

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18461

研究課題名(和文) ヒト唾液細菌叢に内在し、腸内炎症に関わる細菌の同定とその機能の解明

研究課題名(英文) The effect of colonization of human saliva bacteria in the gut

研究代表者

須田 互 (Wataru, Suda)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：20590847

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)：本研究では腸内に定着可能なヒト唾液由来細菌の同定とそれらの細菌種が腸管に与える影響を調べた。健康者と炎症性腸疾患患者の唾液細菌叢の無菌マウスに投与することで、腸内にヒト唾液細菌種が定着したノトバイオームマウスである「ヒト唾液マウス」を作成した。ヒト唾液マウスの腸内における炎症性T細胞の集積量を解析した結果、ヒト唾液マウスは、無菌マウスに比し炎症性サイトカインを生産するTh1およびTh17細胞の割合が増加していた。菌の分離選抜を行うことで、腸内の炎症関連する複数のヒト唾液由来細菌種を同定した。現在は、得られた菌株のゲノム情報を用いて作用機序の解明を進めている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified the human salivary bacterial species which have the ability to colonize gut, and evaluated their roles against the host cell immunology. To this aim, the gnotobiotic mice which were transplanted the human salivary microbiota from healthy adults and IBD patients were made. The result of flow cytometry of TH1 and Th17 cell indicated that the frequency of TH1 and TH17 cells increased in the several gnotobiotic mice compared with GF mice. We isolated several bacterial strains relating to the gut inflammation from these gnotobiotic feces.

研究分野：微生物学

キーワード：ヒト常在細菌 唾液細菌叢

1. 研究開始当初の背景

ヒト一人に常在している細菌数は100兆個以上と考えられており、これはヒトを形成するヒト細胞数の60兆個を凌駕する。近年これらの細菌群が宿主であるヒトに与える影響が注目されている。腸管は最も多くの常在細菌が生息する部位であり、例えば、糞便1gに含まれる細菌数は 10^{11-12} と見積もられている。この腸内常在性の細菌群(腸内細菌叢)は、代謝による宿主への栄養供給、病原菌の感染防御、腸上皮免疫細胞の分化など様々な役割を担っている。腸内細菌叢の構成的破綻は「dysbiosis」と呼ばれ、このdysbiosisが安定化することで疾患慢性化の原因となりうると考えられている。実際に炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease; IBD)を始めとする様々な疾患患者において、腸内細菌叢が健常者と有意に異なっていることが報告されている。

一方、ヒトの唾液にも細菌叢が形成されており、宿主の健康状態と関連する事が指摘されている。申請者らはこれまでの研究によって、IBD患者の唾液細菌叢が健常者と有意に異なることを発見し報告した。[DNA Res.21:15-25,2014]

2. 研究の目的

ヒトの唾液細菌叢は唾液と共に常時腸内に到達し、腸内細菌となり得る菌種を含むことが想定される。またIBD患者の唾液細菌叢が健常者とは大きく異なる構造を示すことから、唾液細菌叢の破綻が、腸内細菌叢の破綻や炎症性腸疾患に関与するという仮説が考えられた。そこで本研究では、ヒト唾液細菌叢に内在し、腸内炎症に関わる細菌の探索・同定とその機能の解明を目的とした。

3. 研究の方法

IBD患者および健常者の唾液細菌叢を無菌マウスに投与したノトバイオームマウスである「ヒト唾液マウス」を作成し、その腸内細菌叢の解析から、唾液細菌叢に内在し腸内に定着可能な細菌群を特定する。具体的には経時的に採取したヒト唾液マウスの糞便から細菌叢DNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いた網羅的16S解析を行った。さらに、フローサイトメトリーを用い、各ヒト唾液マウスの大腸粘膜固有層における炎症性T細胞の集積量の解析をおこなった(図1)。

上記のデータを統合することで、炎症に関与する細菌種(群)の推定をおこなった。同定された炎症関連細菌のゲノム解析を行うことによって、その機能的特徴の解明を試みた。

一方で、様々な疾患患者の腸内細菌叢のデータを解析し、腸内細菌叢に含まれる唾液細菌の存在量の解析も行った。

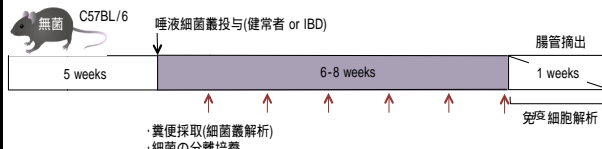


図1. ノトバイオームを用いた実験概要

4. 研究成果

ヒト唾液マウスの腸内細菌叢解析の結果、投与した唾液細菌叢に含まれる約240菌種の中で、菌種数は約80菌種程度がマウスの腸内に安定して定着できることが明らかになった(図2)。

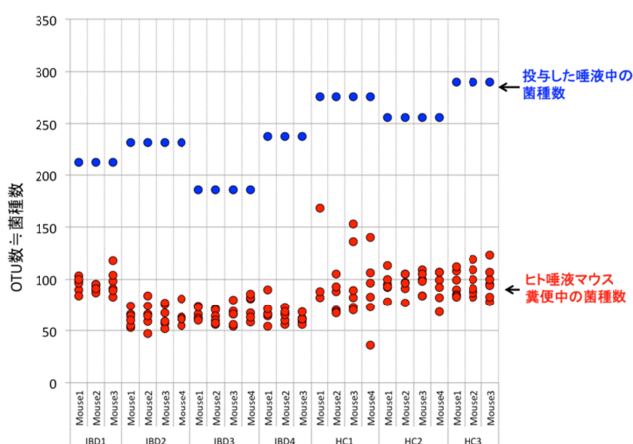


図2. ヒト唾液とヒト唾液マウス腸内細菌叢の菌種数(OTU数)

ヒト唾液マウスの大腸粘膜固有層における炎症性T細胞の集積量の解析をおこなった結果、無菌マウス(GF)に比し、ヒト唾液マウスにおいてTh1細胞が顕著に増加することが明らかになった(図3)。さらにその増加量は、マウスに与える各個人の唾液によって異なることがわかった。つまり与える唾液細菌叢に含まれる菌種の違いによって腸管に与える炎症誘導能が違うことが示唆された。

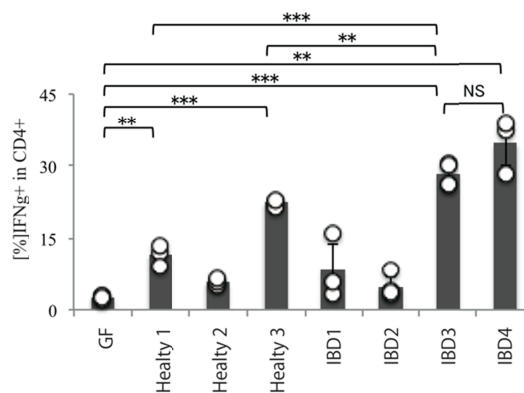


図3. ヒト唾液マウスの大腸粘膜固有層におけるIFN- γ 産生CD4陽性T細胞(Th1細胞)のflowcytometryによる同定および定量評価

Th1 細胞の蓄積がみとめられたヒト唾液マウス糞便から希釈や培養による選別などを経て、繰り返し無菌マウスへの投与を行うことで、腸内の炎症発生に關与する菌群の絞込を行った結果、強いTh1 誘導能を示す複数の菌株 (*Klebsiella pneumoniae* および *Enterobacter aerogenes*) を取得した。長鎖型高速シーケンサーを用い、これらの単離菌株の完全ゲノム配列を解読した。現在は、解読したゲノム情報と菌株受託機関から取り寄せTh1 誘導能を持たないことを確認した同一菌種のゲノム情報の間の比較ゲノム解析を進めており、腸内でのTh1 誘導能の作用機序の解析を進めている。

一方で、様々な疾患患者の腸内細菌叢データを用いて、腸内細菌叢中に含まれる唾液細菌種の探索を試みた。その結果、IBD 患者(クローン病と潰瘍性大腸炎)、原発性硬化性胆管炎、プロトンポンプ阻害薬摂取、アルコール中毒患者等で糞便中から見つかる唾液細菌種の量が多い傾向が認められた(図4)。このことから、唾液細菌種の定着は炎症性疾患を初めてとする様々な疾患に關与する可能性が示唆された。

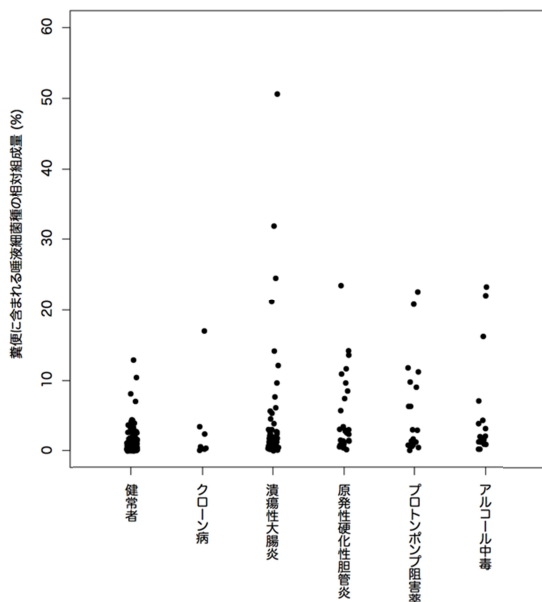


図4 . 健常者と疾患患者の糞便中から検出される唾液細菌種量。日本人 150 名の唾液細菌叢の解析の結果から平均 1%以上の相対組成をもつ菌種を唾液細菌種と定義した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Lena Takayasu, Wataru Suda, Kegeyasu Takanashi, Erica Iioka, Rina Kurokawa, Chie Shindo, Yasue Hattori, Naoko Yamashita, Suguru Nishijima, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori. Circadian oscillations of microbial and functional composition in the human salivary microbiome. *DNA Res.* 2017 inpress

Kentaro Iwasawa, Wataru Suda, Tomoyuki Tsunoda, Manari Oikawa-Kawamoto, Shuichiro Umetsu, Ayano Inui, Tomoo Fujisawa, Hidetoshi Morita, Tsuyoshi Sogo1, Masahira Hattori, Characterisation of the faecal microbiota in Japanese patients with paediatric-onset primary sclerosing cholangitis. *Gut.* 2016; inpress.

[学会発表](計 4 件)

Wataru Suda, Lena Takayasu, Kageyasu Takanashi and Masahira Hattori, "A global diurnal variation in the human salivary microbiome strongly governed by circadian rhythm" International Human Microbiome Consortium 6th Congress, ヒューストン, 2016年11月10日

Lena Takayasu, Wataru Suda, Masahira Hattori, "Tracing of diet-induced dynamic changes in the human salivary microbiota using samples collected every 10 minutes", International Human Microbiome Consortium 6th Congress, ヒューストン, 2016年11月10日

Lena Takayasu, Wataru Suda, Shinji Fukuda, Hiroshi Ohno, Misako Takayasu, Hideki Takayasu, Masahira Hattori, "Spatial competition of bacteria shapes gut microbiota", 16th International Symposium on Microbial Ecology, モントリオール, 2016年8月25日

須田互, 「高速シーケンサーを応用したヒト常在細菌叢研究の現状」, 第16回生理学若手サマースクール(招待講演) 順天堂大学 御茶ノ水キャンパス、東京都文京区、2016年8月20日

[図書](計 3 件)

須田 互, 高安 伶奈, 小鳥遊 景泰: ヒト唾液細菌叢の概日リズム, 単行本「ヒトマイクロバイーム研究最前線」p343-352, 2016年3月(エヌ・ティー・エス出版)。

須田互, 西嶋傑, 高安伶奈, 大島健志朗:腸内細菌叢のメタゲノム解析・メタ 16S 解析. 実験医学別冊 今すぐ始める!メタゲノム解析実験プロトコール (羊土社). 28-38, 2016,

高安伶奈, 須田互:唾液細菌叢のメタゲノム解析・メタ 16S 解析. 実験医学別冊 今すぐ始める!メタゲノム解析実験プロトコール (羊土社). 62-68, 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須田 互 (Wataru Suda)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号 : 20590847

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし