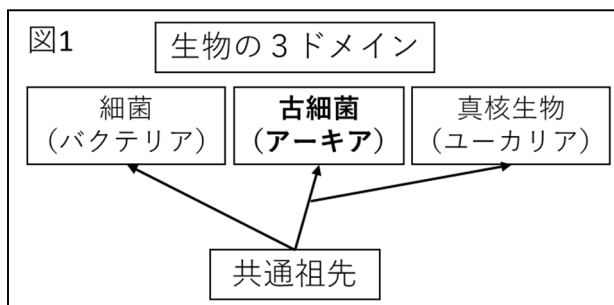
研究分野：microbiota

キーワード：archaea colitis irritable bowel syndrome gut microbiota mucosal immunology

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

古細菌(アーキア)は、生物の主要な3系統の一つであり(図1)、形態は細菌と類似するが、その生態機構や遺伝子は全く異なる。高熱、嫌気下、強酸といった過酷な環境でも存在できるものもあり、地球誕生~生命の起源にも関わる可能性が報告されている。



ヒト腸管に生息するアーキアとしては、主にメタン産生に関わるものが数種類知られてはいるが、そのほかの機能や宿主あるいは共生細菌叢へ与える影響に関してはほとんど分かっていない。

炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel diseases: IBD) は消化管の慢性炎症を特徴とする難治性腸疾患であり、遺伝的素因にくわえ、腸内微生物が腸管免疫を介して病態に関わっている。特に特定の腸内細菌が固有の免疫応答を惹起し、腸管免疫全体に大きな影響を与えていることは最近のホットトピックスでもある。例えば、ヒト腸内にいるクロストリジウム属は大腸で制御性 T 細胞を誘導し (Science 2013, Nature 2015)、セグメント細菌 (SFB) が小腸 Th17 反応を引き起こす (Cell 2009)。これらは分離・培養が可能で動物モデルに生着できるといった性質から同細菌群の機能面を含めて研究が進んでいったものと思われる。しかし、我々の腸に存在する微生物のうち、上記のように分離・培養し機能解析までできるものは現在でも少なく、単独で分離・培養できる種は全体の3~4割程度と推定されている。本研究のターゲットであるアーキアは難培養微生物の代表であり、強固な外膜を有し100以上の高熱や高酸下などの劣悪環境でも生息できるものも存在する。そのため、通常的手法では十分なDNA抽出さえできておらず、まだまだ検出されていない未知の腸管アーキアも多く存在する可能性がある。加えて、IBDの病態においては、上記のような腸内細菌の研究が盛んにおこなわれているが、アーキアに関連した検討は皆無である。

2. 研究の目的

腸管アーキアがヒトの腸管免疫を介して腸粘膜のホメオスタシス維持にどのような影響を与えるのかを検討する

3. 研究の方法

腸管アーキアを含めたヒト粘膜関連微生物のプロファイル構築

本研究では、IBDとコントロール患者に対し、アーキアを含めた粘膜関連微生物の検索と、腸粘膜のサイトカイン遺伝子発現測定をおこなう。具体的には、大腸あるいは小腸内視鏡検査が必要と判断されたIBDとコントロール患者で、除外基準(1)全身状態が

不安定な患者、2) 抗血栓薬内服中など出血傾向を有する患者、3) 生検での危険性が高いと判断される患者、4) 本研究の対象として不適当と判断された患者) に当てはまらない年齢 20 歳以上のものに対して、本研究についての同意が得られた後に登録する。コントロールとしては、スクリーニング、便潜血陽性またはポリープ切除後の定期フォローのために大腸内視鏡をうける患者とし、内視鏡検査で回腸、横行結腸、直腸に異常所見のなかったものを選定する。また内視鏡検査 1 週間以内の診察時に採血(白血球数・分画、CRP、血沈) 採便を行い、治療内容を記録する。さらに IBD 患者では臨床的腸炎活動指数(Disease activity index)の臨床データを記録する。そして、対象者が通常診療に必要な内視鏡検査を施行した際に、通常の生検とは別に内視鏡的に正常と思われる終末回腸、上行結腸、直腸より各 2 個の生検を行う。小腸内視鏡検査ではさらに深部回腸から 2 つ生検を追加し、IBD 患者では非炎症部と炎症部よりそれぞれ 2 個の生検を追加する。これらの生検材料は適切な処理を施して、各部位 1 個はヒト RNA 抽出、もう一方は細菌解析用に DNA 抽出を行う。また糞便は DNA の状態に処理する。ヒト RNA は当研究室において real time PCR を用いて免疫関連サイトカインの遺伝子発現(IL1B, TNFA, IFNG, IL17A, IL17F, IL12B, IL23, IL33, IL10, IL6, TGFB, IL8)を解析する。組織中の細菌 DNA と糞便 DNA は、登録リストに記載し、専用依頼書とともに産業技術総合研究所生物プロセス研究部門へ郵送する。同研究所では、とくにアーキアを対象をしぼった 16S rRNA あるいはショットガンメタゲノム解析によりメタアナリシスを行う。得られた結果は、当大学において、上記の腸管サイトカイン遺伝子発現の情報や臨床情報(病態・病型、疾患活動性、採血データ、内視鏡所見と病理結果)と照らし合わせ、IBD 特異的な粘膜関連微生物との関連性を検討する。

アーキア培養の試み

上記の検討で抽出されたアーキアは、まずは特異的プライマーを用いて確認する。さらに、古典的培養法の改良だけでなく、微生物間共生の利活用や嫌気性微生物の高レベルのハンドリング技術を用い、また近年開発されたゲノム情報に基づいた培養や培養デバイスの開発を通じて未知の腸管粘膜関連微生物の分離・培養を試みる(Tamaki H (研究分担者) et al. Science 2016)。これら培養を試みる検討においては、糞便中に存在する種であれば糞便を用いて分離を検討する。粘膜関連微生物であれば、その後に再度患者から同意を得て内視鏡検査を施行しサンプル採取を行う。これら分離・培養の行程では、抽出された微生物の特性に応じてサンプル調整し、適切な条件で研究所に送る。興味深いアーキアの分離・培養に成功すれば、さらに in vitro での IBD 関連細菌との共培養や、ノトバイオート実験を行うことにより、病態により深く関連した機能解析を行う。

4 . 研究成果

本研究の期間中に、当大学では合計 100 名以上の患者から同意を得て登録し、サンプルの採取と各々の患者の臨床データを収集した。これまで本研究に関連した健康被害等もなく順調であり、今後の腸内細菌解析結果と合わせて解析していく予定である。

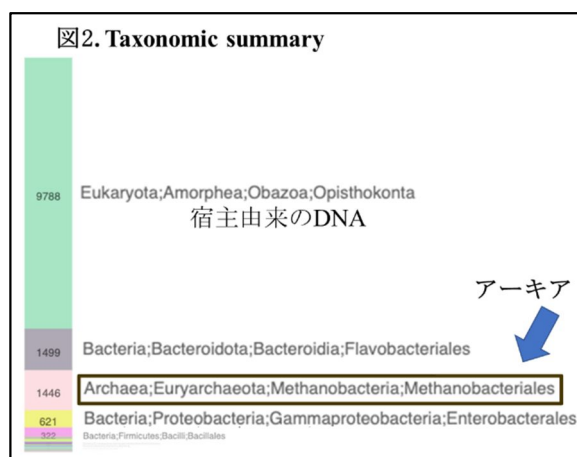
産業技術総合研究所においては、様々な新規の微生物検出・培養技術を駆使して、粘膜関連アーキアを高精度で検出・分離するプロトコルの検討を重ねてきた。その中の予備実験で、マウス小腸組織を用い、様々なセッティング下での粘膜微生物をターゲットとした 16S rRNA 解析の最適化を試みている。結果の一つを示すが、アーキアの一種である *Methanobacteriales* がマウス小腸粘膜で検出され、異なる種のマウスで小腸の肛門測にいくほどその存在率が高まる傾向を認めた (図 1)。一方、その際の問題として、多くの宿主由来 DNA の混在を認めており(図 2)、それらを除去してより効率的なアーキア解析につなげるための改良を現在も行っている。

一方で、ヒトのサンプル解析では、検体からの微生物 DNA 量がごく少量であり、予備実験では解析に耐えられる質・量ではなかったため、新規 DNA 増幅技術を駆使したさらなる検討を行っているところである。特に、貴重なヒトのサンプルからの DNA 抽出は、本研究の鍵となると考えられたため、直接専門家である産業技術総合研究所の研究者が当大学で行うこととなっていたが、期間を通じて COVID-19 の影響で予定していた双方への往来が一度もできなかったことが大きく影響し、いまだ実現に至っていない。

総括として、上記のように、ヒトサンプルを用いた検討では、十分な数のサンプル採取はできたものの、新規の DNA 抽出法を用いた解析は行えなかった。2023 年に入りようやく COVID-19 の規制が緩和されたため、今後は速やかに研究を遂行していく予定である。一方で、マウスの検討では、小腸に生息するアーキアの動態の一部を見出したが、今後もヒトサンプルを用いた研究と並行してさらなる検討を行い、それらが腸疾患に与える影響を解析していく予定である。

図1. マウス小腸粘膜アーキアの割合

マウス	小腸	Abundance of <i>Methanobacteriales</i> (%)
db/db	上部	0.94
	中部	1.16
	下部	10.1
ON-DP	上部	0.59
	中部	4.27
	下部	8.26



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morinaga Kana, Kusada Hiroyuki, Watanabe Miho, Tamaki Hideyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Anaerostipes caccae Strain L1-92T, a Butyrate-Producing Bacterium Isolated from Human Feces	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00056-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00056-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分 担 者	玉木 秀幸 (Tamaki Hideyuki) (00421842)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究 グループ長 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関