

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25640105

研究課題名(和文) ヒト唾液中に存在する腸内常在性細菌種の特定とその特徴解明

研究課題名(英文) Identification and characterization of salivary microbes that can stably colonize the intestine

研究代表者

服部 正平 (Hattori, Masahira)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：70175537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：無菌マウスにヒト唾液細菌叢を投与作成したノトバイオームマウスの経時糞便細菌叢の16S rRNA遺伝子とメタゲノム解析、及び同マウスの大腸粘膜固有層の炎症性T細胞のフローサイトメトリー解析を行った。その結果、20～30菌種がマウス腸内で常在性を持ち、元の唾液細菌叢に比べてこれら細菌種は豊富な炭水化物代謝関連遺伝子と少ない酸化ストレス耐性関連遺伝子を有していた。また、いくつかのマウスでは炎症性T細胞の蓄積が観察され、その誘導と有意に関連する細菌種を特定した。これらの結果から、ヒト唾液には腸内常在性をもつ細菌種が存在し、そのいくつかは宿主の炎症応答を誘起する作用をもつことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the bacterial composition and genes by analyzing 16S rRNA gene and metagenomic data obtained from the fecal microbiota longitudinally collected from gnotobiotic mice constructed by inoculation with human salivary microbiota. Also, we measured inflammatory T cells of the mouse intestinal lamina propria by flow cytometry. We found 20-30 bacterial species stably colonizing the mouse intestine. The metagenomic analysis revealed that these saliva-derived microbial communities were enriched with genes for carbohydrate metabolism but depleted in genes related with oxidative stress tolerance as compared with human salivary microbiota. We also observed the accumulation of colonic inflammatory T cells in several mice, and identified bacterial species that were significantly associated with the accumulation of these T cells. These data suggested that some human salivary microbes stably colonize the mouse intestine and have the ability of eliciting the host inflammatory response.

研究分野：総合ゲノム

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：細菌叢 常在菌叢 唾液

1. 研究開始当初の背景

今日のヒト常在菌叢研究の世界的な推進により常在菌叢の様々な実態が明らかになりつつある。これらの研究から、とくに、腸内細菌叢は疾患や様々な生理状態と密接に関連することが明らかとなり、医学・生理学的に極めて重要な生態系であることが認識されて来ている。

申請者らは国際ヒト常在菌叢コンソーシアムのメンバーとして、メタゲノム解析等を用いた腸内細菌叢を含むヒト常在菌叢の生理機能の研究を長年進めている。その中で、申請者らは炎症性腸疾患 (IBD) において消化器系の病変部位とは遠隔にある口腔 (唾液) の常在菌叢異常を発見した (Said HS 他: DNA Res., 2014)。この発見と唾液が消化管に常時流入するという事実から、IBD の腸内細菌叢異常と唾液細菌叢異常との関連が示唆される。このような口腔—腸内細菌叢間の関連性を調べた研究はこれまでに皆無に等しく、この関連性を証明するには、唾液中に腸内で常在性をもつ細菌種が存在することを示すことである。そこで、本研究では、腸内常在性を有するヒト唾液由来細菌種の同定及びその機能的特性を調べた。

2. 研究の目的

本研究では、腸内常在性を示す唾液中の細菌種の有無を明らかにするために、ヒト (健康者、IBD 患者) 唾液細菌叢を無菌マウスに接種したノトバイオートマウス (ヒト唾液マウス) を作成し、そのマウスから経時的に採取した糞便細菌叢を次世代シーケンサーにより 16S rRNA 遺伝子解析することで、糞便中で長期に安定して生息する細菌種 (腸内常在性細菌種) の存在を証明し、さらに、それら細菌種の細菌学・分類学的特徴ならびに遺伝子組成や代謝系に関する機能的特徴を解明する。

3. 研究の方法

(1) ヒト唾液細菌叢をもつノトバイオートマウス (ヒト唾液マウス) の作成: 無菌マウス (5 週齢の C57BL/6 または BALB/c) にゾンデを用いてヒト唾液細菌叢サンプルを胃底部に接種した (n=3~4/サンプル)。これらマウスを独立した無菌アイソレーター中で 6~8 週間飼育した。

(2) 経時的糞便の採取と細菌叢 DNA の調製: 接種後、1 週間おきにマウス糞便を採取した。採取した糞便から酵素法 (Morita H 他: Microbe Environ., 2007) により細菌叢 DNA を調製した。

(3) 次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子のシーケンシング解析: 申請者らが開発したプライマー 27Fmod と 338R を用いて 16S rRNA 遺伝子の可変領域 V1-V2 領域を PCR 増幅し、得られたアンプリコンをロシ

社 454 シーケンサーを用いてシーケンスした (Kim SW 他: DNA Res., 2013)。得られた高精度配列データ (2,000 リード/サンプル) を UCLUST で閾値 96% 配列類似度でクラスタリングし、各リードを operational taxonomic units (OTUs) に分類した。ついで、得られた OTUs をデータベース検索し、菌種帰属 (門、属、種レベル)、菌種組成解析、系統樹作成等の情報学的解析を行った。

(4) 次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析: ライフテクノロジー社 Ion PGM を用いて細菌叢 DNA をメタゲノム解析した (Kurokawa K 他: DNA Res., 2007)。本解析では、ヒト唾液 (2 サンプル) 及びそれを接種したそれぞれのマウスの 4 週間目の糞便サンプル (2 サンプル) より計約 300 万の細菌叢メタゲノムリードを得た。メタゲノムリードは COG (Clusters of Orthologous Groups) 及び KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) データベースに対する BLASTX による検索を行い、その機能プロファイルを解析した。

(5) ヒト唾液マウスの大腸粘膜固有層の調製と炎症性 T 細胞の解析: 8 週間飼育したマウスの腸管から粘膜固有層を調製し、そこから免疫細胞 (T 細胞を含む) を分離した。ついで、Th1、Th17、IFN- γ 産生 T 細胞等をフローサイトメトリーにより解析した。また、これら細胞データと細菌叢との関連解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト唾液中のマウス腸内常在性細菌の同定: ヒト唾液マウスから 1 週間ごと (1~8 週) に採取した糞便細菌叢の OTU 解析 (16S データのクラスタリングより求めた OTU 数) から、接種後 4 週間目以降に安定した OTU (菌種) 数をもつ腸内細菌叢の形成が観察された (図 1)。また、ヒト唾液マウスの盲腸は正常

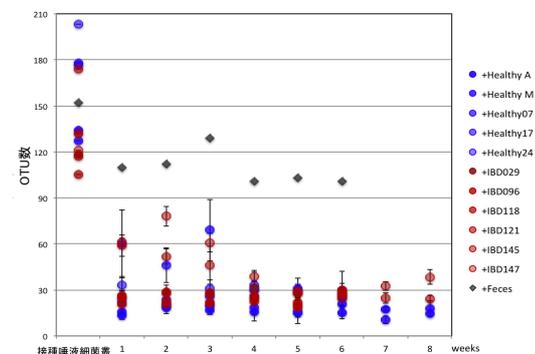


図1. ヒト唾液マウスの糞便細菌叢のOTU数の経時変動解析

マウスのそれと同様であり、無菌マウスの盲腸に特徴的な肥大化はなかった。これらの結果は、マウス腸内で自立的に代謝増殖しているヒト唾液由来の細菌群が存在することを示唆する。図 1 からヒト唾液マウスの腸内細菌叢は 20~30 菌種で構成されていることが

わかった。一方、インプットした元のヒト唾液細菌叢の OTU 数は 100~200 菌種であった。すなわち、元の唾液細菌叢の 1/5~1/6 がマウス腸内に定着している。なお、コントロールのヒト腸内(糞便)細菌叢を接種したノトバイオトマウスの糞便には 100 菌種以上が安定的に存在していた(図1)。このマウス腸内に定着する細菌種数の違いは、細菌叢の生息部位である口腔と腸内におけるさまざまな環境要因の違いによるものと考えられる。

(2) ヒト唾液マウス糞便細菌叢の細菌組成: マウス糞便細菌叢(5~6週目)の全16Sデータのうち、優占する40 OTUs (>5%組成比)について、その菌種帰属と菌種組成解析を行った。Firmicutes、Actinobacteria、Fusobacteria、Proteobacteriaの4門の菌種が検出されたが、ヒト唾液細菌叢に優占するBacteroidetes門の菌種はまったく検出されなかった。また、健常者とIBD患者間での有意な違いはみられなかった。40 OTUsの存在比を解析した結果、マウス糞便細菌叢は *Bifidobacterium dentium* と *Streptococcus parasanguinis* の2菌種が優占していることがわかった。すなわち、これら2菌種はヒト唾液細菌叢ではきわめてマイナーな菌種であるにもかかわらず、マウス腸内での高い常在能力をもつことが示唆された。このほかに、*Fusobacterium* や *Veillonella*、*Actinomyces* などの菌種も検出された。

(3) ヒト唾液マウス糞便細菌叢の機能特性: ヒト唾液及びヒト唾液マウスの糞便細菌叢から得られたメタゲノムリードを COG 及び KEGG データベースに類似度検索し、腸内常在性細菌叢の遺伝子(機能)の特徴をインプットしたヒト唾液細菌叢との比較解析から調べた。COG 解析の結果、腸内常在性細菌叢では、ヒト唾液細菌叢に比べて、炭水化物の代謝と輸送及びアミノ酸の代謝と輸送に関する機能が有意に多く存在していた(図2)。

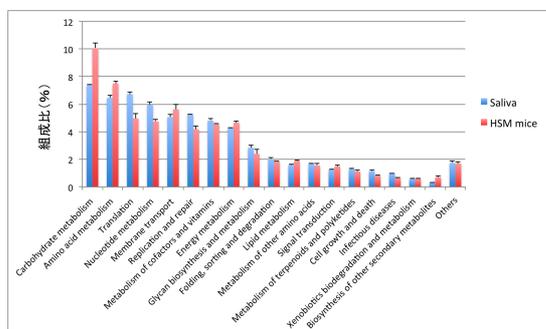


図2. ヒト唾液マウス腸内とヒト唾液細菌叢の機能組成比較(COG)

さらに、KEGG 解析からは、でんぷんやしょ糖、ガラクトース、ペントース等の糖類の代謝に関わる遺伝子がヒト唾液細菌叢に比べて腸内常在性細菌叢に豊富に存在していた。これらの結果は、炭水化物が腸内における細

菌叢の主要なエネルギー源であることを示唆する。一方、葉酸やリポ多糖類合成系、グルタチオン代謝系、ユビキノンのテルペノイド合成系、D-アラニン代謝系等が腸内常在性細菌叢で減少していた(図3)。これらの結果は、腸内常在性細菌叢では、酸化ストレス耐性が減少していることを示唆しており、唾液に比べて腸内では酸素濃度が低いことと一致する。

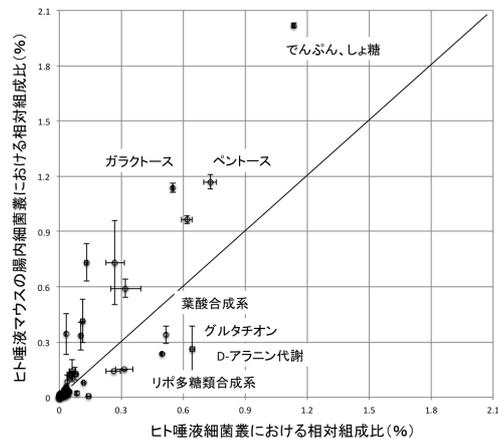


図3. ヒト唾液マウス腸内とヒト唾液細菌叢の機能組成比較(KEGG)

(4) ヒト唾液マウスにおける炎症性T細胞の解析: 8週間の飼育後、ヒト唾液マウスの大腸粘膜固有層を調製し、炎症性T細胞(Th1、Th17、IL-17/INF- γ 産生T細胞)をフローサイトメトリーで解析した。同様に、コントロールとして無菌マウスの大腸粘膜固有層における上記T細胞を解析した。その結果、いくつかのヒト唾液マウスでは、無菌マウスとの比較において、Th1とIL-17/INF- γ 産生T細胞の有意な増加(蓄積)を示す細菌叢とTh17だけを有意に増加させる細菌叢が見いだされた。しかし、健常者とIBD患者間にはT細胞増加における有意な違いは観察されなかった。

これら炎症性T細胞の増加と細菌組成比との相関解析から、*Veillonella*とTh17細胞、*Fusobacterium*とTh1及びIL17/INF- γ 産生T細胞の増加との間に有意な相関が得られた。

以上をまとめると、①ヒト唾液中にはマウス腸内で常在性を持つ細菌種が存在する。②これら常在性細菌種は20~30菌種存在し、メジャーな菌種として *Bifidobacterium* と *Streptococcus* を同定した。③腸内常在性細菌叢は元のヒト唾液細菌叢に比べて炭水化物代謝関連遺伝子が増加し、酸化ストレス耐性関連遺伝子が減少していた。④一部の細菌叢は炎症性T細胞の誘導能をもち、その誘導と相関する細菌種を特定した。

これらの結果は、ヒト唾液細菌叢には、腸内常在性を有する細菌種が存在し、それらの中にはマウス腸管免疫システムに影響を与える細菌種が含まれることを示唆する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Said HS, Suda W, Nakagome S, Chinen H, Oshima K, Kim S, Kimura R, Iraha A, Ishida H, Fujita J, Mano S, Morita H, Dohi T, Oota H and Hattori M: Dysbiosis of salivary microbiota in inflammatory bowel diseases and its association with oral immunological biomarkers. *DNA Res*, 21, 15-25 (2014). doi: 10.1093/dnares/dst037. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

- ① 木口悠也, 須田互, 新幸二, 高畑宗明, 竹尾淳, 本田賢也, 森田英利, 服部正平: 唾液細菌は腸内に定着し腸管免疫に影響を与える、第8回日本ゲノム微生物学会、2014年3月7~9日、東京農業大学
- ② 木口悠也, 須田互, 高畑宗明, 竹尾淳, 新幸二, 太田博樹, 本田賢也, 森田英利, 服部正平: ヒト唾液中に存在する腸内常在性細菌の特定、第36回日本分子生物学会、2013年12月3~6日、神戸ポートアイランド
- ③ 服部正平: ヒト腸内細菌叢の多様性と解析法の進歩、第41回日本臨床免疫学会、2013年11月28日、海峡メッセ下関

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 正平 (HATTORI Masahira)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号: 70175537

(2) 研究分担者

森田 英利 (MORITA Hidetoshi)
麻布大学・獣医学部・教授
研究者番号: 70257294

(3) 連携研究者

なし
研究者番号: