

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651207

研究課題名(和文) ヒト乳幼児における腸内細菌叢形成と宿主免疫系発達の相互作用機序に関する研究

研究課題名(英文) Investigation on interactive development of gut microbiota and immune system in infancy

研究代表者

中山 二郎 (Nakayma, Jiro)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40217930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：無菌状態で出生するヒト腸管に次々と定着する細菌が宿主免疫系の発達に及ぼす影響は、興味深い不明な点が多い。本研究では、新生児232名を対象とした前向き調査研究にて、糞便細菌叢と生後2年間のアレルギー発症状況の関連性を調査し、バクテロイデス属細菌がアレルギー発症児の乳児期に有意に多いことを見出した。次にバクテロイデス属細菌の宿主免疫系に及ぼす影響をマウスパイエル版樹状細胞のex vivo実験により調べた。その結果、バクテロイデス属細菌菌体にIL-23サブユニットp19遺伝子の強い転写誘導活性があることが示された。IL-23は炎症性サイトカインの一種でアレルギー誘導との関連性に興味を持たれる。

研究成果の概要(英文)：Bacteria colonizing in digestive tract in early infancy must have great influence on the development of host immune system but still largely in question. In this research, we performed prospective study on the correlation between gut microbiota in infancy and later allergy development. As a result, we found that genus Bacteroides was more colonized in infants who developed any allergy disease within two years than infants who did not develop any allergy in the same duration. Next, we examined the effect of Bacteroides on dendritic cells in mouse Peyer's patch in ex vivo experiment and found that Bacteroides cells strongly induced transcription of IL-23 p19. Since IL-23 is a pro-inflammatory cytokine, this induction by Bacteroides may associate with the allergy development in later life.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：腸内細菌叢 アレルギー 腸管免疫 次世代シーケンサー 16S rRNA 前向き調査研究 バクテロイデス IL-23

1. 研究開始当初の背景

幼児期の過剰衛生が先進国における近年のアレルギー急増や免疫力低下の元凶という説があるが、腸内細菌がその一因と言われるようになって久しい。ビフィズス菌を主体とする安定した腸内フローラが形成されるまでの間、新生児の腸管は雑菌の取捨選択をめぐり繰り返しながら変遷していき、この時期の腸内細菌叢は免疫系の成熟に大きく影響していることに疑いの余地はない。実際に、腸内細菌が宿主免疫系に与える影響の解析は各所で進められており、腸内共生菌が免疫寛容を誘導する分子メカニズムについて着々とその真相解明が進められている。

一方、腸内細菌フローラそのものの解明も、腸内フローラの主体が培養困難な細菌で占められていることから、その全容解明が遅れていたが、近年急激に進歩した DNA シーケンシング技術が、腸内フローラ解析の分野にも導入され、その俯瞰的な解析も可能となった。このような時代背景の中、我々は、日本人新生児の腸内フローラを次世代シーケンサーを用いた新しい解析法により俯瞰的に解析し、同時に乳幼児のアレルギー発症状況を 2 年間フォローアップし、腸内細菌フローラとアレルギー発症の関連性を綿密に調査する研究に着手することにした。

2. 研究の目的

上述のように、腸内細菌叢が宿主免疫系に与える影響については無視できないものがあることは、近年の多くの研究で示されている。しかし、そのほとんどは、モデル動物を用いた実験や *in vitro* あるいは *ex vivo* の研究が主体で、実際のヒトを用いた研究例は限りなく少ない。本研究では、腸内フローラが未成熟で、日々激動する新生児を対象に、フローラの形成をモニターし、また、新生児のアレルギー発症状況を生後 2 年間追跡調査することにした。そして、実際の新生児において、アレルギー発症に相関する細菌をリストアップする。そしてそれらの細菌を、マウスパイル版樹状細胞を用いた *ex vivo* 実験に供し、宿主免疫系に与える影響を分子レベルで解析する。以上の研究を通じて、乳幼児における腸内フローラの形成と免疫系発達の間の相互作用機序について、分子レベルで理解することに挑戦する。

3. 研究の方法

(1) 乳児期の腸内細菌叢と後のアレルギー発症の関連性に関する前向き調査

久留米市聖マリア病院にて出生した新生児 62 人の生後 1、2、6、12 ヶ月の糞便細菌叢と生後 2 年間のアレルギー発症（食物アレルギー、アトピー性皮膚炎、喘息）に関する追跡調査と、福岡市井植病院にて出産した 65 人の生後 1 ヶ月の細菌叢と生後 2 年間のアレルギー発症に関する調査を行った。

得られた糞便から、細菌のゲノム DNA を抽

出し、それを鋳型として、全細菌を標的とするタグ配列付きユニバーサルプライマーを用いた PCR により 16S rRNA 遺伝子の V6-V8 可変領域を増幅させた。得られたアンプリコンを、最大 128 サンプルまで混合し（それぞれ配列解析後にサンプルの同定が可能となるように個別のタグ配列を付してあるものを混合する）、次世代シーケンサー (Roche GS454 titanium) により配列解析する。得られた配列は、オープンソースのソフトウェアである Quantitative insights into microbial ecology (QIIME) により解析し、細菌の分類学情報を得て、細菌組成データを得た。

この細菌組成データをアレルギー発症群と非発症群間で比較解析し（ノンパラメトリックの Mann Whitney U-test）、両群間で有意差を示す細菌をリストアップした。

(2) マウスパイル版樹状細胞を用いた各種腸内細菌のサイトカイン誘導活性の解析

腸内フローラを構成する優占菌種 20 種を各細菌種至適の条件にて培養し、菌体を遠心により回収、洗菌後、熱処理殺菌後、凍結乾燥する。パイル版は雌 6~8 週齢の BALB/cA Jcl マウスより解剖により摘出した小腸より切り取り収集した。得られたパイル版より、細胞懸濁液を調整し、そこから CD11c マイクロビーズにより CD11c+ 樹状細胞を精製した。1x10⁵ cells/well の樹状細胞に対し、10 ug/ml の凍結乾燥菌体 PBS 懸濁液を作用させ、12 時間培養後、RNA を抽出し、定量 PCR により各種サイトカイン mRNA を定量した。炎症性サイトカイン IL-12、IL-23 はヘテロダイマーから成り、構成分子はそれぞれ p40/p35, p40/p19 である。本研究では、腸内細菌あるいは腸内細菌構成成分の刺激下で培養したパイル版樹状細胞の p35, p40, p19、および制御性の働きを有する IL-10 について、無刺激に対する相対 mRNA 発現量の比較解析を行った。また、パイル版樹状細胞に対する対照として、脾臓樹状細胞の応答解析も同時に行った。

4. 研究成果

(1) 乳児期の腸内細菌叢と後のアレルギー発症の関連性に関する前向き調査

聖マリア病院の食物アレルギー罹患群 (n=16) は生後 1 ヶ月時において *Bacteroides* 属細菌の占有率がアレルギー非罹患群 (n=34) より有意に高く (4.68 ± 8.20% vs. 0.18 ± 1.79, p = 0.009)、生後 2 ヶ月時においては、*Proteobacteria* 門の占有率が有意に低かった (16.0 ± 21.8% vs. 31.3 ± 23.9%, p = 0.012)。また、生後 2 年間に何らかのアレルギーを発症した全アレルギー罹患群 (n=28) も同様の有意差を示した。さらに、井植病院出生児コホートも加えて解析した結果も同様の傾向が示され、全アレルギー罹患群 (n=71) で非罹患群 (n=56) に比べて、

Bacteroides 属の占有率が有意に高く ($3.97 \pm 7.89\%$ vs. 1.48 ± 7.64 , $p = 0.001$)、また *Escherichia* 属の占有率が有意に ($4.58 \pm 15.5\%$ vs. 7.18 ± 16.6 , $p = 0.028$) 低かった。

生後1ヶ月という早期に *Bacteroides* 属細菌が優占化するフローラは後のアレルギー発症に対する危険シグナルであるかもしれない。一方、乳児期の *Proteobacteria* 門の定着はアレルギー発症の回避に寄与している可能性がある。ビフィズス菌を主体とする安定した細菌叢が形成される前の新生児期の腸内フローラの偏倚が後のアレルギー発症に寄与している可能性を示す本コホート調査のデータは大変興味深い。

(2) マウスパイエル版樹状細胞を用いた各種腸内細菌のサイトカイン誘導活性の解析

まず、ヒト腸内優占4門 (*Actinobacteria* 門、*Fermicutes* 門、*Bacteroidetes* 門、*Proteobacteria* 門) の代表菌種として、*Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus gasseri*, *Clostridium butyricum*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroidetes vulgatus* の6細菌種に対するパイエル版樹状細胞の応答解析を行った。その結果、サイトカイン p19, IL-10 において、*B. fragilis* は高い誘導能を示した。特に p19 では、無刺激に対して約30倍の発現誘導が確認できた。一方、*E. coli* は p35, p40 では無刺激と同程度の誘導しか見られなかった。次に、実際に乳児より分離した4種の *Bacteroides* 属および1種の

Parabacteroides 属細菌を同 *ex vivo* 実験に供した。その結果、これらすべての菌種で、先の *B. fragilis* 同様に、非常に強い p19 の転写誘導活性が見られ、p19 の誘導活性は菌種特異的なものではなく、*Bacteroides* 属および *Parabacteroides* 属細菌に共通して見られる特性であることが示唆された。

この菌体による p19 誘導活性が、菌体の何の成分によるものかに疑問を持ち、*Bacteroides* 属細菌の外膜成分である Lipopolysaccharide (LPS) を抽出して、上記同様、パイエル版に対する p35, p40, p19, IL-10 の転写誘導活性を調べた。しかし、いずれのサイトカインにおいても顕著な転写誘導活性が見られなかった。同様に、大腸菌の LPS を用いてサイトカイン誘導活性を調べたが、こちらにも顕著な誘導活性が見られなかった。

IL-23 は自己免疫疾患や腸管炎症に関与するサイトカインであることから、グラム陰性腸内共生菌による p19 の過剰発現誘導が自己免疫疾患、腸管炎症等を引き起こす可能性が示唆された。また、p19 に加え、p35, p40, IL-10 においてもグラム陰性細菌刺激によるパイエル版樹状細胞のサイトカイン誘導が確認されたものの、グラム陰性細菌の主要成

分である LPS 刺激によっては顕著なサイトカイン誘導が見られなかった。アレルギー発症児に見られた、高い *Bacteroides* 属細菌の早期定着と、低い *Proteobacteria* 門細菌の定着は、LPS の構造の差による免疫刺激活性の差を生み、それによりアレルギーの惹起と抑制と反対の効果を生むと推測して、LPS による刺激実験を行ったが、菌体そのものを用いた時のような、非常に強い誘導活性は確認できなかった。このことより、*Bacteroides* 属細菌によるサイトカイン誘導は、LPS ではなく他の成分に起因するものである可能性が示唆され、今後、*Bacteroides* 属細菌に強く見られる p19 転写誘導活性がどの成分に起因するものか明らかにすることが鍵となると思われる。

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6件)

1. Nakayama, J., Jiang, J., Watanabe, K., Chen, K., Ninxin, H., Matsuda, K., Kurakawa, T., Tsuji, H., Sonomoto, K., and Lee, Y.-K. (2013) Up to species-level community analysis of human gut microbiota by 16S rRNA amplicon pyrosequencing, *Bioscience Microflora Food Health*, 32:69-76.
2. J. Nakayama, T. Kobayashi, S. Tanaka, Y. Korenori, A. Tateyama, N. Sakamoto, C. Kiyohara, T. Shirakawa, K. Sonomoto, Aberrant structures of fecal bacterial community in allergic infants profiled by 16S rRNA gene pyrosequencing. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 63, 397-406, (2011).
3. 中山二郎. 腸内細菌と健康: ゆりかごから墓場まで. *日本醸造学会誌*. 108. 724-733 (2013).
4. 是則有希, Jiahui Jiang, 中山二郎. 16S rRNA 遺伝子の大量シーケンシングによる菌叢解析の現状と問題点, *日本乳酸菌学会誌*, Vol. 23, pp.24-33(2012).
5. 中山二郎 "細菌の世界における細胞間ケミカルコミュニケーションとその分子メカニズム" *腸内細菌学雑誌*, Vol. 25, pp.221-234 (2011).
6. 中山二郎. 赤ちゃんの腸内フローラと過剰衛生仮説, *科学*, 3, 246-250 (2011).

[学会発表](計14件)

1. Diversity in gut bacterial composition and their 16S rRNA gene sequences among Asian children. Jiahui Jiang, Kenji Sonomoto, Jiro Nakayama. 第37回講演会(日本農芸化学会関西・中四国・西日

- 本支部、日本ビタミン学会近畿・中四国・九州沖縄合同大会(一般講演)2013年09月06日・東京。
2. Asian Microbiome Project: アジア人の食と腸内フローラと健康に関する調査研究 中山二郎、渡辺幸一、Yuan-Kun Lee 日本農芸化学会 2014 年度大会(招待講演)2014年03月30日・東京。
 3. アジア人の腸内フローラに見られる2つのエンテロタイプと地域特異性. 東佳那子、Jiahui Jiang, 渡辺幸一、Shirchin Demberel, Sunee Nitisinprasert, Yongha Park, Endang S, Rahayum, Fa-Zheng Ren, Ying-Chieh Tsai, 園元謙二、Yuan-Kun Lee, 中山二郎. 日本農芸化学会 2014 年度大会(一般講演) 2014年03月29日・東京。
 4. アジア5ヶ国児の腸内細菌叢解析. Jiro Nakayama, Jiahui Jiang, Koichi Watanabe, Kazunori Matsuda, Takashi Kurakawa, Hirokazu Tsuji, Fa-Zheng Ren, Sunee Nitisinprasert, Endang S, Rahayum Chii-Cherng Liao, Ying-Chieh Tsai, Yuan-Kun Lee. 第17回腸内細菌学会(一般講演) 2013年06月13日・東京。
 5. Phase I study of Asian Microbiome Project: Discovery of intestinal microbiota in Asian youngsters profiled by 16S rRNA gene pyrosequencing. Jiang J, Nakayama J, Watanabe K, Sakamoto N, Matsuda K, Kurakawa T, Tsuji H, Ren FZ, Nitisinprasert S, Rahayu ES, Liao CC, Tsai YC, Lee YK. 日本農芸化学会 2013 年度大会(一般講演)2013年03月26日・仙台。
 6. Diversity of intestinal microbiota in Asian youngsters profiled by 16S rRNA pyrosequencing Jiang J, Nakayama J, Watanabe K, Sakamoto N, Matsuda K, Kurakawa T, Tsuji H, Ren FZ, Nitisinprasert S, Rahayu ES, Liao CC, Tsai YC, Lee YK. 第35回日本分子生物学会(一般講演) 2012年12月13日・福岡。
 7. 腸内細菌と健康: ゆりかごから墓場まで 中山二郎. 日本微生物連盟フォーラム「驚きの微生物たち」(招待講演)2013年01月26日・東京。
 8. 454 Pyrosequencing study on the basal microbiota of healthy Asian youngsters Jiang J, Nakayama J, Watanabe K, Sakamoto N, Matsuda K, Kurakawa T, Tsuji H, Ren FZ, Nitisinprasert S, Rahayu ES, Liao CC, Tsai YC, Lee YK. 3rd Asian Symposium on Lactic Acid Bacteria. (一般講演)2012年05月30日・Wuxi China.
 9. 乳幼児における腸内細菌叢とアレルギー発症の関連性に関するコホート調査研究 伊佐佳菜子, 是則有希, 鷲尾昌一, 小林貴子, 清原千香子, 古賀泰裕, 三上克央, 柴田瑠美子, 園元謙二, 中山二郎. 腸内細菌学会(一般講演)2012年06月14日・神戸。
 10. Asian Microbiome Project: A pilot study on the basal microbiota profile of healthy Asian youngsters. Nakayama J, Watanabe K, Sakamoto N, Jiang J, Matsuda K, Kurakawa T, Tsuji H, Ren FZ, Nitisinprasert S, Rahayu ES, Liao CC, Tsai YC, Lee YK. International Human Microbiome Conference (一般講演) 2012年03月・パリ France.
 11. Community structure of developmental GI tract microbiota in infants and its correlation with allergy development in later life. Jiro Nakayama, Yuki Korenori, Takako Kobayashi, Kenji Sonomoto 3rd TNO beneficial microbes conference(一般講演) 2012年03月・Noordwijk(Holland).
 12. ASIAN MICROBIOME PROJECT. Yuan Kun Lee, Jiro Nakayama, Fazheng Ren, Sunee Nitisinprasert, Endang Rahayu, Raha Abdul Rahim, Chii Cherng Liao, Koichi Watanabe, Ying Chieh Tsai. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress(招待講演)2011年09月・札幌。
 13. COMMUNITY STRUCTURE AND IMMUNE FUNCTION OF DEVELOPMENTAL GI TRACT MICROBIOTA IN INFANTS. Jiro Nakayama International Union of Microbiological Societies 2011 Congress(招待講演) 2011年09月・札幌。
 14. 乳幼児の腸内細菌叢と後のアレルギー発症の関連性の解析. 中山二郎、是則有希、清原千香子、鷲尾昌一、園元謙二 日本農芸化学会(一般講演)2011年03月26日。
- 〔図書〕(計1件)
1. 中山二郎 他 74 名. 世紀を超えるビフィズス菌研究 (財)日本ビフィズス菌センター (2011)。
- 〔産業財産権〕
○出願状況(計0件)
- 〔その他〕
ホームページ
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/microbt/QS.html>
6. 研究組織
(1)研究代表者
中山 二郎 (NAKAYAMA JIRO)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 40217930