

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 革新的先端研究開発支援事業インキュベートタイプ
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名 : (日本語) 腸内細菌株カクテルを用いた新規医薬品の創出
(英語) Development of therapeutic cocktails of bacteria isolated from the gut microbiota

研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室 教授 本田 賢也
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Microbiology and Immunology
Keio University School of Medicine
Professor Kenya Honda, M.D., Ph.D.

実施期間 : 平成 28 年 10 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 機能的に優れた腸内細菌株カクテルの同定分離
開発課題名 : (英語) Identification and isolation of functionally beneficial bacterial cocktails from the human intestine

II. 成果の概要（総括研究報告）

「免疫システム増強・消化管バリア維持」「Beige 細胞誘導」「健康長寿」に関する 3 つの課題に取り組み、ゴールとして、炎症性腸疾患・がん・肥満などの治療に応用可能な、生菌カクテルもしくはそれ由来する生理活性物質を同定する。

The aim of this AMED-LEAP project is to identify specific members of gut microbiota that have deep impacts on the immune system, gut mucosal barrier integrity, Beige cell induction, and longevity of life. Our long-term goal is to develop biotherapeutic products (bacterial cocktails) or bacteria-derived small molecules to treat disease conditions such as IBD, cancer, and obesity.

1. 免疫システム増強・消化管バリア維持のための菌株単離

1. Identification and isolation of intestinal bacteria that can enhance immune system and maintain intestinal barrier integrity

1a) IFN γ ⁺ CD8⁺ T 細胞誘導細菌単離：

インターフェロン- γ (IFN γ) を恒常的に産生する CD8 陽性 T 細胞 (IFN γ ⁺ CD8⁺ T 細胞) がマウス消化管に豊富に存在し、それらは腸内細菌によって誘導されていることがわかった。本田グループは、ヒト腸管に常在する IFN γ ⁺ CD8⁺ T 細胞誘導細菌を同定分離するため、計 6 人の健常ボランティア (A~F) から得た便サンプルを別々の無菌マウスに投与し、その CD8⁺ T 細胞誘導能を解析した。その結果、ドナー B 便を投与したマウス大腸で IFN γ ⁺ CD8⁺ T 細胞が特に強く誘導されていた。さらに服部グループによる菌叢のシーケンス解析と、本田グループによるノトバイオトマウス作製によって、B 便投与マウスから IFN γ ⁺ CD8⁺ T 細胞を強力に誘導できる 21 菌株を分離培養した。

1a) Identification of intestinal bacterial species responsible for the accumulation of interferon- γ (IFN γ)-producing CD8⁺ T cells

Honda group first found that IFN γ ⁺ CD8⁺ T cells are more abundantly present in the intestinal lamina propria than in other organs in specific pathogen free (SPF) mice. The intestinal lamina propria of germ-free (GF) mice was deficient in such T cells as compared to SPF mice, and transfer of fecal matter from SPF mice into GF mice was sufficient to induce IFN γ ⁺ CD8⁺ T cells, suggesting commensal bacteria-mediated of IFN γ ⁺ CD8⁺ T cells. From a translational perspective, we searched for human-associated bacteria that can induce IFN γ ⁺ CD8⁺ T cells by the gnotobiotic technique. We obtained stool samples from six Japanese healthy volunteers. The stool samples were orally inoculated into GF mice housed in separate gnotobiotic isolators. After 3 weeks, we examined IFN γ ⁺ cells among colonic CD8 T cells. We found that sample B was the highest inducer for IFN γ ⁺ CD8⁺ T population. From the group of sample B treated mice, we selected one mouse that exhibited the highest induction of IFN γ ⁺ CD8⁺ T cells, and collected cecal contents from the mouse. The cecal contents were inoculated into another 6 groups of GF mice. After gavage, mice were then treated with various antibiotics via the drinking water. We found that ampicillin-treatment enhanced the

accumulation of IFN γ ⁺ CD8⁺ T cells compared with mice untreated with antibiotics. We collected cecal contents from mice treated with ampicillin and cultured in vitro and succeeded in isolation of 26 strains. Among 26 strains, we excluded 5 strains, because they were negatively correlated with the frequency of IFN γ ⁺ CD8⁺ T cells (based on the microbiome analysis by Hattori group), and selected 21 strains. The isolated and selected 21 strains had strong and sufficient ability to induce IFN γ ⁺ CD8⁺ T cells in the colon when inoculated into GF mice.

1b) 腸管バリア維持に働く細菌単離（口腔常在菌・抗生物質多剤耐性菌に対する定着防御に働く細菌）:
ヒトは毎日約1.5Lの唾液を飲み込んでおり、その中には多数の口腔常在菌が含まれている。通常口腔常在菌は腸管には定着しないが、腸内細菌の dysbiosis があると、口腔常在菌が腸管定着し、慢性炎症の原因になることが示唆されている。そこで口腔常在菌の中で、腸管に定着した際、免疫細胞を活性化させる細菌種が含まれている可能性が考えられ、そうした細菌を探索した。クローン病患者由来の唾液サンプルを無菌マウスに投与すると、ヒト唾液に含まれる一部の口腔常在菌がマウス腸管に定着し、更に唾液サンプルによっては、大腸 IFN γ 産生 CD4 陽性 T 細胞（TH1 細胞）を強力に誘導することを見出した。大腸 TH1 細胞の誘導がみられたクローン病患者由来唾液投与マウスから、計8菌株を単離し、その中で最も強力な TH1 細胞誘導菌はクレブシエラ菌株（*Klebsiella pneumoniae*）であることが判明した。

1b) Identification of intestinal bacteria that contribute to maintenance of intestinal mucosal barrier integrity by providing colonization resistance against bacteria of oral origin and multidrug resistant microbes.

Humans naturally produce and swallow as much as 1.5 liters of saliva per day. Oral bacteria usually transit through and do not colonize in the intestine. However, if there is an unnatural shift in the composition of the gut microbiota, i.e., gut microbiota dysbiosis, oral bacteria may colonize in the intestine. Indeed, colonization with microbes of oral origin can be seen in the intestine of patients with several diseases such as Crohn's disease (CD), liver cirrhosis and colon cancer. The colonized oral bacteria may affect the intestinal and systemic immune systems. Therefore, we searched for T cell stimulatory bacterial species colonizing in the human oral cavity. For this purpose, saliva samples were obtained from patients with CD, and inoculated into germ-free (GF) mice. A saliva sample from one CD patient induced a marked accumulation of Th1 cells in the colonic lamina propria of the inoculated mice. Several bacterial species were specifically observed in the gut microbiome of mice inoculated with the CD patient saliva, but not in mice inoculated with saliva samples from other donors. To isolate Th1 cell-inducing bacterial strains, we cultured cecal contents from the mice inoculated with the CD patient saliva and succeeded in isolation of 8 individual bacterial strains. GF mice inoculated with a mixture of the isolated 8 strains had a significant increase in Th1 cells. Among the 8 strains, the *Klebsiella pneumoniae* strain was found to be the major driver for the Th1 cell induction by the gnotobiotic mouse experiments.

2. Beige 細胞誘導細菌の単離

ほ乳類には二種類の形態的・機能的に異なる脂肪細胞（白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞）が存在する。白色脂肪組織中にも、寒冷負荷などによって褐色脂肪細胞と同じ働きをする細胞、すなわち「Beige 細胞」が

誘導され、熱産生が増加し、体脂肪が減少することが知られている。本田グループは、6人の健常ボランティア（A～F）便サンプルをそれぞれ無菌マウスに投与し、6サンプルのうち3サンプルを投与したマウスグループの鼠径部皮下脂肪組織において褐色化の指標である UCP1 mRNA 発現が顕著に上昇している事を見出した。

2. Identification of intestinal bacteria that can induce Beige cells.

It is well-known that there are two types of adipose tissues: Brown and white adipose tissues. Brown adipose cells express UCP1 and generate heat, thereby contributing to prevention of obesity and metabolic diseases. Within the white adipose tissues, UCP1 positive cells can be induced by cold stress and catecholamine stimulation. The induced cells are called Beige cells and functionally equivalent to brown adipose cells. Because some people have Beige adipose, but some people do not, we hypothesized that Beige cell development can be affected by environmental factors, particularly the gut microbiota. To test this hypothesis, Honda group recruited 6 healthy donors, and obtained fecal samples. Then, the fecal samples were orally gavaged into 6 sets of germ-free mice kept in 6 independent vinyl isolators. Three weeks after the inoculation, we collected inguinal white adipose tissues and performed qPCR for UCP1. Inoculation with 3 out of 6 fecal samples resulted in induction of UCP1 expression in gonadal white adipose tissues. These results indicate that microbial composition indeed affects the development of Beige cells.

3. 健康長寿に影響を与える細菌単離

百寿者、特に 110 歳以上の超百寿者（スーパーセンテナリアン）は人生の大半を身体的に自立した状態で迎えており、健康長寿のスーパーエリートである。慶應義塾大学・百寿総合研究センターと協力し、本田グループと服部グループは、すでに 57 名の 105 歳以上の百寿者の腸内細菌叢についてメタゲノムシーケンシングを行い、百寿者特異的な腸内細菌種及び、約 60 万の特異的な遺伝子を同定した。

3. Identification of bacteria that affect successful aging

Centenarians, in particular people aged over 110 years old (called ‘supercentenarians’), who retain independence and capability as well as cognition at higher levels, can be considered to represent the prototypes of the successful aging. We hypothesized that some components of the gut microbiota affects/prevents immunosenescence and inflammation in centenarians. To identify subsets of bacteria that affect the immunosenescence and inflammation, groups of Honda and Hattori have collected 57 fecal samples from elderly people over 105 years old, and analyzed their microbiome by 16S rRNA pyrosequencing and shot-gun meta-genomic sequencing. Our analysis identified several centenarian-specific bacterial species and 0.6 million centenarian-specific genes in the gut microbiome.

4. 次世代型基盤技術の確立

上記研究開発 3 課題を加速し、分子メカニズム・責任生理活性物質の同定につなげるため、以下の次世代型基盤技術の確立を進めた。

4-1) 菌体のゲノム、トランスクリプトーム、メタボローム情報の統合的/網羅的解析および代謝マップの構築：

本プロジェクトでは IFN- γ ⁺CD8⁺ T 細胞・Th17・Th1・Beige 細胞・健康長寿に関わるヒト腸内細菌株由来の責任生理活性物質の同定を目指し、有田グループは高精度・高網羅的なメタボローム解析技術の確立に取り組んだ。当該年度は、幅広い分子種を網羅的に探索可能なノンターゲット解析に必要な LC-QTOF MS システム、および、微量成分を高感度に検出可能なターゲット解析用の LC-TripleQ MS システムの立ち上げを行い、各種のマウス糞便検体に適用した。

We aimed to develop a metabolome analysis platform with high precision and wide coverage to identify gut microbiome-derived functional metabolites related to IFN- γ ⁺CD8⁺ T cells, Th17, Th1 beige cells and longevity. In this year, Arita group constructed LC-QTOF MS system for comprehensive analysis of wide variety of lipid metabolites. Arita group also established LC-TripleQ MS system for the selective and sensitive monitoring of lipid metabolites. These systems were applied to mouse feces samples.

4-2) マーモセットを用いた腸内細菌研究のための動物技術確立：

マウスで得られた知見をヒトにトランスレーションする霊長類動物モデルの構築を目的として、コモンマーモセットの無菌化技術確立のため、井上グループは、無菌飼育用ビニルアイソレーターを配備した専用実験室や飼育・実験器材のセットアップを行い、妊娠から帝王切開、新生児管理、人工哺育までのプロトコルを検討した。

To establish a translational nonhuman primate model for applied gut microbiota research, Inoue group planned to generate germfree common marmosets and set up an experiment room with vinyl isolators and suitable devices and protocols for producing and rearing germfree marmosets.

5. 工業化を視野に入れた、腸内細菌培養法・品質管理基礎技術・生理活性物質産生技術の開発

腸内細菌叢研究の成果からどのような産業応用例があるのかを調査するため、熊谷グループは 6th International Human Microbiome Consortium および Keystone Symposia/Microbiome in Health and Disease に出席した。腸内細菌叢が、従来言われてきた各種腸疾患や代謝性疾患ばかりでなく、免疫系への影響を介することで、癌の発生や治療にも影響を及ぼしている点が注目された。研究手法としては、ノトバイオトマウスと嫌気培養を組合わせて、特定の原因菌カクテルを同定するという本事業の戦略が、世界的をリードする知見を獲得し、産業応用へも発展させやすいものである感触を得た。

その一方で、本事業におけるメタゲノム解析のサポートのために、メタ 16SrRNA 解析については熊谷グループの研究員が基礎的な技術を習得した。サポートをさらに充実させるため、第 11 回日本ゲノム微生物学会年會に参加して国内最先端のバクテリアゲノム解析に関する研究について情報収集した。

To collect the information of the industrial applications of intestinal microbiota research achievement, Kumagaya group attended 6th International Human Microbiome Consortium and Keystone Symposia/ Microbiome in Health and Disease. It was impressive that the intestinal microbiota influenced not only on some kind of bowel diseases and metabolic diseases, but also on carcinogenesis

and therapy of cancer. The strategy of this project in which bacterial cocktail is identified by anaerobic culture and analyses of gnotobiotic animals, is correct to develop industrial applications.

On the other hand, researchers from Kumagaya group learned the technique of 16S rRNA analysis for supporting metagenome analysis in this project. Researchers from Kumagaya group also attended 11th Meeting of Society of Genome Microbiology Japan to learn novel analysis methods for bacterial genomics.

II. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 4 件)

1. Kamo T, Akazawa H, Suda W, Saga-Kamo A, Shimizu Y, Yagi H, Liu Q, Nomura S, Naito AT, Takeda N, Harada M, Toko H, Kumagai H, Ikeda Y, Takimoto E, Suzuki JI, Honda K, Morita H, Hattori M, Komuro I. Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure. **PLoS One** (2017)
doi:10.1371/journal.pone.0174099
2. Kasahara K, Tanoue T, Yamashita T, Yodoi K, Matsumoto T, Emoto T, Mizoguchi T, Hayashi T, Kitano N, Sasaki N, Atarashi K, Honda K, Hirata KI. Commensal bacteria at the crossroad between cholesterol homeostasis and chronic inflammation in atherosclerosis. **J Lipid Res.** (2017) 58:519-528
3. Thaïss CA Levy M, Korem T, Dohnalová L, Shapiro H, Jaitin DA, David E, Winter DR, Gury-BenAri M, Tatrovsky E, Tuganbaev T, Federici S, Zmora N, Zeevi D, Dori-Bachash M, Pevsner-Fischer M, Kartvelishvily E, Brandis A, Harmelin A, Shibolet O Halpern Z, Honda K, Amit I, Segal E, Elinav E. Microbiota Diurnal Rhythmicity Programs Host Transcriptome Oscillations. **Cell** (2016) 167(6):1495-1510
4. Jones L, Ho WQ, Ying S, Ramakrishna L, Srinivasan KG, Yurieva M, Ng WP, Subramaniam S, Hamadee NH, Joseph S, Dolpady J, Atarashi K, Honda K, Zolezzi F, Poidinger M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. A subpopulation of high IL-21-producing CD4(+) T cells in Peyer's Patches is induced by the microbiota and regulates germinal centers. **Sci Rep.** (2016) 6:30784.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「T cell stimulatory bacteria colonizing in the human oral cavity」、口頭、Kenya Honda、Cold Spring Harbor ASIA: Frontiers of Immunology in Health & Disease、2016/10/3、国内。
2. 「Gut microbiota in immune activation」、口頭、Kenya Honda、4th Annual meeting of the International Cytokine and Interferon Society、2016/10/17、国外。

3. 「Regulation of the immune system by the gut microbiota」、口頭、Kenya Honda、Cold Spring Harbor Asia Conferences、Alberta- AMED Workshop for Medical Innovation、2017/2/25、国外.
4. 実験動物としてのマーモセットの特性と疾患モデルへの応用、口頭、井上貴史、第 5 回実験動物科学シンポジウム「医学研究を支える実験動物科学-サル類-」、2016/10/21、国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 2017 年シリーズ「新しい日本のがん対策—予防・根治・共生に向けて」：第 6 回 がんと腸内細菌、本田 賢也、ラジオ NIKKEI 第 1 杏林シンポジア、2017/3/6、国内.
2. 医学研究に貢献する小型サル「コモンマーモセット」、井上貴史、川崎市サイエンスカフェ@殿町キングスカイフロント、2016/12/9、国内.

(4) 特許出願

公開希望特許出願：無し

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業インキュベートタイプ
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation
- 研究開発課題名： (日本語) 腸内細菌株カクテルを用いた新規医薬品の創出
(英語) Development of therapeutic cocktails of bacteria isolated from the gut microbiota
- 研究開発担当者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)
- 実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 腸内細菌叢の代謝マップの構築および機能性代謝物の同定
開発課題名： (英語) Construction of the metabolic pathway map and identification of functional metabolites produced by the gut microbiota
- 研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター
メタボローム研究チーム・チームリーダー 有田 誠
所属 役職 氏名： (英語) Riken IMS・Team leader・Makoto Arita

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室 本田 賢也 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
公開希望特許出願：無し

平成 2 8 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 革新的先端研究開発支援事業インキュベートタイプ
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名：(日本語) 腸内細菌株カクテルを用いた新規医薬品の創出
(英語) Development of therapeutic cocktails of bacteria isolated from the gut microbiota

研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室 教授 本田 賢也
所属 役職 氏名：(英語) Department of Microbiology and Immunology
Keio University School of Medicine
Professor Kenya Honda, M.D., Ph.D.

実施期間：平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 常在菌叢ゲノム・転写物解析
開発課題名：(英語) Genomics and transcriptomics of microbiomes

研究開発分担者 (日本語) 早稲田大学理工学術院 先進理工学研究科 教授 服部 正平
所属 役職 氏名：(英語) Waseda University・Professor・Masahira Hattori

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者による報告の場合
- ・ 研究開発分担者による報告の場合
研究開発代表者：慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室 本田 賢也 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
公開希望特許出願：無し

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research & Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 腸内細菌株カクテルを用いた新規医薬品の創出
(英語) Development of therapeutic cocktails of bacteria isolated from the gut microbiota

研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室 教授 本田 賢也
所属 役職 氏名： (英語) Department of Microbiology and Immunology
Keio University School of Medicine
Professor Kenya Honda, M.D., Ph.D.

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) マーモセットを用いた腸内細菌研究のための動物技術確立
開発課題名 (英語) Establishment of animal technology for gut microbiota research with common marmosets

研究開発分担者 (日本語) 公益財団法人実験動物中央研究所 マーモセット研究部 疾患モデル研究室
室長 井上貴史
所属 役職 氏名： (英語) Takashi Inoue, Laboratory head, Disease model animal laboratory,
Marmoset research department, Central Institute for Experimental Animals

II. 成果の概要 (総括研究報告)

・研究開発代表者による報告の場合

・研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室 本田 賢也 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
該当無し

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 実験動物としてのマーモセットの特性と疾患モデルへの応用，口頭，井上貴史，第 5 回実験動物科学シンポジウム「医学研究を支える実験動物科学-サル類-」、2016/10/21，国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 医学研究に貢献する小型サル「コモンマーモセット」，井上貴史，川崎市サイエンスカフェ@殿町キングスカイフロント，2016/12/9，国内.

(4) 特許出願

公開希望特許出願：無し

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 革新的先端研究開発支援事業インキュベータータイプ
(英語) Advanced Research & Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名：(日本語) 腸内細菌株カクテルを用いた新規医薬品の創出
(英語) Development of therapeutic cocktails of bacteria isolated from the gut microbiota

研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室 教授 本田 賢也
所属 役職 氏名：(英語) Department of Microbiology and Immunology
Keio University School of Medicine
Professor Kenya Honda, M.D., Ph.D

実施期間：平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 工業化を視野に入れた、腸内細菌培養法・品質管理基礎技術・生理活性物質産生技術の開発

開発課題名：(英語) Development of intestine bacterial culturing methods, basic techniques for quality management and production technology for physiologically active substances

研究開発分担者 (日本語) JSR 株式会社 研究員 熊谷 浩高
所属 役職 氏名：(英語) JSR Corporation, Researcher, Hirotaka Kumagai

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室 本田 賢也 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）
なし
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
なし
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし
- (4) 特許出願
なし