

Graduate School of Advanced Science and Engineering
Waseda University

博士論文概要

Doctoral Thesis Synopsis

論文題目

Thesis Theme

Gut microbiome analysis for
diet intervention study with mouse and human models
マウスやヒトモデルを対象にした
食事介入研究における腸内細菌叢解析

申請者
(Applicant Name)

Rieka	CHIJIWA
千々岩	樹佳

Department of Life Science and Medical Bioscience
Research on Biomolecular Science and Engineering

May 2020

多くの生物の腸内には多種多様な腸内細菌叢が存在している。腸内細菌は細菌同士や宿主と相互作用をしており、ユニークな環境を構築している。腸内細菌叢のバランスを維持することが、健康維持に有効であると考えられている。腸内細菌が生産する短鎖脂肪酸 (Short-Chain Fatty Acids: SCFAs) は、宿主における栄養成分の獲得やエネルギー産生、免疫向上機能にも関与していることが報告されている。また、腸内細菌は宿主の腸管機能だけでなく、生理、免疫、さらには脳機能にまで関与していることも示唆されている。そのため、近年腸内細菌叢を制御する研究が多く進められている。腸内細菌叢の制御を可能とする重要な因子として、食事が挙げられる。食事成分により腸内細菌叢の組成や機能活性を変化させることが可能である。腸内細菌叢のバランスを保持し健康維持を図る目的で多様な機能性食品の開発が展開されているが、その生理的効果の検証が求められている。さらに、何時どのような食事を取ることが体の生理機能の向上につながるのかを時間栄養学的に研究することが注目されている。しかしながら腸内細菌叢と宿主の関係性を含めた研究知見はまだ少ない。そこで本論文では、食事成分を介した腸内細菌叢が宿主に与える影響について、時間栄養学や免疫学の観点から先端的な解析アプローチも活用しながら評価した。

以下に各章で記述された内容を要約する。

第 1 章では、腸内細菌叢と宿主に関する研究について、現状と課題を概説した。最後に本研究の目的と意義について記述した。

第 2 章では、ヒトを対象にした水溶性食物繊維イヌリンを用いた介入研究を行った。近年、医療技術の進展や生活環境の充足によって日本の高齢化は飛躍的に進んできた。しかし高齢化社会の抱える問題点として、高齢化による身体的な機能低下と共に、生活の QOL 低下が指摘されている。この課題を解決するためには健康年齢の延伸が必須である。高齢者の機能改善を目的とした栄養学的・医学的研究が数多く展開されているが、腸内細菌叢の改善は重要な因子として注目されている。そこで本研究では、健常な高齢者を対象として、時間栄養学的視点を考慮したうえで食事に伴う菌叢変動と臨床パラメータとの関連を解析した。健常な男女中高齢者 57 名を被験者として 3 ヶ月間イヌリンもしくはプラセボ（デキストリン）の摂取実験を行った。摂取時間の影響を調べるため、朝と夜摂取群に分け、それぞれの群において介入前後で糞便中の腸内細菌叢解析（16S rRNA 遺伝子解析）、腸内細菌叢の活性指標となる SCFAs の測定を行い、臨床パラメータも取得した。取得した腸内細菌叢解析データと SCFAs データについて、群内、群間で検定を実施し、イヌリン摂取による腸内細菌叢の変動と摂取時間の影響の相関を解析した。さらに、様々な臨床パラメータとの相関に関しても解析を実施し、

イヌリンによる健常な高齢者の腸内細菌叢への影響について総合的な相関の有無を検討した。その結果、健常な高齢者における腸内細菌叢は、個人差が大きいことが明らかになった。そしてイヌリンが腸内細菌叢と SCFAs 産生に及ぼす影響については、イヌリン摂取の有無による影響より摂取時間による影響の方が大きいことが示された。しかしながら、被験者集団として見出される特徴は、個人差が大きいことから必ずしも見出すことは困難であった。そこで、イヌリン摂取によって SCFAs 生産量が増加した被験者をレスポonderとし、臨床パラメータ (BMI, 中性脂肪値, 血糖値, インスリン値) との相関を検証した。その結果、レスポonderの中でも朝摂取群がより SCFAs データと他因子との相関を強く示した。このように本章の結果は、高齢者の身体的機能向上を考えていく上で重要な知見の一つになりうると期待できる。

第 3 章では、一般的な細菌叢解析方法である 16S rRNA 遺伝子を標的とした解析に加え、研究室で独自に技術開発してきたシングルセルゲノム解析も行うことにより、イヌリンの腸内細菌叢に与える影響をマウスモデルにより詳細に評価した。シングルセルゲノム解析により個々の全ゲノム情報を取得することで、細菌種とゲノム情報に基づいた機能の紐づけが可能となり、株レベルでの詳細な解析が可能となる。実験は、マウスにコントロール群としたセルロース食 (普通食に 5%セルロース添加) とイヌリン食 (普通食に 5%イヌリン添加) を 2 週間摂取させ、腸内細菌叢と SCFAs を解析した。また、時間栄養学的な視点から、給餌は、朝食、夕食群を設けた。具体的には、腸内細菌叢データは、糞便から抽出した DNA を用いた 16S 解析と細胞を回収してマイクロデバイス上で作成したマイクロドロップレットに封入し、溶菌、ゲノム増幅後、増幅が確認されたドロップレットを回収しゲノムシーケンスを行った。また、SCFAs の濃度測定は、盲腸内容物を用いてを行った。結果、給餌タイミングの影響は必ずしも顕著に表れることはなかったが、イヌリン給餌によって *Bacteroides* 種が有意に増加した。次に、*Bacteroides* のシングルセルゲノムを取得した。その結果、イヌリン給餌により有意に増加した *Bacteroides* 属のレスポonder株には、イヌリンを利用することができる遺伝子クラスターを保持していることが示された。一方非レスポonder *Bacteroides* 株では、イヌリン利用に必要な遺伝子クラスターの一部が欠損しているか、もしくはタンパク質の相同性が低くその機能は低いと推測された。加えて、イヌリン食群で有意に増加した SCFAs の酪酸とコハク酸の代謝経路もレスポonder株で確認できた。シングルセルゲノム解析技術を用いたことで、従来の 16S 解析のみでは取得できなかった株レベルでの機能的解析も可能となった。これらの結果より、シングルセルゲノム解析から得られた全ゲノム情報より、特定の食事成分を効率的に利用できるレスポonder株もしくは利用できない非レスポonder

一株の判定が可能になったことから、将来的には腸内細菌叢の精度の高いパネル作成が可能となり、個別化診断へとつながることが期待される。

第4章では、食事と腸内細菌叢、そしてそれらの宿主への影響を評価した。そのために腸管免疫の重要な機能である、Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 免疫機能に着目した。AhRは環境中有害物質のダイオキシンなどの異物に対する応答だけでなく、様々な生理的作用に寄与していることもわかっている。このようなAhRの詳細な機構が明らかになれば、AhRと結合する化学物質の自己免疫疾患やその他様々な疾患の治療に役立てることができる。特に腸管内では免疫細胞の活性化因子として機能していることが分かっており、腸内細菌との相互作用の解明について近年着目されている。そこで本研究では、AhRの食事由来のリガンドであるIndole-3-cabinol (I3C)とAhRの関係性を、腸内細菌叢解析を介して解明した。研究手法として、マウスを用いてコントロール食とI3C食の群を設定し、4週間摂取させ、腸内細菌叢データの取得を行った。また使用したマウスモデルは、WTと、AhRやAhR repressor (AhRR)のノックアウトマウスを用いて、genotypeの違いによる影響も観察した。その結果、I3C食を摂取させた群では、コントロール食群に比べて*Enterococcus*の細菌種増加が有意に抑制された。また、genotypeによる菌叢変動も確認され、AhR-AhRR免疫機能と腸内細菌叢の関連が示唆された。本結果は、未だ知見の少ない、食事成分-腸内細菌叢と宿主の免疫機能の関連性を示唆した重要な知見になりうると期待できる。

第5章では、研究全体の総括と今後の展望について記載した。本研究では、ヒトやマウスモデルを用いて、食物繊維イヌリンの腸内細菌叢や宿主への影響を確認した。これらの結果から、本研究結果はレスポonder・ノンレスポonder判定手法への一つの有益な知見を示すことができた。特に、シングルセルゲノム解析という新しい技術を活用した解析結果により同族同種内でのゲノム多型を高精度で見出すことが可能となったことから、個の腸内細菌叢の詳細なパネル化が可能であり、腸内細菌叢解析を介した個別化医療などに発展できると考えられる。また、最終章では、免疫学的観点から、食事-腸内細菌叢-宿主の関係性を観察した。この分野では、腸内細菌叢が宿主の免疫機能にどのように寄与しているのか詳細な知見が未だ少ない。そのため、本研究結果が免疫学的分野での有益な知見になりうると期待できる。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

(List of research achievements for application of doctorate (Dr. of Engineering), Waseda University)

氏名 千々岩 樹佳 印

(As of May, 2020)

種 類 別 (By Type)	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む) (theme, journal name, date & year of publication, name of authors inc. yourself)
論文 ○ ○ 講演	<p>1. Single-cell genomics of uncultured bacteria reveals dietary fiber responders in the mouse gut microbiota, <i>Microbiome.</i>, 2020, Vol.8(1), Article number: 5, Rieka Chijiwa*, Masahito Hosokawa*, Masato Kogawa, Yohei Nishikawa, Keigo Ide, Chikako Sakanashi, Kai Takahashi and Haruko Takeyama. (*: Equally contributed)</p> <p>2. Dietary AhR ligands regulate AhRR expression in intestinal immune cells and intestinal microbiota composition, <i>International journal of Molecular Sciences.</i>, 2020, 21, 3189, Oliver Schanz*, Rieka Chijiwa*, Sevgi Can Cengiz, Yasmin Majlesain, Heike Weighardt, Haruko Takeyama, Irmgard Förster. (*: Equally contributed)</p> <p>1. 千々岩 樹佳, 微生物シングルセルゲノミクスを用いたイヌリン摂食によるマウス腸内の菌叢変動に関する時間栄養学的解析, 日本農芸化学会, 2019年, 東京, 口頭</p> <p>2. 千々岩 樹佳, 時間栄養学的解析による水溶性食物繊維イヌリンのマウス腸内細菌叢に及ぼす影響, 日本農芸化学会, 2018年, 愛知, 口頭</p> <p>3. 千々岩 樹佳, 水溶性食物繊維イヌリンのマウス腸内細菌叢に及ぼす影響の時間栄養学的解析, 第69回日本生物工学会大会, 2017年, 東京, ポスター</p> <p>4. 千々岩 樹佳, マウス腸内環境に与える水溶性食物繊維イヌリンの効果の時間栄養学的解析, 第11回バイオ関連化学シンポジウム, 2017年, 東京, ポスター</p> <p>5. 千々岩 樹佳, マウス腸内環境に与える水溶性食物繊維イヌリンの時間栄養学的解析, 第4回時間栄養科学研究会, 2017年, 愛知, ポスター</p> <p>6. Rieka Chijiwa, 16S metagenomics sequencing of microbes in Marine Red Alga, <i>Pyropia yezoensis</i>, Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 2017, 2017年, ホノルル (USA), Oral</p> <p>7. 千々岩 樹佳, ショウジョウバエ腸内における蛍光タンパク質安定発現株の局在観察, 第67回日本生物工学会大会, 2015年, 鹿児島, ポスター</p> <p>8. 千々岩 樹佳, ショウジョウバエ腸内における蛍光タンパク質安定発現株を用いた局所の観察, 第3回日本生物工学会東日本支部コロキウム, 2015年, 東京, ポスター</p>