

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間：2020～2025
課題番号：20H05627
研究課題名：常在細菌叢の動作原理理解に基づく微生物製剤の開発
研究代表者氏名（ローマ字）：本田 賢也（HONDA Kenya）
所属研究機関・部局・職：慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授
研究者番号：60334231

研究の概要：

1. 免疫疾患・ワクチン、2. 多剤耐性菌感染、3. 代謝疾患、4. がん、5. 健康長寿、に焦点をあてて、細菌叢のなかでどの細菌メンバーが、どのような宿主細胞集団に影響を与えるのかを明らかにする。更に細胞分子メカニズムにまで踏み込むため、本研究では6. マイクロバイオーム基盤技術の開発も進める。それによって細菌遺伝子 代謝産物をリンクさせ、細菌の動作原理を明らかにする。

研究分野：微生物機能、免疫応答、腫瘍形成、代謝生理

キーワード：常在細菌、ワクチン、大腸がん、抗生物質耐性菌、代謝疾患

1. 研究開始当初の背景

常在微生物叢（マイクロバイオーム）は、重要なシステム（例えば免疫応答や代謝機能）に恒常的に影響を与えている。近年、次世代シーケンサーを活用した大型研究が行われ、様々な疾患とマイクロバイオームとの「相関関係」が見出された。さらに便移植治療の有効性が実証され、腸内細菌叢は人為的にマニピュレーション可能であることが明らかになった。しかし、疾患の病態改善、あるいは逆に病態悪化に繋がる causative な菌種を同定できた例は極めて少ない。これに対して我々は、特定の常在細菌だけを持つマウスを作成する技術（ノトバイオーム技術）、高度な嫌気性菌培養技術を組み合わせた統合的なアプローチにより、宿主恒常性維持において本質的な役割を担う常在細菌株を明確に特定する独自のスクリーニングシステムを構築したので、本研究課題に応用する。

2. 研究の目的

本研究では、宿主 マイクロバイオーム相互作用の理解を深め、宿主の生理機能を目的の方向へドライブできる本質的に重要な生菌コンソーシアムを同定することを目的とする。特に、1. 免疫疾患・ワクチン、2. 多剤耐性菌感染、3 代謝疾患、4. がん、5. 健康長寿において causative に働く細菌株カクテルを同定・単離し、さらに分子メカニズムを明らかにする。それにより創薬、診断薬の候補として検討を開始するに足るエビデンスを示す事を目指す。

3. 研究の方法

1. 免疫疾患・ワクチンに影響する細菌の同定：健康なヒトの常在菌叢から、免疫細胞の活性化あるいは抑制に働く菌株セットをさらに単離同定する。特にワクチン応答とアトピー性皮膚炎に焦点をあてて研究をすすめる。SARS-CoV2 ワクチン接種者の便を収集し、腸内細菌叢と抗体応答との関連性を調べるとともに、ワクチン応答を増強できる細菌株を同定する。また、アトピー性皮膚炎モデルである TMEM79 欠損マウスを用いて皮膚常在菌と免疫システムの相互作用について解析する。
2. 抗生物質耐性菌を decolonize できる有益な細菌種の同定：健康者の便サンプルから、抗生物質多剤耐性クレブシエラ菌やエンテロコッカス菌に対して腸管定着防御に働く有益な細菌種を同定し、抗生物質耐性菌に対する新しい制御法の確立を目指す。健康人ヒト腸内細菌叢から単離した 31 菌株セットが、クレブシエラ菌を検出限界以下にまで抑制できることがわかった。本研究では、31 菌株からクレブシエラ菌に対して定着阻害出来る最小菌株サブセットを得て、その分子メカニズムを明らかにする。
3. 代謝疾患改善に働く有益菌の同定：褐色脂肪細胞には、環境要因により白色脂肪細胞中で分化誘導される Beige 細胞と呼ばれる「誘導型」が存在する。本研究では、食事と Beige 細胞誘導の関連に焦点をあて、そこに関わる腸内細菌種を明らかにする。
4. 大腸がんに影響する細菌種の同定：大腸がん表面には、特徴的な細菌がしばしば接着しており、がんの発症や促進に影響を与えていると考えられている。本研究では、腸内細菌依存的な大腸腫瘍モデルマウスを樹立するとともに、大腸腫瘍に影響する細菌を大腸がん外科的切除標本から分離する。
5. 健康長寿に関連する細菌種の同定：百寿者は、健康長寿の良いモデルである。百寿者の便サンプルを収集・解析し、百寿者腸内細菌叢には 3-oxo-LCA や allo-iso-LCA といった特殊な胆汁酸を代謝合成する細菌種が多く存在する事がわかったので、それらを産生する細菌種を同定する。

4. これまでの成果

1-1. ワクチンレスポンスを増強する細菌株コンソーシアムの同定： SARS-CoV2 mRNA ワクチン 2 回以上接種者 104 名の便と血清を収集した。Dorea formicigenerans や Streptococcus salivarius が抗体価と正の相関があり、Ruminococcus gnavus や Tidjanibacter massiliensis が逆相関していた。一方、Paraprevotella clara が、トリプシンや TMPRSS2 を分解することが分かった。P. clara 株の腸管

定着は、プロテアーゼ分解を介して Murine hepatitis virus の腸管感染を阻害した。これらを論文として報告した (Nature. 609(7927):582-589. 2022)。

1-2. 皮膚炎に影響する細菌単離: TMEM79 欠損マウスを用いて皮膚常在菌と免疫システムの相互作用について解析した。TMEM79 欠損マウスは、通常環境下ではアトピー様皮膚炎を自然発症するが、無菌環境では皮膚炎を発症しなかった。皮膚炎発症と逆相関する皮膚細菌として *Staphylococcus cohnii* を同定した。ヒト由来 *S. cohnii* 菌株を単離し、TMEM79 欠損マウスに定着させると、皮膚炎が改善することが分かった。これらを論文としてとりまとめ発表した (Cell Rep. 35(4):109052. 2021)。

2. 抗生物質耐性菌を decolonize できる有益な細菌種の同定: 31 菌株から様々な菌株の組み合わせを検討し、18 種類の Firmicutes を中心とした菌株の組み合わせに強い活性があることがわかった。18 菌株は、クレブシエラ株だけではなく、接着浸潤性大腸菌などに対しても decolonization effect を発揮した。

3. 代謝疾患改善に働く有益菌の同定: 低タンパク食が、白色脂肪組織において UCP-1 陽性 Beige 細胞を強力に誘導することを見出した。低タンパク食による Beige 細胞誘導は、無菌マウスでは微弱であった。25 名の健常者に FDG-PET 行って、FDG の集積が確認された 1 名の便から、33 菌株の細菌株を分離した。その 33 菌株を無菌マウスに投与し、低タンパク食を与えると、強い Beige 細胞誘導が確認された。

4. 大腸がんに影響する細菌種の同定: 腸内細菌依存的大腸腫瘍モデル動物を探索した。その結果、APCf/f x KrasLSL-G12D x Tp53f/f x Cdx2-CreERT2 マウス (AKTC マウス) が腸内細菌依存的大腸腫瘍発症モデルとして適していることが分かってきた。大腸がん外科的切除標本の上皮に接着する細菌を培養し、約 40 菌株分離した。その中でも大腸がん表面に特異的に接着している 14 菌株を選択した、14 菌株を無菌 AKTC マウスに定着させたところ、タモキシフェン投与によって大腸腫瘍が発症することが分かった。

5. 健康長寿に関連する細菌種の同定: 1 名の百寿者の便を培養し、68 菌株を単離し、その中で Parabacteroides merdae や Odoribacteriaceae に属する菌株が、IsoalloLCA を産生する能力があることを見いだした。更に IsoalloLCA には、Clostridioides difficile のようなグラム陽性病原性細菌に対して強い増殖抑制効果があることがわかった。これらを論文として報告した (Nature. 599(7885):458-464. 2021)。

5. 今後の計画

1. ワクチンレスポンスを増強する細菌株コンソーシアムの同定: SARS-CoV2 ワクチン接種者の便をさらに詳細に解析し、ワクチン応答を増強できる細菌株を同定する。

2. 抗生物質耐性菌を decolonize できる有益な細菌種の同定: 18 菌株によるクレブシエラ抑制メカニズムをさらに検討する。

3. 代謝疾患改善に働く有益菌の同定: ヒト由来の 33 菌株に Beige 細胞誘導を仲介する能力があったので、そのメカニズムをさらに追求する。

4. 大腸がんに影響する細菌種の同定: 腸内細菌依存的大腸腫瘍発症モデルを使って腸内細菌による大腸腫瘍発症メカニズムを明らかにする。

5. 健康長寿に関連する細菌種の同定: 百寿者に由来する Odoribacteriaceae に属する菌株が、宿主のステロイド pool も制御している可能性が考えられたので、その生理的意義を検討する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Li Y, Watanabe E, Kawashima Y, Plichta DR, Wang Z, Ujike M, Ang QY, Wu R, Furuichi M, Takeshita K, Yoshida K, Nishiyama K, Kearney SM, Suda W, Hattori M, Sasajima S, Matsunaga T, Zhang X, Watanabe K, Fujishiro J, Norman JM, Olle B, Matsuyama S, Namkoong H, Uwamino Y, Ishii M, Fukunaga K, Hasegawa N, Ohara O, Xavier RJ, Atarashi K, [Honda K*](#). Identification of trypsin-degrading commensals in the large intestine. **Nature**. 609(7927):582-589. (2022)

2. Tuganbaev T, Yoshida K, [Honda K*](#). The effects of oral microbiota on health. **Science**. 27;376(6596):934-936 (2922)

3. Ivanov II, Tuganbaev T, Skelly AN, [Honda K*](#). T Cell Responses to the Microbiota. **Annu Rev Immunol**. 40:559-587. (2022)

4. Sato Y, Atarashi K, Plichta DR, Arai Y, Sasajima S, Kearney SM, Suda W, Takeshita K, Sasaki T, Okamoto S, Skelly AN, Okamura Y, Vlamakis H, Li Y, Tanoue T, Takei H, Nittono H, [Narushima S](#), Irie J, Itoh H, Moriya K, Sugiura Y, Suematsu M, Moritoki N, Shibata S, Littman DR, Fischbach MA, Uwamino Y, Inoue T, Honda A, Hattori M, Murai T, Xavier RJ*, Hirose N, [Honda K*](#). Novel bile acid biosynthetic pathways are enriched in the microbiome of centenarians. **Nature**. 599(7885):458-464. (2021)

5. Ito Y, Sasaki T, Li Y, Tanoue T, Sugiura Y, Skelly AN, Suda W, Kawashima Y, Okahashi N, Watanabe E, Horikawa H, Shiohama A, Kurokawa R, Kawakami E, Iseki H, Kawasaki H, Iwakura Y, Shiota A, Yu L, Hisatsune J, Koseki H, Sugai M, Arita M, Ohara O, Matsui T, Suematsu M, Hattori M, Atarashi K, Amagai M, [Honda K*](#). *Staphylococcus cohnii* is a potentially biotherapeutic skin commensal alleviating skin inflammation. **Cell Rep**. 35(4):109052. (2021)

7. ホームページ等

<http://www.microbiolimmunol.med.keio.ac.jp/home.html>