

## 先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実績報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	腸内環境と免疫システム構築の統合的理解とその応用
研究機関・ 部局・職名	東京大学・医学系研究科・准教授
氏名	本田賢也

1. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成24年9月30日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	92,128,123	92,128,123	0	92,128,123	92,128,123	0	0
間接経費	27,638,436	27,638,436	0	27,638,436	27,638,436	0	0
合計	119,766,559	119,766,559	0	119,766,559	119,766,559	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	1,372,111	17,397,743	31,656,294	0	50,426,148
旅費	0	1,312,130	611,810	0	1,923,940
謝金・人件費等	0	0	1,162,433	0	1,162,433
その他	2,773,638	27,261,327	8,580,637	0	38,615,602
直接経費計	4,145,749	45,971,200	42,011,174	0	92,128,123
間接経費計		16,936,500	10,701,936	0	27,638,436
合計	4,145,749	62,907,700	52,713,110	0	119,766,559

4. 主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
嫌気培養システム	米国COY社製	1	4,305,000	4,305,000	2011/6/27	東京大学
オートクレーブ/LSX-500	トミー精工	1	580,125	580,125	2012/6/25	東京大学
超低温フリーザー	パナソニック	1	2,100,000	2,100,000	2012/6/25	東京大学
微量高速冷却遠心機	トミー精工	1	981,750	981,750	2012/8/24	東京大学

5. 研究成果の概要

本補助事業の目的は、免疫細胞に深く影響を与える腸内細菌種を明らかにすることである。制御性T細胞(Treg細胞:免疫系を強力に抑制する細胞)はマウス消化管に多数存在するが、無菌環境下では激減する。今回、ヒト消化管常在菌から、Treg誘導能を指標としてスクリーニングを行い、22菌株のクロストリジウム属菌の単離に成功した。この22菌株混合液を無菌マウスに投与すると、Treg細胞数の顕著な増加が観察された。更に22菌株の経口投与は、炎症性腸炎及びアレルギー性腸炎モデルに対する抑制効果があった。単離した菌株の補充療法が、炎症性腸疾患の新しい治療法となり得ると考えられた。本研究に関連して2件の特許出願を行った。

課題番号	LS035
------	-------

## 先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されません
-------------------

研究課題名 (下段英語表記)	腸内環境と免疫システム構築の統合的理解とその応用
	Toward a unified comprehension of enteric environment and mucosal immune system
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	東京大学・医学系研究科・准教授
	The university of Tokyo, Graduate School of Medicine, Associate Professor
氏名 (下段英語表記)	本田 賢也
	Kenya Honda

### 研究成果の概要

(和文): 本補助事業の目的は、免疫細胞に深く影響を与える腸内細菌種を明らかにすることである。制御性 T 細胞 (Treg 細胞: 免疫系を強力に抑制する細胞) はマウス消化管に多数存在するが、無菌環境下では激減する。今回、ヒト消化管常在菌から、Treg 誘導能を指標としてスクリーニングを行い、22 菌株のクロストリジウム属菌の単離に成功した。この 22 菌株混合液を無菌マウスに投与すると、Treg 細胞数の顕著な増加が観察された。更に 22 菌株の経口投与は、炎症性腸炎及びアレルギー性腸炎モデルに対する抑制効果があった。単離した菌株の補充療法が、炎症性腸疾患の新しい治療法となり得ると考えられた。本研究に関連して2件の特許出願を行った。

(英文): Regulatory T cells (Treg cells) are potent immune regulatory cells, which are highly enriched in the intestinal mucosa of normal mice, but markedly reduced in germ-free mice. In this study, starting with a healthy human fecal sample, a sequence of selection steps was applied to obtain gnotobiotic mice colonized with human microbiota enriched in Treg-inducing strains. From these mice, we isolated 22 strains of bacteria belonging to Clostridia. When the cocktail of 22 strains was inoculated into germ-free mice, it displayed full potency for the accumulation of Treg cells. Furthermore, oral administration of the cocktail into adult mice attenuated disease in models of colitis and allergic diarrhea. Thus, use of the isolated Clostridia strains may allow for tailored therapeutic manipulation of human immune disorders.

## 様式21

1. 執行金額 119,766,559 円  
(うち、直接経費 92,128,123 円、 間接経費 27,638,436 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成24年 9月30日

### 3. 研究目的

消化管には約 1000 種の細菌が、それぞれ互いのテリトリーを保ちながらダイナミックな平衡状態を保って生存しており、全体として腸内フローラを形成している。腸内フローラは、宿主の免疫系に深く影響を与えることが知られており、腸内フローラの構成不均衡(dysbiosis)が、様々な免疫疾患に関連することが徐々に明らかとなってきている。腸内フローラを構成する細菌は、それぞれが異なる様式で消化管粘膜細胞と恒常的に相互作用している。従って腸内フローラの宿主への影響を真に理解し、医療や健康科学に応用するには、腸内フローラを構成する「個々の」菌種の役割を個別に把握していくことが重要である。近年、マウスの無菌化技術の向上により、ノトバイオームマウス(gnotobiot:ある特定の微生物だけが存在するマウス)を作製することで、個々の細菌の影響を個別に検討することが容易になってきた。またメタゲノム解析など、培養に依存しない腸内フローラの機能的解析も可能となってきている。さらに重要なこととして、細菌学者の長年の努力により、我が国には腸内フローラから単離した細菌菌株のストックライブラリーが充実している。そして、宿主に強く影響を与える腸内細菌種を絞り込む手順もある程度確立している。こうした技術・知識・マテリアル基盤を、新たな解析システムに活用することで、世界をリードする腸内フローラ研究を推進できる可能性がある。

消化管にはユニークな免疫細胞が数多くみられる。中でも、免疫系を抑制する制御性 T 細胞(“Treg 細胞”)は、マウス消化管粘膜に恒常的に多数存在し、炎症抑制性サイトカイン IL-10 等を産生することによって、消化管粘膜バリアシステムの維持に極めて重要な役割を果たしている。更に消化管で生み出された Treg 細胞は、全身性の自己免疫性炎症あるいはアレルギー反応を抑制する働きもあり、消化管の Treg 細胞の数・機能を人為的に増加させることが出来れば様々な疾患治療に応用できると考えられている。

これまでの我々の研究から、消化管 Treg 細胞は、無菌マウスに於いてその数が激減していることが明らかになっている。従って、腸内細菌の存在が消化管 Treg 細胞誘導に重要な役割を果たしていると考えられた。そこで本研究においては、ノトバイオーム技術を用いて、Treg 細胞を誘導するヒト由来の腸内細菌種を同定し、自己免疫性炎症やアレルギー疾患に対する新しい治療法開発を目指して研究を推進した。

### 4. 研究計画・方法

(1) ヒト消化管由来 Treg 細胞誘導細菌が濃縮して存在するマウスの作製:

ノトバイオーム技術を応用し、Treg 細胞誘導性ヒト由来腸内細菌が濃縮されたマウスを作製する。まず、ヒト便(健常日本人・男性・成人由来)からスタートする。ヒト便を無菌マウスに投与し、無菌ビニールアインレーターで3週間飼育した後、腸管の Treg 細胞数を確認する。その際、ヒト便をクロロホルム処理

し、無菌マウスに投与して Treg 細胞誘導を観察することで、クロロホルム耐性菌分画あるいは感受性分画のどちらに Treg 細胞誘導能があるかを確認する。更に Treg 細胞誘導が観察されたマウスの回盲部内容物を 2 万倍希釈して、別の無菌マウスに投与する。Treg 細胞誘導が観察されたマウスの回盲部内容物を再び 2 万倍希釈して、別の無菌マウスに投与し、Treg 細胞誘導が観察されたマウスを選択してゆく。この間、次世代シーケンサーによるメタ 16S 解析を行い、マウスの腸内細菌の組成をモニタリングすることで、どのような細菌種に Treg 細胞誘導能があるかを確認してゆく。こうした作業を繰り返すことで、Treg 細胞誘導能を持つ細菌が濃縮されたマウスを作製する。

(2) Treg 細胞誘導ヒト由来菌株の単離: Treg 細胞誘導能を持つヒト由来細菌が濃縮されたマウスの回盲部内容物から細菌株を出来るだけ多く単離する。単離した細菌株のすべてを混合して無菌マウスに投与し、Treg 細胞誘導を確認する。更に無菌 IL10 遺伝子発現レポーターマウスに菌株を投与し、その IL-10 発現に於ける影響を観察する。Treg 細胞の誘導が確認された場合、菌株の数を徐々に減少させ、Treg 細胞誘導にかかる最小単位の Treg 細胞誘導菌株を得る。

(3) 無菌疾患モデルマウスへの同定細菌の投与とその効果判定: 同定した腸内細菌の実際の効果を、T 細胞移入による腸炎モデル・TNBS 腸炎モデル・アレルギー性腸炎モデルなどの疾患モデルマウスを用いて判定する。

(4) 同定細菌株のゲノム配列解読: 同定した細菌株すべてについてゲノム配列を解読し、菌株が持つ遺伝子を想定する。細菌株が毒性因子を持たないことを確認すると同時に、細菌に由来する Treg 細胞誘導活性物質の同定を試みる。

## 5. 研究成果・波及効果

(1) ヒト腸内細菌にも、少なくともマウスにおいて Treg 細胞誘導活性を持つ細菌種が存在する事が明らかとなった。更にそれらは、クロロホルム耐性の細菌であることがわかった。また細菌をオートクレーブすると Treg 細胞誘導活性を失ったことから、生きて菌として働いてはじめて Treg 細胞誘導活性を持つことがわかった。回盲部内容物の希釈と無菌マウスへの投与を繰り返すことで、Treg 細胞誘導細菌が濃縮されたマウスを得ることが出来た。このマウスには約 20 種類のクロストリジウム属菌と類似の 16S rRNA 遺伝子配列を持つ細菌が濃縮されていた。このマウスから 31 菌株の細菌株の単離に成功した。このうち 16S rRNA 遺伝子配列が類似しているものを除く 22 菌株の細菌を混合して無菌マウスに投与したところ、強力な Treg 細胞の誘導が観察された。さらに、無菌 IL10 遺伝子発現レポーターマウスに 22 菌株を投与したところ、IL-10 を発現する Treg 細胞の割合が著増していた。

(2) 得られた 22 菌株の混合液を、通常環境下 (SPF 環境) で飼育したマウスに 2-3 日おきに経口投与したところ、SPF マウスにおいても有意な Treg 細胞の増加が見られた。このマウスの TNBS 腸炎モデルおよびアレルギー性腸炎モデルに対する感受性を調べたところ、コントロール群と比べて有意に、炎症あるいはアレルギー反応の抑制が観察された。

(3) 単離した 22 菌株の細菌は、すべてクロストリジウム綱に属する菌であった。またゲノム配列を解

読したところ、いずれも主要な毒素や病原因子を持たないことが明らかとなった。さらに遺伝子解析から、これらの細菌は短鎖脂肪酸代謝経路に関わる遺伝子を豊富に保有していることが分かった。

(4) 以上、ヒト腸内細菌に由来する 22 菌株の Treg 誘導細菌株の単離に成功した。またこれらの細菌は、マウスにおいて腸炎やアレルギーモデルを抑制したことから、ヒトにおいてもこれらの免疫疾患治療に応用出来る可能性が示唆された。これらに関して2件の特許出願を行った。

6. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 14 件</p>	<p>(掲載済み—査読有り) 計12件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Intestinal commensal microbes as immune modulators. Ivanov II, <a href="#">Honda K.</a> Cell Host Microbe. 2012 Oct 18;12(4):496–508. doi: 10.1016/j.chom.2012.09.009.</li> <li>2. The induction of Treg cells by gut–indigenous Clostridium. Nagano Y, Itoh K, <a href="#">Honda K.</a> Curr Opin Immunol. 2012 Aug;24(4):392–7. doi: 10.1016/j.coi.2012.05.007.</li> <li>3. Cross–interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. Negishi H, Yanai H, Nakajima A, Koshiba R, Atarashi K, Matsuda A, Matsuki K, Miki S, Doi T, Aderem A, Nishio J, Smale ST, <a href="#">Honda K.</a> Taniguchi T. Nat Immunol. 2012 May 20;13(7):659–66. doi: 10.1038/ni.2307.</li> <li>4. Immunoregulation by the gut microbiota. Nishio J, <a href="#">Honda K.</a> Cell Mol Life Sci. 2012 Nov;69(21):3635–50. doi: 10.1007/s00018–012–0993–6.</li> <li>5. Protective role of interferon regulatory factor 3–mediated signaling against prion infection. Ishibashi D, Atarashi R, Fuse T, Nakagaki T, Yamaguchi N, Satoh K, <a href="#">Honda K.</a> Nishida N. J Virol. 2012 May;86(9):4947–55. doi: 10.1128/JVI.06326–11.</li> <li>6. The role of Irf6 in tooth epithelial invagination. Blackburn J, Ohazama A, Kawasaki K, Otsuka–Tanaka Y, Liu B, <a href="#">Honda K.</a> Rountree RB, Hu Y, Kawasaki M, Birchmeier W, Schmidt–Ullrich R, Kinoshita A, Schutte BC, Hammond NL, Dixon MJ, Sharpe PT. Dev Biol. 2012 May 1;365(1):61–70.</li> <li>7. The microbiome in infectious disease and inflammation. <a href="#">Honda K.</a> Littman DR. Annu Rev Immunol. 2012;30:759–95. Epub 2012 Jan 6. PMID: 22224764</li> <li>8. Induction of Treg cells in the mouse colonic mucosa: a central mechanism to maintain host–microbiota homeostasis. Tanoue T, <a href="#">Honda K.</a> Semin Immunol. 2012 Feb;24(1):50–7. Epub 2011 Dec 14. PMID: 22172550</li> <li>9. Microbiota in autoimmunity and tolerance. Atarashi K, <a href="#">Honda K.</a> Curr Opin Immunol. 2011 Dec;23(6):761–8. Epub 2011 Nov 22. PMID: 22115876</li> <li>10. Suppression of immune responses by nonimmunogenic oligodeoxynucleotides with high affinity for high–mobility group box proteins (HMGBs). Yanai H, Chiba S, Ban T, Nakaima Y, Onoe T, <a href="#">Honda K.</a> Ohdan H, Taniguchi T. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jul 12;108(28):11542–7. Epub 2011 Jun 27. PMID: 21709231</li> <li>11. Generation of mice deficient in RNA–binding motif protein 3 (RBM3) and characterization of its role in innate immune responses and cell growth. Matsuda A, Ogawa M, Yanai H, Naka D, Goto A, Ao T, Tanno Y, Takeda K, Watanabe Y, <a href="#">Honda K.</a> Taniguchi T. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Jul 22;411(1):7–13. Epub 2011 Jun 12. PMID: 21684257</li> <li>12. Microbial influence on T cell subset development. Atarashi K, Umesaki Y, <a href="#">Honda K.</a> Semin Immunol. 2011 Apr;23(2):146–53. Epub 2011 Feb 3. PMID: 21292500</li> </ol> <p>(掲載済み—査読無し) 計 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Porphyromonas gingivalis sinks teeth into the oral microbiota and periodontal disease. <a href="#">Honda K.</a></li> </ol>
------------------------	---

	<p>Cell Host Microbe. 2011 Nov 17;10(5):423-5. PMID: 22100158</p> <p>2. 実験医学 2011 年 11 月号 腸内フローラによる免疫ホメオスターシス (本田賢也/企画) p1-5 「腸内フローラに関して何がわかってきたのか」 本田賢也 著</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 9 件</p>	<p>専門家向け 計 9 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 「Microbiota's Influence on Immunity」 3rd Schloss Elmau Meeting on Resistance and Disease promoting Principles of Innate Immunity (ドイツ, Elmau, 2012) <a href="#">Kenya Honda</a></li> <li>2. 「Treg-inducing commensal Clostridium species derived from the human microbiome」 Cold Spring Harbor Asia conference (中国, Suzhou, 2012) <a href="#">Kenya Honda</a></li> <li>3. 「Intestinal Commensal Bacteria-Mediated Treg Induction」 Keystone Symposia, The Microbiome (アメリカ, Keystone, 2012) <a href="#">Kenya Honda</a></li> <li>4. 「Induction of intestinal regulatory T cells」 WORLD IMMUNE REGULATION MEETING-VII (スイス, Davos, 2012) <a href="#">Kenya Honda</a>, Koji Atarashi, Takeshi Tanoue, Hidetoshi Morita, Masahira Hattori</li> <li>5. 「Microbiotal influence on T cell subset development」 日本免疫学会学術集会シンポジウム(日本, 幕張, 2011) <a href="#">Kenya Honda</a></li> <li>6. 「Intestinal Microbiota Shapes the Adaptive Immune System」The 2011 Fall Conference of the Korean Association of Immunologists (韓国, Seoul, 2011) <a href="#">Kenya Honda</a></li> <li>7. 「Microbiotal influence on T cell subset development: Implications for inflammation and cancer」 The 16th Science in Japan Forum "Immune System and Cancer" (アメリカ, Washington DC, 2011) <a href="#">Kenya Honda</a></li> <li>8. 「Contribution of the intestinal immune system and gut microbiota to health」 The 6th International Yakult Symposium (オーストリア, Vienna, 2011) <a href="#">Kenya Honda</a>, Koji Atarashi, Takeshi Tanoue, Tatsuichiro Shima, Akemi Imaoka, Dan R. Littman, Ivaylo I. Ivanov, Kikuji Itoh, Yoshinori Umesaki</li> <li>9. 「腸内細菌による免疫系制御」 日本学術振興会ゲノムテクノロジー第 164 委員主催第 36 回研究会 (東京, 2011) 本田賢也</li> </ol> <p>一般向け 計 0 件</p>
<p>図書 計 1 件</p>	<p>Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (Baumgart 編, Springer, 2012) Chapter 6 「Microbial Recognition and Pathogen-Associated Molecular Pattern Receptors in Inflammatory Bowel Disease」 <a href="#">Kenya Honda</a>, Koji Atarashi and Junko Nishio</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計 2 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 出願番号: U.S. Provisional Application No.: 61/607,360 発明者: HONDA Kenya, ATARASHI Koji, TANOUE Takeshi, HATTORI Masahira, MORITA Hidetoshi 発明の名称: HUMAN-DERIVED BACTERIA THAT INDUCE PROLIFERATION OR ACCUMULATION OF REGULATORY T CELLS 出願人: The University of Tokyo, Azabu Veterinary Medicine Educational Institution. 出願日: 2012 年 3 月 6 日</li> <li>2. 出願番号: PCT/JP2011/063302 発明者: HONDA Kenya, ATARASHI Koji, ITOH Kikuji, TANOUE, Takeshi 発明の名称: COMPOSITION FOR INDUCING PROLIFERATION OR ACCUMULATION OF REGULATORY T CELLS 出願人: The University of Tokyo 出願日: 2011 年 6 月 3 日</li> </ol>

## 様式21

Webページ (URL)	現在異動に伴い再構築中です
国民との科学・技術対話の実施状況	・免疫学会のアウトリーチ活動の「免疫不思議未来」(2011年8月21日及び2012年8月19日に開催)の 実行委員として参画し、免疫系の重要性と腸内細菌との相互作用について説明した。
新聞・一般雑誌等掲載 計1件	2011年5月28日放送のNHKサイエンス Zero に出演し、我々の研究成果を紹介した。
その他	

## 7. その他特記事項