

Title	腸内細菌叢研究におけるメタボローム解析技術の貢献
Sub Title	Contribution of metabolomics technology to gut microbiota research
Author	福田, 真嗣(Fukuda, Shinji)
Publisher	慶應SFC学会
Publication year	2023
Jtitle	Keio SFC journal Vol.22, No.2 (2022. ) ,p.216- 232
JaLC DOI	10.14991/003.00220002-0216
Abstract	ヒトの腸管内には多種多様な腸内細菌が生息しており、それら腸内細菌叢は宿主細胞と相互作用することで複雑な腸内生態系、すなわち腸内エコシステムを形成している。腸内エコシステムの恒常性を維持することがヒトの健康維持に寄与することが明らかになりつつあり、腸内エコシステムのバランスが乱れると、炎症性腸疾患や大腸がんといった腸管関連疾患のみならず、アレルギーや代謝疾患といった全身性疾患につながることも報告されている。腸内細菌叢と宿主細胞とのやりとりを理解するためのアプローチとして、腸内細菌叢の遺伝子を網羅的に解析するメタゲノム解析が主流であるが、これに加えて、腸内細菌叢の機能を反映する代謝物質を網羅的に解析するメタボローム解析の本研究分野における役割は大きい。さらに両解析により得られたデータを情報・数理科学的に統合解析するメタボロゲノミクスアプローチにより、腸内エコシステムが宿主の恒常性維持や疾患発症にどのように影響しているのかについて、その全容が解明されつつある。本稿では、腸内細菌叢研究分野におけるメタボローム解析技術の貢献と、メタボロゲノミクスによる腸内細菌叢の全容理解に向けた近年の取り組みについて紹介する。
Notes	特集 SFCバイオの軌跡 第4章 IABから羽ばたくバイオサイエンス 招待論文：総説・レビュー論文
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AA11671240-00220002-0216">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AA11671240-00220002-0216</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

[招待論文：総説・レビュー論文]

# 腸内細菌叢研究におけるメタボローム解析技術の貢献

## Contribution of Metabolomics Technology to Gut Microbiota Research

福田 真嗣

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科特任教授

株式会社メタジェン代表取締役社長 CEO

Shinji Fukuda

Project Professor, Graduate School of Media and Governance, Keio University

CEO, Metagen, Inc.

Correspondence to: sfukuda@sfc.keio.ac.jp

**Abstract:** ヒトの腸管内には多種多様な腸内細菌が生息しており、それら腸内細菌叢は宿主細胞と相互作用することで複雑な腸内生態系、すなわち腸内エコシステムを形成している。腸内エコシステムの恒常性を維持することがヒトの健康維持に寄与することが明らかになりつつあり、腸内エコシステムのバランスが乱れると、炎症性腸疾患や大腸がんといった腸管関連疾患のみならず、アレルギーや代謝疾患といった全身性疾患につながることも報告されている。腸内細菌叢と宿主細胞とのやりとりを理解するためのアプローチとして、腸内細菌叢の遺伝子を網羅的に解析するメタゲノム解析が主流であるが、これに加えて、腸内細菌叢の機能を反映する代謝物質を網羅的に解析するメタボローム解析の本研究分野における役割は大きい。さらに両解析により得られたデータを情報・数理科学的に統合解析するメタボロゲノミクスアプローチにより、腸内エコシステムが宿主の恒常性維持や疾患発症にどのように影響しているのかについて、その全容が解明されつつある。本稿では、腸内細菌叢研究分野におけるメタボローム解析技術の貢献と、メタボロゲノミクスによる腸内細菌叢の全容理解に向けた近年の取り組みについて紹介する。

The human intestinal tract has a wide variety of gut microbiota, which interact with host cells to form a complex intestinal ecosystem. It is becoming clear that maintaining the homeostasis of the intestinal ecosystem contributes to the maintenance of human health. It has been reported that disruption of the intestinal ecosystem can lead to not only intestinal-related disorders such as inflammatory bowel disease and colorectal cancer, but also systemic diseases such as allergies and metabolic disorders. Metagenomic analysis, which comprehensively analyzes the genes of the gut microbiota, is the mainstream approach to understanding

the interaction between the gut microbiota and host cells, but in addition to this, metabolome analysis, which comprehensively analyzes metabolites that reflect the function of the gut microbiota, plays a significant role in this research field. Furthermore, metabolome approaches that integrate data obtained from both analyses based on bioinformatics and mathematical analysis are beginning to elucidate the full extent of how the intestinal ecosystem influences host homeostasis and disease development. In this paper, I would like to introduce the contributions of metabolome technologies in the field of gut microbiota research and recent efforts toward a full understanding of the gut microbiota by metabologenomics.

Keywords: 腸内細菌叢、メタボロゲノミクス、宿主-微生物間相互作用  
gut microbiota, metabologenomics, host-microbial crosstalk

## はじめに

地球環境上の様々な場所に微生物が生息しており、それらは相互にやりとりをすることで複雑な微生物生態系を構築している。われわれの体表面にも微生物生態系が存在し、特に口腔内や腸管内といった「内なる外」である消化管内には多数の細菌が生息している<sup>1)</sup>。ヒトの腸管内には、およそ1,000種類で38兆個にも及ぶ腸内細菌が生息していると見積もられており<sup>2)</sup>、この数はわれわれの身体を構成するおよそ30兆個の体細胞数よりも多い<sup>3)</sup>。このことから、ノーベル生理学・医学賞受賞者である米国のJoshua Lederberg博士は、「宿主とその共生微生物はお互いの遺伝情報が入り組んだ集合体“superorganism”である」と提唱している<sup>4)</sup>。腸内細菌の集団を腸内細菌叢と呼ぶが、これらが宿主の腸管細胞と代謝物質などを介して密接に相互作用することで、腸管内における複雑な生態系、すなわち「腸内エコシステム」を形成している(図1)<sup>5)</sup>。腸内エコシステムは異種細胞間の絶妙なバランスのもとにその恒常性を維持しているが、外部からの刺激やストレス、あるいは宿主老化などによりそのバランスが崩れると、最終的には粘膜免疫系や神経系、内分泌系などの過剰変動に起因すると考えられる炎症性腸疾患や大腸がんといった腸そのものの疾患のみならず、代謝疾患や自己免疫疾患、さらには精神疾患や脳疾患といった全身性疾患につながる事が報告されている<sup>6)</sup>。したがって、腸内エコシステムの破綻に起因するこれらの疾患を正しく理解し制御するためには、その構成要素の1つである腸内細菌叢の機能について深

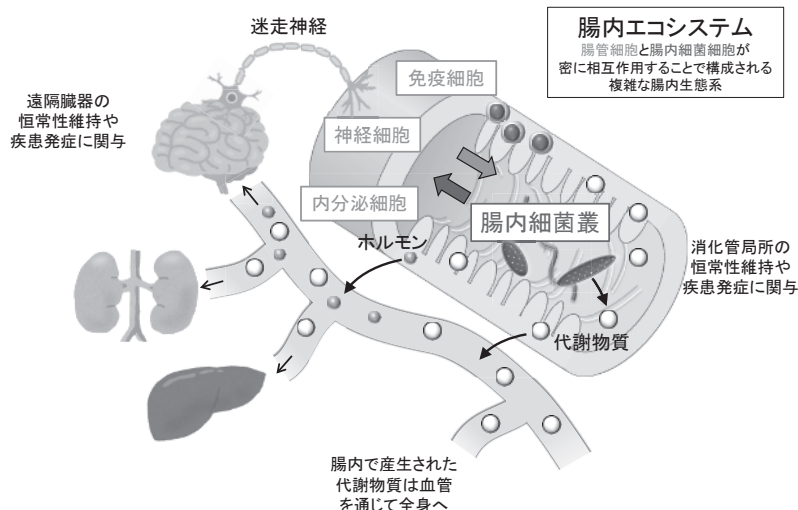


図1 腸内エコシステムによる生体の恒常性維持とその破綻による疾患発症

腸内細菌叢が粘膜の免疫細胞や神経細胞、内分泌細胞などと密接に相互作用することで、複雑だが洗練された腸内エコシステムを形成している(右)。腸内細菌という異種生物と宿主腸管との相互作用により生体恒常性が維持される。一方、そのバランスが崩れると大腸炎や大腸がんといった腸管関連疾患のみならず、アレルギーや代謝疾患などの全身性疾患の発症につながる(左)(参考文献5)より改変して転載。

く知る必要がある。

腸内細菌叢研究において、古くは培養法と呼ばれる手法を用いて腸内細菌を様々な培地で分離・培養し、その生化学的性状から分離された菌を特徴づける分類学の研究が主であったが、難培養性細菌の存在も認識されており、培養法のみでは腸内細菌叢の全体像を把握することは困難であった。ところが、近年の遺伝子解析技術の進展により、腸内細菌叢をゲノムレベルで網羅的に解析するメタゲノム解析が主流となることで、難培養性細菌も含めて遺伝子レベルで腸内細菌叢の全体像を把握することが可能となった。腸内細菌叢のメタゲノム解析は、複雑な腸内細菌叢のいわば白地図を作るようなものであるが、腸内細菌叢のどの遺伝子が機能的に作用しているのかについてはメタトランスクリプトーム解析などを並行して実施する必要がある。さらに、腸内細菌叢遺伝子が機能的に作用した結果として変化する代謝物質の情報を

メタボローム解析により網羅的に調べることで、腸内細菌叢と宿主との相互作用に関する情報を得ることが出来る。本稿では、腸内エコシステムの恒常性維持機構や、その破綻に伴う腸管関連疾患や全身性疾患について、腸内代謝物情報からその機能理解を目指すメタボローム解析の本研究分野における貢献について紹介するとともに、メタボロミクスとメタゲノミクスを組み合わせることで、腸管内を含む生体内の代謝物情報と腸内細菌叢の遺伝子地図とを関連させて、包括的に腸内細菌叢の機能理解を目指すメタボロゲノミクスの有用性についても考察する。

## 1 腸内エコシステムのバランス破綻がもたらす腸管関連疾患とメタボローム解析

腸内エコシステムのバランス破綻が腸管関連疾患につながる事が複数報告されている<sup>7)</sup>。宿主のゲノム異常と腸内細菌叢の乱れがその素因になると考えられている炎症性腸疾患 (IBD) では、宿主側の遺伝的素因としてこれまでに複数の一塩基多型が報告されている<sup>8)</sup>。しかしながら、マウスモデルにおいて宿主の遺伝子異常のみでは腸炎は自然発症しないことから、腸内細菌叢の乱れやウイルス感染などの環境要因の関与が示唆されている。事実、IBD 患者の腸内細菌叢はその多様性が低下しており、逆にバクテリオファージの多様性が増加していることが報告されている<sup>9)</sup>。健常者と IBD 患者の腸内環境についても解析されており、IBD 患者では主要な腸内細菌群の1つである Clostridiales 目細菌群が減少していることが示唆されている<sup>10), 11)</sup>。Clostridiales 目細菌群は腸管粘膜において、免疫応答の抑制に寄与する制御性 T 細胞 (T<sub>reg</sub> 細胞) の分化誘導を促すことが報告されていたが<sup>12), 13)</sup>、腸内細菌叢由来代謝物質のメタボローム解析により、Clostridiales 目細菌群が食物繊維の発酵代謝により産生する短鎖脂肪酸の一種である酪酸が、T<sub>reg</sub> 細胞の分化誘導をエピジェネティックに促進することが明らかとなった<sup>14)</sup>。他にも、IBD の一種であるクローン病患者の腸内からは、口腔内細菌の一種である *Klebsiella pneumoniae* が検出されることが報告されている<sup>15)</sup>。無菌マウスを用いた解析から、本菌はインターフェロン $\gamma$ を産生するヘルパー T 細胞 (T<sub>H</sub>1 細胞) への分化誘導を促進することが明らかとなった。IL-10 欠損マウスを用

いた解析から、本菌種の腸内への定着により  $T_H1$  細胞の分化誘導を介した大腸炎が生じたことから、Clostridiales 目細菌群の減少による  $T_{reg}$  細胞の減少と、*Klebsiella pneumoniae* による  $T_H1$  細胞の増加が、IBD 発症に関与する可能性が示唆された。

IBD の一種である潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis : UC) に対する細菌学的治療法として、便微生物叢移植療法 (Fecal Microbiota Transplantation : FMT) が注目を浴びている。FMT が注目されたきっかけは、2013 年に抗菌薬抵抗性の再発性クロストリジウム・ディフィシル感染症 (偽膜性大腸炎) に対する治療法として、ランダム化比較試験において約 90% の治癒率が認められたことである<sup>16)</sup>。UC に対する FMT の治療効果については、2015 年に 2 つのランダム化比較試験の結果が報告された。興味深いことに、この 2 つの臨床試験では結果が異なっており、カナダの Moayyedi らの報告では、FMT 群において UC の寛解率が有意に高いというものであったのに対し<sup>17)</sup>、オランダの Rossen らの報告では、UC に対する FMT の有意性は認められなかった<sup>18)</sup>。その後 Ishikawa らが、アモキシシリン・ホスホマイシン・メトロニダゾールの 3 剤混合抗菌薬 (AFM) を UC 患者が 2 週間内服した後に FMT を実施する A-FMT 法により、有効性を認めた<sup>19)</sup>。更に、主要な腸内細菌の一種であるバクテロイデス群の定着と治療効果との間に正の相関があることを明らかにした<sup>20)</sup>。加えて、患者の親や子供よりも、兄弟や姉妹、あるいは同世代の健常者便を用いて FMT を実施することで高い治療効果が得られることも明らかとなった<sup>21)</sup>。またオーストラリアの Paramosthy らは、3 ~ 7 名のドナー便を混合したマルチドナー便を用いた FMT を UC 患者に実施し、その有効性を認めた<sup>22)</sup>。このように UC に対する FMT についてはその有効性が一部ではあるものの認められ、その効果の分子機構については議論の余地は残されているが、腸内細菌叢の是正が UC 治療につながる可能性があると考えられる。

FMT の活用方法として、メラノーマ患者への免疫チェックポイント阻害薬治療についても報告がある。通常の抗がん剤の奏効率は約 5 ~ 10% であるのに対し、抗 PD-1 抗体などの免疫チェックポイント阻害薬は奏効率が 20 ~ 30% と、通常の抗がん剤と比べて奏効率は 2 倍以上であるものの、治療効果に個人差があることが知られている。これまでの腸内細菌叢研究で、免疫チ

チェックポイント阻害薬治療によりその効果が高い患者の腸内細菌叢の特徴として、細菌種の多様性が高いことや、*Bifidobacterium* 属菌および *Akkermansia* 属菌といった特定の腸内細菌が多いことが挙げられている<sup>23)-25)</sup>。またさらに、免疫チェックポイント阻害薬治療により効果が得られなかったメラノーマ患者に対して、治療効果が認められた患者の便をFMTにより移植することで、再度の免疫チェックポイント阻害薬治療により約3割の患者でその効果が得られるようになることも報告されている<sup>26), 27)</sup>。これらのFMT研究においてメタボローム解析は未実施であるため、FMTと免疫チェックポイント阻害薬治療効果における腸内代謝物質の役割について今後の研究が期待される。

一方、FMTの危険性について警鐘を鳴らすような報告もある。多剤耐性菌検査未実施のドナーからFMTを受けた患者が菌血症により死亡したケースが米国で1例報告された<sup>28)</sup>。難治性肝性脳症および移植片対宿主病(GVHD)患者へのFMT試験を実施したところ、各試験群で免疫不全状態であった患者が1名ずつ、計2名が菌血症となり、そのうち1名が死亡した。これらの患者の血中から基質特異性拡張型βラクタマーゼ(ESBL)産生大腸菌が検出されており、本試験においてドナー便の多剤耐性菌検査は未実施であった。ESBL大腸菌の健常者保有率は米国で約3%、日本においては15%であることから、健常者ドナー便における事前の多剤耐性菌検査の必要性が明らかとなった。米国食品医薬品局(FDA)は本事例を受け、少なくともESBL産生大腸菌やバンコマイシン耐性腸球菌、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の全てが陰性でなければ、FMTドナーとして適切でないとしている。

## 2 腸内エコシステムの破綻がもたらす全身性疾患とメタボローム解析

近年増加の一途をたどっている肥満や糖尿病、動脈硬化といった全身性の代謝疾患や、その患者数が成人の8人に1人とされている慢性腎臓病についても腸内エコシステムの乱れが深く関与していることが報告されている<sup>7), 29)</sup>。レプチン遺伝子に変異した肥満マウス(*ob/ob*マウス)の腸内細菌叢を、無菌環境下で飼育した無菌の野生型マウスに定着させると、野生型マウスの

腸内細菌叢を定着させた場合よりも有意に体重が増加することが明らかとなった<sup>30)</sup>。一方、*ob/ob* マウスに抗生物質を投与することで腸内細菌叢を除菌すると、抗生物質未処理の *ob/ob* マウスと比較して肝脂肪や血漿 LPS 濃度が低下し、肝臓のグリコーゲン量や血漿のアディポネクチン濃度が増加したことから、抗生物質による腸内細菌叢の除菌は *ob/ob* マウスの耐糖能の改善に効果があることが示唆された<sup>31)</sup>。欧米人の双子の腸内細菌叢を用いた研究も実施されており、双子のうち一方が肥満型、もう一方がやせ型のペアのヒト腸内細菌叢を無菌マウスにそれぞれ定着させて通常飼料で飼育した場合、マウスはそれぞれのドナーの体型を反映することが明らかとなった<sup>32)</sup>。興味深いことに、これらのマウスに低脂肪・高繊維食を与えた場合、やせ型腸内細菌叢を定着させたマウスはそのままの表現型だったが、肥満型腸内細菌叢を定着させたマウスはやせ型の腸内細菌叢に近づき、体型もやせる傾向にあることが明らかとなった<sup>32)</sup>。このことから、宿主の代謝表現型は腸内細菌叢と食事との組み合わせによって制御可能である可能性が示唆された。

この他にも、肥満モデルマウスの腸内細菌叢解析から、正常な腸内細菌叢と比べてその細菌数が 100 ~ 1000 分の 1 に減少している腸内細菌として *Akkermansia muciniphila* が報告されている<sup>33)</sup>。*A. muciniphila* をマウスに経口投与することで、肥満に伴って生じるインスリン抵抗性や脂肪の蓄積といったメタボリックシンドロームの症状を改善できることが示唆されたことから、本菌はヒトにおいても代謝疾患の予防や治療に有用な腸内細菌である可能性がある<sup>34)</sup>。ヒトの遺伝的素因に関連する腸内細菌と BMI 値との関係についての報告もあり、416 組の双子を含む 1,000 以上の便サンプルのメタゲノム解析から、Christensenellaceae 科細菌の存在量は二卵性双生児どうしと比べて一卵性双生児どうしで相関しており、またその存在量は低 BMI 値と正の相関があることが報告されている。実際に、無菌マウスを用いたヒト便移植試験から、Christensenellaceae 科細菌の定着が体重増加の抑止に寄与することが明らかとなった<sup>35)</sup>。中国人の 2 型糖尿病患者における腸内細菌叢のメタゲノム研究も報告されており、当該論文の著者らが確立した metagenome-wide association study (MGWAS) により対照群との比較解析から見いだした 50 個の腸内細菌マーカー遺伝子群に基づいて、2 型糖尿病発症リスクが判別可能



であることも報告されている<sup>36)</sup>。同様の2型糖尿病コホート研究がヨーロッパでも実施されており、興味深いことにヨーロッパ人の2型糖尿病発症リスク判別因子は、中国人のコホート研究で見いだした50個の腸内細菌マーカー遺伝子群とは異なっていた<sup>37)</sup>。このことから、腸内細菌叢プロファイルに基づく2型糖尿病発症リスクの予測モデルを構築するには、人種や年齢などの宿主因子や地域差といった環境要因も考慮する必要があることが示唆された。

食事内容の欧米化が生活習慣病のリスクを高めていることも以前より知られているが、レシチンなどの食事由来のコリンや赤身肉中に多く含まれるL-カルニチンを摂取すると腸内細菌によりトリメチルアミン(trimethylamine: TMA)に代謝され、消化管から吸収されたTMAがさらに肝臓でトリメチルアミン-N-オキシド(trimethylamine N-oxide: TMAO)に代謝されることで、アテローム性動脈硬化を促進することが、マウスを用いた実験やヒト血清のメタボローム解析より明らかとなっている<sup>38), 39)</sup>。興味深いことに、動脈硬化モデルマウスにおいて、腸内細菌によるTMA産生酵素を阻害する薬剤をマウスに経口投与することでその症状を抑制できたことから、腸内細菌叢を標的とした新たな創薬につながる可能性が示唆された<sup>40)</sup>。

また近年その使用が増加している人工甘味料が腸内環境に与える影響も検討されており、米国で用いられる人工甘味料であるサッカリンの摂取が腸内細菌叢の変化を介して耐糖能の悪化を招くことがマウスを用いた実験により報告されている<sup>41)</sup>。ヒトにおいては人工甘味料を長期的に摂取している人は血糖値が高い傾向があることが示唆されており、人工甘味料の摂取試験では、耐糖能が悪化する人(レスポnder)と、悪化しない人(非レスポnder)が存在し、その違いはもともとの腸内細菌叢プロファイルに起因することも明らかとなっている<sup>41)</sup>。食品添加物の一種である乳化剤の摂取についても腸内環境に与える影響が検討されており、マウスモデルにおいて乳化剤の摂取が腸内細菌叢の変化を介して大腸炎の発症を促すことや、肥満や血糖値上昇といったメタボリックシンドローム症状を引き起こすことも報告されている<sup>42)</sup>。

精神疾患の1つである自閉症スペクトラム障害の発症に腸内細菌叢の乱れが関与することも報告されている。妊娠マウスにpoly (I:C)を腹腔内投与し母体免疫を活性化することで、その産仔が自閉症様症状を呈するモデルマウ

スにおいて、腸内細菌叢の 16S rRNA 遺伝子群のメタゲノム解析および血清のメタボローム解析を行ったところ、仔マウスの腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) が腸管バリア機能の低下を招き、その結果腸内細菌叢から産生される尿毒症物質の 1 つである 4-ethylphenylsulfate が腸管内から血中に移行することで自閉症様症状を呈することが明らかとなった<sup>43)</sup>。このとき、腸管バリア機能を改善するような *Bacteroides fragilis* をプロバイオティクスのように投与すると血中の 4-ethylphenylsulfate 濃度が低下し、それに伴って自閉症様症状も改善されたことから、プロバイオティクス摂取による腸内エコシステムの改善が、自閉症治療のターゲットの 1 つとなる可能性が示唆された。

慢性腎臓病と腸内細菌叢との関連も報告されており、腸内細菌叢から産生される種々の尿毒症物質が慢性腎臓病の発症や増悪に関わる可能性が示唆されている<sup>44)</sup>。われわれは東北大学大学院医工学研究科の阿部高明教授らとの共同研究により、高アデニン食摂取による腎不全発症モデルマウスにおいて、体内に蓄積する尿毒症物質が宿主由来か食餌由来か腸内細菌叢由来かについて、メタボローム解析により明らかにした<sup>45)</sup>。また慢性便秘治療に用いられるルビプロストンの経口摂取により腸内環境を改善すると、腎不全の病態スコアも改善できることをメタボローム解析により明らかにした<sup>46)</sup>。腎不全発症による腸内細菌叢の乱れがルビプロストン摂取により改善され、その結果血中のインドキシル硫酸や馬尿酸といった腸内細菌叢由来の尿毒症物質濃度が低下したことが、腎不全病態スコアの改善につながったと考えられる。

自己免疫疾患の 1 つである多発性硬化症と腸内細菌叢との関係についても報告があり、多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) マウスに非吸収性の抗生物質を摂取させることで腸内細菌叢構成が変化し、その結果 EAE の臨床スコアが有意に低下することが報告されている<sup>47)</sup>。マウス腸管上皮には EAE を抑制するリンパ球が存在することが明らかとなっており、腸管粘膜におけるそれらのリンパ球の分化には、トリプトファン代謝物質であるアリール炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor : AhR) リガンドが重要であることもメタボローム解析により明らかにされた<sup>48)</sup>。同様に多発性硬化症患者の腸内細菌叢についても検討されており、腸内細菌叢の多様性は健常者と同程度

だったものの、患者内の腸内細菌叢のばらつきは、健常者のそれよりも大きかったことから、中程度の腸内細菌叢構造異常 (dysbiosis) が生じている可能性が示唆された<sup>49)</sup>。特にクロストリジウム属細菌群の中のクラスター IV や XIVa に属する細菌群が多発性硬化症患者群で減少しており、これらの腸内細菌は酪酸を産生することで  $T_{reg}$  細胞の分化誘導に関与することが明らかとなっていることから<sup>12), 50)</sup>、腸内細菌叢変化と病態発症との関連についてさらなる研究の進展が期待される。

### 3 メタボロゲノミクスアプローチ

宿主—腸内細菌叢間相互作用を正しく理解するためには、どのような腸内細菌が腸内に生息しているかといった腸内細菌叢の組成情報に加えて、それらがどのような代謝物質を産生しているのかについても知る必要がある。そこでわれわれは、同一個人から連続的かつ非侵襲的に採取した便検体について、便中代謝物質のメタボローム解析と便中細菌叢のメタゲノム解析を実施し、得られたデータを数理・情報学的に組み合わせることで網羅的に統合解析を行う「メタボロゲノミクス」を考案した(図2)<sup>51), 52)</sup>。本手法では、同一個体や同一被験者から複数回にわたって採取された便などの時系列サンプルを取得し、質量分析計によるメタボローム解析と次世代シーケンサーによる細菌叢解析を実施し、得られた代謝物質情報と、腸内細菌叢情報について、それぞれ独立の解析と両データの相関解析を行うことで、対象の腸内環境の特徴を明らかにする。代謝物質情報については、①主成分分析、②判別分析、③代謝経路解析を実施し、腸内細菌叢情報については、① UniFrac 解析、②判別分析、③ PICRUS<sub>t</sub> 解析(細菌叢組成に基づく遺伝子機能予測)を行うことで、それぞれの解析における腸内環境の特徴を見出す。さらに時系列を伴った腸内細菌叢情報と代謝物質情報の両方を用いることで、①プロクラステス解析、②相関解析、③ネットワーク解析等の統合解析を実施し、腸内細菌と代謝物質との関連を推測する。本手法により得られた候補代謝物質や腸内細菌種は、無菌動物やノトバイオ動物、さらには疾患モデル動物実験系を用いてその機能を検証することで、宿主—腸内細菌叢間相互作用の詳細を明らかにする手がかりを得ることができる。

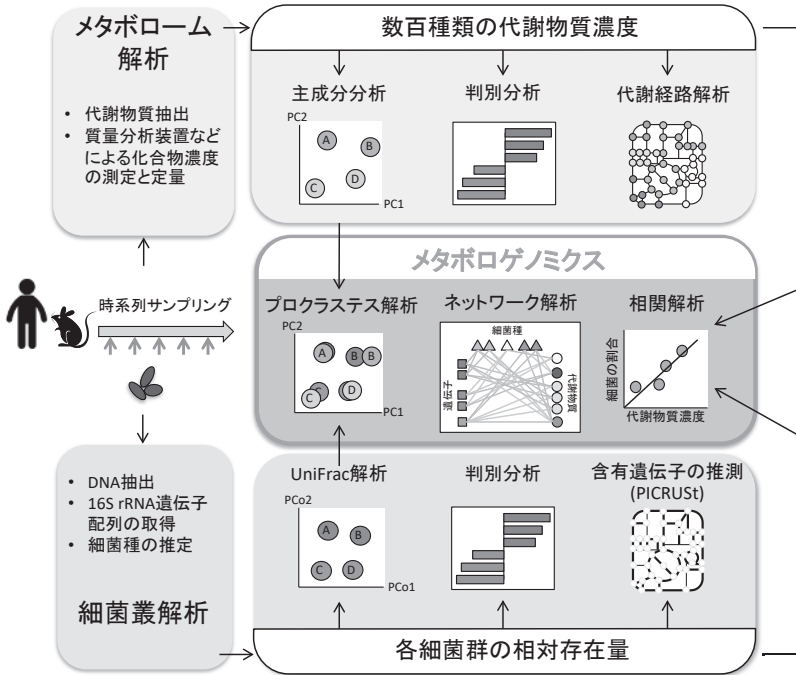


図2 メタロゲノミクスアプローチの概要

ヒトや動物の便を時系列サンプリングし、質量分析計による腸内代謝物質のメタボローム解析と、次世代シーケンサーによる腸内細菌叢のメタゲノム解析を実施し、各々の解析から得られたデータを数理・情報学的に統合解析を行うことで、腸内環境の詳細を把握する(参考文献51)よりCC-BYに基づき改変)。

#### 4 メタロゲノミクスアプローチにより明らかになった早期大腸がんマーカー

腸内細菌叢の乱れは上述のIBDのみならず、大腸がんなどをはじめとする様々な腸疾患の発症や増悪に関与することも報告されている。特に歯周病の原因菌として知られる *Fusobacterium nucleatum* が、大腸がん患者の便中に特徴的に多く検出されることがこれまでに報告されている<sup>52)-56)</sup>。大腸がんは、大腸ポリープ(腺腫)から粘膜内がんを経て進行がんへと進展する(多段階発がん)。これまで進行した大腸がんにおいて関連する細菌はいくつか特定されていたが、大腸ポリープ(腺腫)や粘膜内がんといった早期ステージで関連す

る細菌や代謝物質に関する報告は無かった。そこでわれわれは、大阪大学大学院医学系研究科／国立がん研究センター研究所の谷内田真一教授および東京工業大学生命理工学院の山田拓司准教授らと共に、大腸内視鏡検査を受診した616名の被験者を対象として、生活習慣アンケートや大腸内視鏡検査所見などの臨床情報とあわせて、内視鏡検査前の便を収集した。得られた便検体についてメタボロゲノミクスアプローチにより網羅的解析を実施したところ、大腸がんのステージによって便中の腸内細菌や代謝物質が大きく異なることが明らかとなった<sup>57)</sup>。特に大腸がんの多段階発がん過程において、大腸がんに関連する細菌の変動プロファイルが大きく2つに分けられることも明らかとなった。1つ目は、粘膜内がんのステージから検出され、病気の進行とともに増加するパターンであり、その多くは *F. nucleatum* や *Peptostreptococcus stomatis* など、既に進行大腸がんでは存在量が多いことが報告されている細菌種が含まれていた。2つ目のパターンは多発ポリープ(腺腫)や粘膜内がんのステージでのみ増加しているパターンで、*Atopobium parvulum* や *Actinomyces odontolyticus* が含まれていた。これらの結果から、大腸がんの発症初期やその進行にこれらの細菌群が関与する可能性が示唆された。

さらにメタボローム解析により、腸内細菌叢由来代謝物質を大腸がんのステージごとに解析した結果、多発ポリープ(腺腫)を有する患者では、二次胆汁酸の1つであるデオキシコール酸濃度が高いことが明らかとなった。また粘膜内がん患者では、健常者と比較してイソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニン、チロシン、グリシンなどのアミノ酸濃度が高いことが明らかとなった。一方、進行大腸がん患者では分枝鎖短鎖脂肪酸であるイソ吉草酸が高いことも明らかとなった。またさらに、これらの腸内環境の特徴は、大腸がんを切除することでその一部が健常者に近いプロファイルに変化することも明らかにされた<sup>58)</sup>。

これらの便中メタゲノムデータとメタボロームデータから、粘膜内がん患者を判別するための機械学習モデルを作成した。このモデルでは、患者の判別に *Desulfovibrio longreachensis* や *Solobacterium moorei* などの細菌、ロイシン、バリン、フェニルアラニンなどのアミノ酸、およびフェニルアラニンの合成に関与する遺伝子等が寄与していた。さらに、進行大腸がん患者を便で診断

するための機械学習モデルも作成し、このモデルでは、主に *Parvimonas micra*、*Peptostreptococcus stomatis*、*Fusobacterium nucleatum* や *Peptostreptococcus anaerobius* などの細菌の割合が進行がん判別に寄与することが明らかとなった。

本研究に加えてわれわれは同様に、胃がん患者の胃切除治療時の腸内環境についてメタボロゲノミクスアプローチによりその特徴解析を行った。その結果、胃切除治療後の患者の腸内環境は、大腸がん患者の腸内環境と類似した特徴を有するようになることが明らかとなった<sup>59)</sup>。胃がん患者は異時性大腸がん（原発がんの6か月以上後に発生する大腸がん）のリスクが高いことが報告されていることから、胃がん患者の胃切除後の腸内環境を定期的にモニターすることで、こういった異時性大腸がんの発症予防に貢献できる可能性が示唆された。

## おわりに

腸内細菌叢のバランスの乱れが、腸管関連疾患だけでなく全身性疾患につながるものが続々と報告されており、メタゲノム解析による腸内細菌叢の遺伝子情報のみならず、メタボローム解析による腸内細菌叢由来代謝物質の理解が、宿主-腸内細菌叢間相互作用を含む腸内エコシステム全体の機能理解につながると考えられる。また、腸内細菌叢をわれわれの体内における「もう一つの臓器」として包括的に理解することが、今後のヒト医学領域における疾患制御の新たな戦略として重要であると考えられる。しかし、腸内細菌叢の遺伝子情報は個々人で異なるように、その機能も個々人において異なると考えられることから、腸内エコシステムの機能を包括的に理解するためには、同一プラットフォームでの基盤情報の蓄積が必須である。そういった観点から、われわれが構築したメタボロゲノミクスによる個々人の腸内細菌叢遺伝子地図の取得ならびに遺伝子地図上への代謝物質情報の付与は、今後のデータ駆動型腸内環境研究には必須と考えられる。個々人の腸内細菌叢代謝マップを構築できれば、代謝工学理論に基づく腸内エコシステムの制御が可能になると考えられることから、腸内エコシステムの乱れが起因となるような疾患の予防や治療方法の確立など、メタボロゲノミクスを基盤

---

とした疾患制御の新たなパラダイムに期待したい。

## 謝辞

本総説をまとめるにあたり、最新のメタボローム解析基盤を提供していただいた慶應義塾大学先端生命科学研究所の富田勝所長、曾我朋義教授、平山明由准教授に感謝を申し上げます。また腸内細菌叢研究分野にメタボローム解析を適用するに際し、様々な困難を共に乗り越えてくれた慶應義塾大学先端生命科学研究所の石井千晴博士や常在菌研究グループメンバーにも感謝致します。特に富田所長には、2012年に慶應義塾大学先端生命科学研究所に私が着任するにあたり多大なるご支援をいただいたこと、また腸内細菌叢研究分野にメタボローム解析を適用し、本研究分野を切り拓くきっかけを作っていたことについて深くお礼を申し上げます。世界をリードするメタボローム解析基盤は慶應義塾大学先端生命科学研究所の強みの1つであるため、腸内細菌叢由来代謝物質の機能について解明し、本研究分野のさらなる発展につながるよう今後も努力したいと思います。様々な形でご支援をいただき本当にありがとうございました。

## 参考文献

- 1) 福田真嗣 (2016) 「腸内環境制御が切り拓く疾患予防・治療の新地平」『実験医学』 34, pp. 868-874.
- 2) J. Qin et al. (2010) “A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing”, *Nature*. 464, pp. 59-65.
- 3) R. Sender., S. Fuchs., R. Milo. (2016) “Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body”, *PLoS Biol.* 14, e1002533.
- 4) J. Lederberg. (2000) “Infectious history”, *Science*. 288, pp. 287-293.
- 5) 石井千晴、福田真嗣 (2019) 「メタボロゲノミクスが解き明かす腸内細菌叢由来代謝物質の機能」『医学のあゆみ』 270, pp. 387-393.
- 6) S. Fukuda., H. Ohno. (2014) “Gut microbiome and metabolic diseases”, *Seminars in immunopathology*. 36, pp. 103-114.
- 7) 福田真嗣 (2016) 「メタボロゲノミクスによる腸内エコシステムの理解と制御」『生化学』 88, pp. 61-70.
- 8) J. C. Barrett et al. (2008) “Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn’s disease”, *Nature Genetics*. 40, pp. 955-962.
- 9) J. M. Norman et al. (2015) “Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease”, *Cell*. 160, pp. 447-460.
- 10) D. N. Frank et al. (2007) “Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104, pp. 13780-13785.
- 11) H. Sokol et al. (2008) “Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105, pp. 16731-16736.
- 12) K. Atarashi et al. (2011) “Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species”, *Science*. 331, pp. 337-341.
- 13) S. Yoshimoto et al. (2013) “Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer

- through senescence secretome”, *Nature*. 499, pp. 97-101.
- 14) Y. Furusawa et al. (2013) “Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells”, *Nature*. 504, pp. 446-450.
  - 15) K. Atarashi et al. (2017) “Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation”, *Science*. 358, pp. 359-365.
  - 16) E. van Nood et al. (2013) “Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*”, *N Engl J Med*. 368, pp. 407-415.
  - 17) P. Moayyedi et al. (2015) “Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial”, *Gastroenterology*. 149, pp. 102-109 e106.
  - 18) N. G. Rossen et al. (2015) “Findings From a Randomized Controlled Trial of Fecal Transplantation for Patients With Ulcerative Colitis”, *Gastroenterology*. 149, pp. 110-118 e114.
  - 19) D. Ishikawa et al. (2017) “Changes in Intestinal Microbiota Following Combination Therapy with Fecal Microbial Transplantation and Antibiotics for Ulcerative Colitis”, *Inflamm Bowel Dis*. 23, pp. 116-125.
  - 20) D. Ishikawa et al. (2018) “The Microbial Composition of Bacteroidetes Species in Ulcerative Colitis Is Effectively Improved by Combination Therapy With Fecal Microbiota Transplantation and Antibiotics”, *Inflamm Bowel Dis*. 24, pp. 2590-2598.
  - 21) K. Okahara et al. (2020) “Matching between Donors and Ulcerative Colitis Patients Is Important for Long-Term Maintenance after Fecal Microbiota Transplantation”, *J Clin Med*. 9, 1650.
  - 22) S. Paramsothy et al. (2017) “Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial”, *Lancet*. 389, pp. 1218-1228.
  - 23) B. Routy et al. (2018) “Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors”, *Science*. 359, pp. 91-97.
  - 24) V. Gopalakrishnan et al. (2018) “Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients”, *Science*. 359, pp. 97-103.
  - 25) V. Matson et al. (2018) “The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients”, *Science*. 359, pp. 104-108.
  - 26) E. N. Baruch et al. (2021) “Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients”, *Science*. 371, pp. 602-609.
  - 27) D. Davar et al. (2021) “Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients”, *Science*. 371, pp. 595-602.
  - 28) Z. DeFilipp et al. (2019) “Drug-Resistant *E. coli* Bacteremia Transmitted by Fecal Microbiota Transplant”, *N Engl J Med*. 381, pp. 2043-2050.
  - 29) W. Aw., S. Fukuda. (2015) “Toward the comprehensive understanding of the gut ecosystem via metabolomics-based integrated omics approach”, *Seminars in immunopathology*. 37, pp. 5-16.
  - 30) P. J. Turnbaugh et al. (2006) “An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest”, *Nature*. 444, pp. 1027-1031.
  - 31) M. Membrez et al. (2008) “Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice”, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 22, pp. 2416-2426.
  - 32) V. K. Ridaura et al. (2013) “Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice”, *Science*. 341, 1241214.
-



- 33) A. Everard et al. (2011) "Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice", *Diabetes*. 60, pp. 2775-2786.
- 34) A. Everard et al. (2013) "Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110, pp. 9066-9071.
- 35) J. K. Goodrich et al. (2014) "Human genetics shape the gut microbiome", *Cell*. 159, pp. 789-799.
- 36) J. Qin et al. (2012) "A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes", *Nature*. 490, pp. 55-60.
- 37) F. H. Karlsson et al. (2013) "Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control", *Nature*. 498, pp. 99-103.
- 38) R. A. Koeth et al. (2013) "Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis", *Nature Medicine*. 19, pp. 576-585.
- 39) W. H. Tang et al. (2013) "Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk", *The New England journal of medicine*. 368, pp. 1575-1584.
- 40) Z. Wang et al. (2015) "Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis", *Cell*. 163, pp. 1585-1595.
- 41) J. Suez et al. (2014) "Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota", *Nature*. 514, pp. 181-186.
- 42) B. Chassaing et al. (2015) "Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome", *Nature*. 519, pp. 92-96.
- 43) E. Y. Hsiao et al. (2013) "Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders", *Cell*. 155, pp. 1451-1463.
- 44) P. A. Aronov et al. (2011) "Colonic contribution to uremic solutes", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 22, pp. 1769-1776.
- 45) E. Mishima et al. (2017) "Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by a CE-TOFMS-based metabolomics approach", *Kidney Int*. 92, pp. 634-645.
- 46) E. Mishima et al. (2015) "Alteration of the Intestinal Environment by Lubiprostone Is Associated with Amelioration of Adenine-Induced CKD", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 26, pp. 1787-1794.
- 47) H. Yokote et al. (2008) "NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora", *The American Journal of Pathology*. 173, pp. 1714-1723.
- 48) A. Kadowaki et al. (2016) "Gut environment-induced intraepithelial autoreactive CD4(+) T cells suppress central nervous system autoimmunity via LAG-3", *Nature Communications*. 7, 11639.
- 49) S. Miyake et al. (2015) "Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters", *PLoS One*. 10, e0137429.
- 50) K. Atarashi et al. (2013) "Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota", *Nature*. 500, pp. 232-236.
- 51) C. Ishii et al. (2018) "A Metabologenomic Approach Reveals Changes in the Intestinal Environment of Mice Fed on American Diet", *Int J Mol Sci*. 19, 4079.
- 52) 石井千晴、福田真嗣 (2020) 「メタボロゲノミクスが解き明かす腸内細菌叢の機能」『実験医学』 38, pp. 1306-1312.
- 53) M. Castellarin et al. (2012) "Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human

- colorectal carcinoma”, *Genome research*. 22, pp. 299-306.
- 54) A. D. Kostic et al. (2012) “Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma”, *Genome Research*. 22, pp. 292-298.
- 55) A. M. Thomas et al. (2019) “Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation”, *Nature Medicine*. 25, pp. 667-678.
- 56) J. Wirbel et al. (2019) “Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer”, *Nature Medicine*. 25, pp. 679-689.
- 57) S. Yachida et al. (2019) “Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer”, *Nature Medicine*. 25, pp. 968-976.
- 58) H. Shiroma et al. (2022) “Surgical Treatment for Colorectal Cancer Partially Restores Gut Microbiome and Metabolome Traits”, *mSystems*. 7, e0001822.
- 59) P. P. Erawijantari et al. (2020) “Influence of gastrectomy for gastric cancer treatment on faecal microbiome and metabolome profiles”, *Gut*. 69, pp. 1404-1415.

[受付日 2022. 7. 27]