

令和元年度 博士学位論文

腸内共生系におけるムチンの  
内因性プレバイオティクスとしての役割の解明

【要約版】

講座名 生化学講座

指導教員 長谷耕二 教授

薬学研究科 薬科学専攻

81754031 山田恭央

## 目次

第1章 序論	2
第2章 実験材料と方法	4
第3章 結果	11
第4章 考察	16
第5章 参考文献	19
謝辞	28

## 第1章 序論

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC)やクローン病 (Crohn's disease: CD)などの炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD)は、遺伝的要因と環境要因の両方によって引き起こされる再発性の炎症性疾患である<sup>1,2</sup>。先行研究によって腸内細菌叢の組成異常、すなわち dysbiosis が IBD の病因および/または増悪に寄与することが示されてきた<sup>3,4</sup>。IBD 患者の腸内微生物叢の特徴としては、多様性の低下や Firmicutes 門細菌の減少と Proteobacteria 門細菌の増加が挙げられる<sup>3,5-8</sup>。これらの特徴は、特に CD 患者の腸内微生物叢で顕著であり、直腸粘膜細菌叢の dysbiosis の重症度は、疾患スコアとよく相関する<sup>5</sup>。UC 患者においては CD 患者ほど dysbiosis が顕著ではなく、微生物叢の変化と IBD の病態との関連は曖昧である<sup>6,8</sup>。動物実験において、腸内微生物叢が、腸関連リンパ組織の成熟、および T helper 17 (Th17)細胞と制御性 T 細胞 (regulatory T: Treg)細胞の分化を誘導することで、腸管免疫系の発達に寄与することが示されている<sup>9</sup>。対照的に、dysbiosis 下の腸内細菌叢は腸炎を誘導する<sup>10,11</sup>。同様に、CD 患者から *IL10* 欠損マウスへの微生物叢の移植は、大腸炎を促進することが報告されている<sup>12</sup>。しかし、dysbiosis が炎症を促進する根本的なメカニズムは未だ完全には解明されていない。

酢酸、プロピオン酸、酪酸といった短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acid: SCFA)は、腸内微生物叢が難消化性炭水化物 [可溶性食物繊維、オリゴ糖、難消化性澱粉 (resistant starch: RS)など]を発酵することにより産生される。ヒトでは結腸が、げっ歯類では盲腸が主な微生物発酵の場となっている<sup>13,14</sup>。SCFA は結腸上皮の重要なエネルギー源となるのみならず<sup>15</sup>、上皮バリア機能の増強や immunoglobulin A (IgA)応答の誘導をすることで、粘膜バリア機能を強化する<sup>16,17</sup>。さらに、酪酸は粘膜固有層のナイーブ T 細胞から Treg 細胞への分化を促進することで炎症を抑制する<sup>18,19</sup>。酪酸は、主に *Clostridium* cluster IV または XIVa に分類される細菌種によって産生される。IBD 患者では、*Faecalibacterium prausnitzii* (*Clostridium* cluster IV)および Lachnospiraceae (*Clostridium* cluster XIVa)を含む酪酸産生菌は、健康な被験者と比べて著しく減少する<sup>20,21</sup>。また、SCFA カクテルまたは酪酸の浣腸は、結腸粘膜の UC の炎症症状を効果的に軽減する<sup>22,23</sup>。これらの報告は、IBD 患者における酪酸産生の低下が腸炎を悪化させている可能性を示唆するものである。

杯細胞によるムチンの管腔内分泌は、物理化学的障壁として機能する粘液層バリアを形成し、上皮表面への微生物の付着を防ぐ<sup>24</sup>。腸管粘液層は主に MUC2 タンパク質で構成される。MUC2 タンパク質に大量に修飾された糖鎖は粘液に粘性をもたらし、細菌の運動性を制限する。特に粘液の内層はほぼ無菌的になっており、細菌侵入を防ぐ防壁となる<sup>25</sup>。一方、粘液の外層はムチンをエネルギー源として利用する細菌の生息地となっている<sup>26,27</sup>。Muc2 または糖鎖修飾を担う酵素の一種 C1glt1 の欠損マウスでは、粘液バリアの機能が低下することで粘膜固有層への細菌の移行が増加し、結腸の慢性炎症が起きる<sup>28,29</sup>。UC 患者の結腸粘液層は健康な被験者の結腸粘液よりもバリア機能が低下しており、同様の現象が起きていることが報告されている<sup>30</sup>。

以上の背景から dysbiosis によるムチンおよび SCFA 産生の異常は、IBD の発症に関係している可能性が考えられる。しかし、これらの現象の関連性は不明である。そこで本博士論文研究において、私は IBD 患者の腸内細菌叢、代謝物、ムチンの統合解析を実施した<sup>31</sup>。

## 第2章 実験材料と方法

### 2-1 検体の入手

有機酸濃度、細菌構成およびムチン成分を分析するために、日本の44人の健常者、40人のCD患者および49人のUC患者の糞便試料を、大阪大学病院の消化器内科で採取した (study 1)。その後、11人の健常者と10人のUC患者の糞便試料を集め、ムシナーゼ活性 (study 2)を分析した。栄養素摂取量を調査するために、食物摂取頻度アンケート<sup>32</sup>を用いた。患者は、世界保健機関および国際炎症性腸疾患研究会議によって提供された内視鏡的、放射線学的、組織学的および臨床的基準に基づいて、CDまたはUCと診断された<sup>33-35</sup>。疾患の臨床的活動性はUC臨床疾患活動性スコアおよびクローン病活動性指数により評価した<sup>36,37</sup>。内視鏡的疾患活動性を回結腸鏡検査により記録し、UCにおけるMattスコアおよびCDにおけるRutgeertスコアを用いて評価した。内視鏡的寛解はUCにおいてはMattスコア1、CDにおいてはRutgeertスコア0または1と定義された<sup>38,39</sup>。全参加者は本研究に関する口頭および書面の情報の説明を受けた後に、インフォームドコンセントに同意した。研究プロトコルは、被験者の参加に先立って、大阪大学医学部 (承認番号#13165-2)、東京大学医科学研究所 (#25-42-1122)、慶應義塾大学薬学部 (#150421-1)、静岡大学 (#14-11)および医薬基盤・健康・栄養研究所 (#72)における各研究倫理委員会により承認された。

### 2-2 メタ 16S リボソーム RNA 遺伝子配列解析

糞便試料約200 mgを0.1 mmジルコニア/シリカビーズ (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA)および3.0 mmジルコニアビーズ (Biomedical Sciences, Tokyo, Japan)を含む2 mLチューブに移した。QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)からInhibit EX bufferを加えた後、便サンプルをShake Master Neo (Biomedical Sciences)を用いて1,500 rpmで20分間ホモジナイズした。その後、説明書に従ってQIAamp Fast DNA Stool Mini Kitを用いゲノムDNAを抽出し、次いで、5 ng/ $\mu$ Lの10 mM Tris-HCl緩衝液に再懸濁した。続いてIllumina technical note<sup>40</sup>に従い、16S ribosomal RNA (rRNA)遺伝子領域の増幅ライブラリを調製した。各DNA試料をKAPA HiFi HS ReadyMix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA)および16S rRNA遺伝子の可変領域3および4に特異

的なプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR)によって増幅した。PCR 産物を、Agencourt AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)を用いて精製した後、Nextera XT index kit (Illumina, San Diego, CA, USA)を PCR によって付加した。Agencourt AMPure XP ビーズを用いてライブラリーをさらに精製し、10 mM Tris-HCl 緩衝液で 4 nM に希釈しプールした。プールされた試料は、MiSeq システム (illumina)2×300 塩基対プロトコルを用いてシーケンシングされた。本研究で分析した全配列は、受託番号 DRA006094 の下で DNA Data Bank of Japan/GenBank/European Molecular Biology Laboratory (EMBL)データベースに登録された。

得られたリードを元に細菌叢構成を解析した。QIIME<sup>41</sup> の `join_paired_ends.py` スクリプトによりペアエンドリードを結合した後、`cutadapt`<sup>42</sup> を使用してアダプター配列をトリミングした。続いて FASTQ ファイルを FASTA ファイルに変換し、`identify_chimeric_seqs.py` スクリプト (`usearch61`<sup>43</sup>メソッド)と `filter_fasta.py` スクリプトを用いてキメラ配列の除去を行った。次に、個々のサンプルの FASTA ファイルを1つの FASTA ファイルに結合し、`pick_open_reference_otus.py` スクリプトを用いて operational taxonomic unit (OTU)を検出した。各 OTU について RDP classifier と 97% identity Greengenes database ver. 13.8 を用いた `assign_taxonomy.py` スクリプトにより系統分類に割り当てた。その後、`make_otu_table.py` スクリプトを使用して OTU テーブルを作成した。`filter_otus_from_otu_table.py` スクリプトを使用して、0.5%未満の OTU を削除した後、`core_diversity_analyses.py` スクリプトを使用して1検体当たり 10,000 リード中の多様性分析を実行した。ヒト糞便中細菌叢を解析する際には、GLSEARCH プログラムを用いた、16S rRNA 遺伝子領域データベース (RDP ver. 10.27; CORE update September 2, 2012) および NCBI ゲノムデータベースに対する類似性検索により、各 OTU に分類群を割り当てた<sup>44</sup>。門、綱、属、種レベルの割り当てを、それぞれ 70、90、94 および 97%類似性を閾値として行った。マウスの盲腸微生物叢を解析する際には、上述のデータベース中のどの種とも配列相同性を欠く OTU が多く存在したため、97% identity Greengenes データベース ver. 13.8 を用いて行った。細菌叢の多様性分析は R の Vegan パッケージ<sup>45</sup>を用いて行った。細菌叢の表現型解析は BugBase<sup>46</sup>を用いてデフォルトパラメータにて予測した。

### 2-3 有機酸分析

ヒトの糞便とラット盲腸内容物中の有機酸 (ギ酸、酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、酪酸、イソ吉草酸、吉草酸、コハク酸、乳酸)の濃度を Shim-pack SCR-102H カラム (内径 8mm、長さ 30 cm; Shimadzu, Kyoto, Japan) および電気伝導度検出器 (CDD-6A; Shimadzu) を備えた高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography: HPLC) システム (LC-6A; Shimadzu) を用いた内部標準法に基づいて測定した。ヒト糞便試料約 200 mg またはラット盲腸内容物 300 mg を、内部標準として 0.5 g/L クロトン酸を含有する 10 mmol/L 水酸化ナトリウム溶液 2 mL 中で懸濁し、遠心分離した (10,000 × g, 15 min)。これにより得られた上清を HPLC 分析した。

マウス盲腸内容物中の有機酸濃度は Moreau らの改良法<sup>47</sup>に従って、HP-5 キャピラリーカラム (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) を備えた JMS-Q1500GC GC-MS システム (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) にて測定した。約 50 mg のマウス盲腸内容物を 9 倍量の H<sub>2</sub>O (w/w) 中に懸濁した。遠心分離 (10,000 × g, 15 min) の後、上清 200 μL に内部標準としての 10 μL の 1 mM 2-エチル酪酸、および除タンパクのための 20 μL の 20% (w/v) 5-スルホサリチル酸溶液を添加した。遠心分離 (10,000 × g, 15 min) の後、200 μL の上清を 10 μL の 37% HCl を用いて酸性化し、有機酸を 1 mL のジエチルエーテルによる抽出を 2 回行うことによって単離した。次に、500 μL の有機上清を新しいガラス製バイアル中で 50 μL の *N*-tert-butyltrimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamide (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) と混合し、室温で 24 時間インキュベートして誘導体化を行った。誘導体化試料は、上述のガスクロマトグラフィー-質量分析計にて解析された。純ヘリウム (99.9999%) をキャリアガスとして使用し、1.2 mL/分の流量で送達した。温度プログラムは、60°C (3 min)、60–120°C (5°C/min)、120–290°C (20°C/min)、および 290°C (3 min) を用いた。ピーク面積を標準物質のピーク面積と比較することで有機酸濃度を決定した。酢酸は Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan) から、プロピオン酸、酪酸、コハク酸および乳酸は Wako (Osaka, Japan) から、イソ酪酸、イソ吉草酸および吉草酸は Kanto Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から入手した。

## 2-4 ムチン成分の分析

ムチン画分は Tanabe らの手法<sup>48</sup>に則り単離した。その後 Bovee-Oudenhoven らの手法<sup>49</sup>に従い *O* 結合型糖鎖を分析した。具体的には約 20 mg のムチン画分を完全に乾燥し、200 mL の 4 mol/L HCl に再懸濁し、次いで加熱ブロック中で 100°C にて 4 時間加水分解を行った。これにより遊離したオリゴ糖鎖量を *N*-アセチルガラクトサミン (Sigma Aldrich) の標準溶液を用いて算出した。ムチン画分中の硫酸量は Harrison と Packer の方法<sup>50</sup>に則り、陰イオン混合標準液 (Wako) を標準として用いて測定した。シアル酸量は、Ogata らの手法<sup>51</sup>に則り測定した。簡潔に述べると、ムチン画分を 50 mM HCl 中、80°C で 1 時間加水分解し、放出された *N*-アセチルノイラミン酸 (*N*-acetylneuraminic acid: NeuAc) および *N*-グリコリルノイラミン酸 (*N*-glycolylneuraminic acid: NeuGc) を、12-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン (1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene: DMB; Takara, Shiga, Japan) で標識した。DMB 標識シアル酸は、TSK-ODS80Ts カラム (Tosoh, Tokyo, Japan) および蛍光検出器 (RF-10AXL; Shimadzu) を備えた HPLC により分析した。

## 2-5 ムチン混餌飼料の調製

半精製ブタ胃ムチン (Sigma Aldrich) をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline: PBS) に懸濁し、汚染物を除去するために濾過した。ろ液にエタノールを加え、60% EtOH (w/w) 溶液とした後、-30°C でムチンを沈殿させ、遠心分離によって回収した。この処理を 2 回繰り返すことで、ムチンをさらに精製した。精製ムチンをコーンスターチの代替として AIN-76 配合飼料に添加した。

## 2-6 動物実験

全ての動物実験は慶應義塾大学と静岡大学の動物利用委員会によって承認されたプロトコールに従って実施した。ラットとマウスは、それぞれ静岡大学と慶應義塾大学の実験動物のガイドラインに従って維持した。雄性 Wister ラットは Shizuoka Laboratory Animal Center (Shizuoka, Japan) から、C57BL/6J 雄性マウスは CLEA Japan (Tokyo, Japan) から購入した。ラットには AIN-76 飼料を 3 日間与え、次いでムチン含有飼料または



AIN-76 飼料のいずれかを2週間与えた。マウスには AIN-93G 飼料 (Oriental Yeast, Tokyo, Japan)を7日間与え、次いでムチン含有飼料または AIN-76 飼料のいずれかを3週間与えた。

## 2-7 ムシナーゼ活性の評価

Komura らの手法<sup>52</sup>に則りムシナーゼ活性を分析した。糞便試料を酢酸緩衝液 (pH 5.5) と 1:400 (w/v)の比率で混合し、ブタ胃ムチンを基質としてムシナーゼ活性の評価に用いた。糞便のムシナーゼ活性は、糞便の重量または糞便中に含まれるタンパク質当たり、そして1分間当たりの遊離糖量として表した。

## 2-8 *in vitro* 発酵試験

Han らの文献に記載された *in vitro* 発酵システム<sup>53</sup>を用い、腸内細菌によるムチン由来代謝物を解析した。AIN-93G 飼料を7日間与えたラットから得た盲腸内容物を生理食塩水で50倍希釈 (w/v)した。次に、盲腸内容物の希釈液 110 mL を、嫌気条件下 37°C の Jar fermenter 中で穏やかに攪拌し、pH 制御 (pH > 5.2)条件下で培養した。一晩プレインキュベーションした後、3.3 g のブタ胃ムチンを培養物に添加した。有機酸含量をモニターするために、各試料 4 mL をムチン補充後 0、24、および 48 時間に採取した。

## 2-9 粘膜固有層中細胞の調製

大腸リンパ球を Weigmann らの方法<sup>54</sup>に従って調製した。大腸組織を 1 mM dithiothreitol および 20 mM EDTA (Nakarai Tesque)を含有する Hank's Balanced Salt Solution (Nakarai Tesque)で、37°Cで20分間処理した。次いで、組織を細かく切り、0.5 mg/mL コラゲナーゼ (Wako)、0.5 mg/mL DNase I (Merck, Darmstadt, Germany)、2%ウシ胎児血清 (fatal calf serum: FCS; MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、および 12.5 mM HEPES (pH 7.2)を含む RPMI-1640 培地 (Nakarai Tesque)を用いて 37°Cで30分間分離し、単一細胞懸濁液を得た。懸濁液を濾過し、RPMI1640 中の 2% FCS で洗浄し、40%/80% Percoll 勾配を用いて分離した。

## 2-10 フローサイトメトリー

細胞染色は Suzuki らの手法<sup>55</sup>に則り行われた。大腸リンパ球を抗マウス CD16/CD32 抗体 (93; BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA)を含む 2% FCS/PBS でブロッキングした後、以下の抗体により染色した。anti-CD45R/B220 (RA3-6B2)、anti-IgA (C10-3)、anti-ROR $\gamma$ t (Q31-378)、および anti-CD3e (145-2C11)抗体を BD Biosciences (San Jose, CA, USA)、anti-CD3 (17A2)および anti-CD45R/B220 (RA3)抗体は、Tonbo Biosciences (San Diego, CA, USA)、anti-CD45 (30-F11)抗体を BioLegend、anti-Foxp3 (FJK-16s)および anti-CD4 (RM4-5)抗体を Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)から入手した。7-Aminoactinomycin D (BioLegend)を細胞懸濁液に添加して、死細胞を標識した。細胞内 Foxp3 および ROR $\gamma$ t を検出するために、細胞を表面抗原について染色した後、Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific)を用いて固定・透過処理した。次いで、透過細胞を anti-Foxp3 および anti-ROR $\gamma$ t 抗体で染色した。死細胞は細胞内染色のために Fixable Viability Stain 780 (BD Biosciences)を用いて検出した。染色された細胞は、LSR II フローサイトメーター (BD Biosciences)および FlowJo ソフトウェア ver. 10.4.2 (BD Biosciences)を用いて解析した。

## 2-11 統計処理

有機酸およびムチン成分の濃度を分析するために、2 つ以上の群間の差をそれぞれ Student *t* 検定または分散分析と Tukey の多重比較検定によって分析した。分散が均一でない場合、データは Wilcoxon の順位和検定、または Kruskal-Wallis 検定、続いて Dunn の多重比較検定により分析した。すべての相関分析結果を、Spearman の相関検定の後に R の multtest パッケージ<sup>56</sup>により Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR)補正をした。細菌分類群の存在量の比較は、デフォルトのパラメーターを用いた LEfSe<sup>57</sup>によって、または Kruskal-Wallis 検定に続く Dunn の複数比較検定によって行った。LEfSe を用いて同定した各群のバイオマーカーは GraPhlAn<sup>58</sup>を用いて系統樹上に注釈付けした。LEfSe 以外の統計検定は R ver. 3.3.0 で行われた。相関ネットワークの視覚化は Cytoscape

3.3.0 を用いて行われた。被験者数は入手可能な患者又は動物数に基づいて決定した。  
この試験は無作為化されておらず、研究者らは盲検化されていなかった。

## 第3章 結果

### 3-1 IBD 患者における糞便中酪酸濃度の減少

IBD 患者における腸内微生物叢の代謝機能変化を調べるために、まず糞便試料中の種々の有機酸の濃度を分析した。この際、UC および CD 患者の疾患状態を内視鏡評価に基づいて活動期または寛解期に分類し、比較解析した。UC および CD 患者の糞便中酪酸濃度は健常被験者と比べて有意に低下していた。特に、活動期の CD 患者の 50%では、酪酸濃度が検出限界以下であった。このことから酪酸濃度は病態の重篤度を反映していると考えられた。酪酸濃度は病変部位 (UC では結腸の左右、CD では小腸または大腸)、プロバイオティクス (乳酸菌と酪酸菌)、5-アザチオプリン、抗 TNF 抗体などの他の因子と関連を示さなかった。

プロピオン酸の便中濃度も活動性 UC および CD 患者でわずかに減少したが、これらの差は統計的に有意ではなかった。吉草酸は健康被験者の 16%で検出されたが、UC 患者では検出されなかった。酢酸、ギ酸及び乳酸を含む他の有機酸の量は群間で同様であった。有機酸濃度の相関分析により、酪酸濃度はプロピオン酸と酢酸の濃度と正に相関するが、ギ酸、乳酸またはコハク酸の濃度とは相関しないことが示された。総じて、これらの結果は、SCFA、特に酪酸濃度の低下が IBD の発症および/または悪化に関与するという仮説を支持する。

### 3-2 IBD 患者腸内細菌叢の特徴づけ

続けて、IBD 患者における腸内細菌叢の特徴を解析するために、糞便試料について 16S rRNA 配列解析を行った。得られたデータについて、unweighted UniFrac 距離に基づく主座標分析 (principal coordinate analysis: PCoA)を行った。健常者の細菌叢は一つの領域内にプロットされたが、UC および CD 患者の細菌叢は散在しており、また UC および CD 患者の細菌叢は健常者の細菌叢とは異なることを示した (unweighted UniFrac 距離に基づく adonis 検定; UC:  $R^2 = 0.074$ ,  $p = 0.001$ ; CD:  $R^2 = 0.18$ ,  $p = 0.001$ )。さらに、細菌叢構成は両疾患の活動期と寛解期の間で有意に異なった。 $\alpha$ -多様性は UC および CD 患者で、特に疾患の活動期に有意に減少した。

CD 患者の細菌叢構成は門レベルにおいて Firmicutes と Verrucomicrobia (*Akkermansia muciniphila* のみを含む)の減少と Proteobacteria の増加によって特徴付けられた。Proteobacteria は UC 患者においてもわずかに増加していた。綱レベルでは、活動期 CD 患者では、Clostridia 綱の低下と、Gammaproteobacteria 綱と Bacilli 綱の増加を示した。さらに、BugBase<sup>46</sup> によって活動期 CD 患者における通性嫌気性菌の増加と偏性嫌気性菌の減少が予測された。このことから、CD 患者では大腸内が微好気的環境にシフトしていると示唆された。寛解期の CD 患者、活動期および寛解期の UC 患者の細菌叢構成に関しては、より弱い程度であるが同様の傾向が観察された。

### 3-3 IBD 患者における酪酸関連細菌の減少

糞便中の酪酸濃度と関連する細菌を同定するために、細菌分類群の構成割合と糞便中代謝物との相関分析を行った。これにより、12 属および 28 種の構成割合が酪酸濃度と正に相関することを見出した (Spearman 相関分析、adjusted  $p$  value < 0.05)。一方、他の代謝物については、酢酸、吉草酸、イソ酪酸濃度と少数の細菌属の間に正の相関が観察されたことを除き、有意な相関を示さなかった。酪酸と正の相関を示した細菌の中で、5 種の細菌属と 7 種の細菌種が健常被験者の細菌叢中の 1%以上を占めており、これらの細菌が酪酸生合成経路において中心的役割を果たす可能性が示唆された。実際に、7 種の中には酪酸産生菌として知られる *F. prausnitzii* および *Eubacterium rectale* が含まれていた<sup>20</sup>。また酪酸濃度と同様に、酪酸関連細菌の総割合は CD 患者において顕著に低下していた。特に、*F. prausnitzii* は健常者の細菌叢で最も豊富な酪酸産生菌であったが、活動期の CD 患者の細菌叢にはほとんど存在しなかった。対照的に、*F. prausnitzii* の割合については、活動期または寛解期の UC 患者においては有意な減少は認められなかった。酪酸関連細菌の一部 (*Blautia wexlerae*、*E. rectale*、*Ruminococcus bromii* および *E. hallii*) は活動性 UC 患者において減少していた。

### 3-4 UC 患者における糞便中ムチンの O 結合糖鎖割合の増加

ムチン O 結合型糖鎖は N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、N-アセチルグルコサミンからなるコア構造を持つ<sup>59</sup>。これらの構造はヒト結腸内のフコース、シアル酸、硫酸残基によって末端修飾される。私は、IBD 患者において糞便中ムチンの質と量が変わっていると仮定し、便中ムチン中のこれらの成分の量を調べた。ムチン画分の蛋白質含量は UC 患者で有意に低かった。それにもかかわらず、ムチン O 結合型糖鎖濃度は健常被験者よりも UC 患者でわずかに高く、タンパク質に対する O 結合型糖鎖のムチン比は UC 患者で有意に高くなっていた。この異常は CD 患者では観察されなかった。またムチン O 結合型糖鎖組成の解析結果から、UC および CD 患者では NeuGc を除き、糖鎖組成はほとんど変化していなかった。NeuGc はヒト細胞では合成されないが、食物由来の外因性 NeuGc は時折宿主細胞に吸収され、ムチンを含む内因性糖タンパク質に取り込まれる<sup>60</sup>。NeuGc は健常者より UC 患者において高頻度に検出された。

### 3-5 UC 患者におけるムチン糖鎖分解の低下と酪酸濃度低下の相関

続けて細菌属、ムチン成分および SCFA の相関ネットワーク解析を行った ( $\rho > 0.3$  または  $\rho < -0.3$ )。相関ネットワーク解析は酪酸濃度と酪酸関連細菌 (*Faecalibacterium*、*Eubacterium*、*Anaerotypes*) の間の正の相関を示した。さらに、相関ネットワーク解析はムチン O 結合型糖鎖の濃度と各 SCFA 濃度との逆相関を明らかにした。健常者、UC、CD 患者のうち、ムチン O 結合型糖鎖と SCFA の間の逆相関は UC 患者で最も顕著であった (SCFA の合計:  $\rho = -0.45$ , FDR = 0.014; 酢酸:  $\rho = -0.44$ , FDR = 0.014; プロピオン酸:  $\rho = -0.43$ , FDR = 0.014; 酪酸:  $\rho = -0.35$ , FDR = 0.035)。これらのデータは、腸内細菌が SCFA を生産するための内因性発酵基質としてムチン O 結合型糖鎖を利用できることを示唆するものであった。この考えは、酪酸が検出されない UC 患者においてムチン O 結合型糖鎖が多く残存していたことによってさらに裏付けられた。これらの結果から、私はムチン O 結合型糖鎖利用が UC 患者において損なわれており、それが最終的に酪酸産生に影響する可能性があると考えた。

この仮説を確認するため、新たに入手した UC 患者および健常被験者の新鮮便サンプルのムチン糖鎖分解活性 (ムシナーゼ活性) を評価した。健常者と比較して UC 患者では便ムシナーゼ活性が顕著に低下していた。ムシナーゼ活性は酪酸を含む SCFA の便中

濃度と正の相関を示した。SCFA 量の減少は UC 患者の食習慣と相関しなかった。UC 患者と健康被験者の間で栄養摂取 (可溶性繊維摂取量を含む) に有意差はなかった。

### 3-6 ムチンの投与は SCFA 産生を促す

腸内細菌叢が SCFA を産生するための発酵源としてムチンを利用する可能性を直接的に検証するために、*in vitro* 発酵システム<sup>53</sup>を用いて、ムチンの存在または非存在下でラット盲腸内細菌叢を培養した。盲腸はげっ歯類における微生物発酵の主要部位である<sup>61</sup>。ムチン添加は 48 時間以内に培養液中の酪酸を含む SCFA 濃度を増加させた。このように、腸内細菌はムチンの発酵により SCFA を産生することが確認された。

さらに *in vivo* での発酵基質としてのムチン O 結合型糖鎖の重要性を検証するために、0.3% または 0.9% (w/w) の精製ムチンを含む合成飼料をラットに 2 週間給餌した。0.9% ムチン飼料は酢酸と酪酸の盲腸濃度を有意に、プロピオン酸の盲腸濃度をわずかに増加させた。重要なことに、盲腸のムチン O 結合型糖鎖の濃度は全群間で同程度であり、外来ムチンの O 結合型糖鎖が腸内微生物発酵を介して効率的に消費されることを示した。さらに、ムチン投与は投与量依存的にムシナーゼ活性の増加をもたらした。このように、O 結合型糖鎖の利用は SCFA 産生の維持にとって重要な因子であると考えられる。

### 3-7 ムチンは発酵基質として腸管免疫系の発達に寄与する

最後に、1.5% ムチンを含む餌を 3 週間マウスに与えることにより、ムチン依存的な共生合成経路の生物学的意義を検討した。ラットの結果と一致して、マウスへのムチンの投与は酪酸を含む SCFA の盲腸濃度を増加させた。ムチン給餌マウスの細菌叢構成は対照マウスと比べて、高い  $\alpha$  多様性と *Allobaculum* 属、未分類 Bacteroidales S24-7 属、および *Akkermansia* 属細菌の構成割合の増加を示した。腸内細菌由来の酪酸は、末梢誘導性 Treg (peripherally generated Treg: pTreg) 細胞の分化を誘導することが知られている<sup>18,19</sup>。また、SCFA は、結腸粘膜固有層における B220<sup>-</sup>IgA<sup>+</sup> 形質細胞の分化を促進することが知られている<sup>17</sup>。これらの報告の知見と合致することに、ムチン給餌マウスにおける ROR $\gamma$ <sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>pTreg 細胞の頻度は、対照マウスの約 2 倍程度増加していた。ムチン飼料

は、 $\text{ROR}\gamma\text{t}^-\text{Foxp3}^+$ 胸腺由来 Treg (thymus-derived tTreg: tTreg)細胞も増加させたことから、tTreg 細胞の結腸への移動や細胞増殖もムチン給餌群で増強されたことが示唆された。さらに、ムチン含有食は結腸における  $\text{IgA}^+$ 形質細胞の頻度を増加させた。これらの結果から、ムチンは粘膜バリアとして機能するだけでなく SCFA 産生を促進することにより腸管免疫系の発達に寄与すると考えられた。



## 第4章 考察

本研究では、日本人 IBD 患者が dysbiosis 症状を示し、CD および UC 患者の腸内環境構成因子がいくつかの異なる特徴を示すことを確認した。CD 患者では UC 患者よりも腸内細菌の多様性が低かった。CD の活動期の細菌構成は、Gammaproteobacteria と Bacilli の増加により特徴付けられ、Clostridia は減少していた。その結果、嫌気性菌の割合は著しく減少しており、酪酸産生菌 (主に *F. prausnitzii*) は活動性 CD 患者ではほとんど存在しなかった。酪酸産生菌の減少と  $\alpha$  多様性の減少は、白人の CD 患者でも報告されている<sup>5,6,62,63</sup>。したがって、これらの微生物叢の変化は人種や食文化に依らない一般的な CD の特徴であると考えられた。*F. prausnitzii* や *E. rectale* などの *in vitro* における酪酸生産能は報告されている<sup>62-64</sup>。これまで、ヒト腸内における酪酸産生に対するこれらの細菌の寄与は不明のままであったが、本研究によりこれらの細菌の割合は確かに糞便中の酪酸濃度と正の相関を示すことが見いだされた。このことからこれらの酪酸産生菌の減少が CD における酪酸産生減少の主な原因であることが示唆された。

逆に、UC 患者の細菌叢は多様性の減少はわずかであり、活動期においても *F. prausnitzii* の割合は健常者のものと近かった。それにもかかわらず、一部の UC 患者は糞便中の酪酸が不足していた。そのメカニズムを解明するために、腸内細菌叢の栄養源となるムチンの成分を分析した。特に、腸内細菌叢によるムチン O 結合型糖鎖利用の指標として、腸内細菌叢によって分解されなかった糞便中ムチンの O 結合型糖鎖の濃度と比率に焦点を当てた。便中のムチン O 結合型糖鎖比は、健常者より UC 患者で有意に高かった。これらの結果は、ムチン O 結合型糖鎖利用が UC 患者の腸内微生物叢で低下することを意味する。実際、UC 患者の便検体では健常人の便検体と比べてムシナーゼ活性が低下していた。以上の結果は、ムチン O 結合型糖鎖は SCFA を生産するための内因性発酵源として利用可能であり、この経路が UC 患者では減弱していたことを示唆する。この仮説は以下に列挙する証拠により支持される。第一に、UC 患者の糞便試料におけるムチン O 結合型糖鎖と SCFA の濃度の間に逆相関が、ムシナーゼ活性と SCFA 濃度の間に正の相関がみられた。第二に、食物繊維と RS を含まない合成飼料を給餌した齧歯類の大腸で相当量の SCFA が発生することが報告されている<sup>61,65</sup>。このことは、消化管における内因性発酵基質の存在を示している。腸内細菌叢は発酵性食事成

分がない場合、主要な発酵源としてムチンを利用する可能性が考えられる。私は、精製ムチンの投与が *in vitro* と *in vivo* の両方で SCFA の産生を促進することを示すことによって、この仮説を確認した。第三に、*in vitro* 腸モデルを用いた先行研究によって、腸粘液細菌叢の大部分を Firmicutes が占めており、特に *Clostridium* cluster XIVa 種が全ての粘液定着細菌の約60%を構成することを示されている<sup>66</sup>。また粘膜関連細菌の16S rRNA 遺伝子解析は、Firmicutes が粘液領域により豊富であり、*Clostridium* cluster XIVa (Lachnospiraceae と Ruminococcaceae)が主要な科であることを示した<sup>67</sup>。このことは、酪酸産生菌が粘液中でムチンを直接または間接的にエネルギー利用していることを示唆する。本研究の結果を元に、私は腸内共生系維持に寄与する新しいモデルを提案する。宿主細胞由来のムチン O 結合型糖鎖は腸内細菌によって酪酸に代謝される。これにより産生された酪酸は、大腸上皮細胞によってエネルギー源として利用され、大腸免疫系の発達に寄与する。この宿主と共生微生物に跨る酪酸生合成機構を私は symbiosynthesis と名付けた。Symbiosynthesis 経路は、宿主-微生物間の共生関係成立に重要な役割を果たす可能性がある。UC では、symbiosynthesis 経路は減弱しているようであり、酪酸の産生低下に寄与することで少なくとも部分的には UC の病因に関与する可能性がある。

さらに、大腸におけるムチンの免疫調節機能を示した。外因性ムチンは Treg 細胞と IgA<sup>+</sup>形質細胞集団を増やし、免疫系の発達に重大な影響を持つことを示した。酪酸が大腸 pTreg 細胞と IgA<sup>+</sup>形質細胞の分化を誘導することから<sup>17,19</sup>、外因性ムチンの摂取は symbiosynthesis 経路を増強することによってこれらの免疫細胞集団を増加させたと推測する。興味深いことに、ムチン投与は tTreg 細胞集団の拡大も誘導し、ムチンが tTreg 細胞の分化、移動および/または増殖を促進することを示唆した。この原因としては、細菌叢構成の変化やプロピオン酸濃度の上昇が考えられる<sup>68,69</sup>。これらの機構はまだ完全には解明されていないが、これらの知見は大腸免疫恒常性の維持における発酵源としてのムチンの重要性を強調する。

相関分析は7種を酪酸関連細菌として同定した。これらの中には文献でよく知られている酪酸産生菌、*F. prausnitzii* が含まれた<sup>20</sup>。その他に *Clostridium* cluster XIVa に属する *E. rectale* と *E. hallii* も酪酸産生菌として知られる<sup>20,21</sup>。注目すべきことに、これらの *Eubacterium* 属細菌は粘液層に蓄積することが示されている<sup>66,70</sup>。*Eubacterium* 属細菌は

本研究において活動期 UC 患者で有意に減少していた。この結果から、*Eubacterium* 属細菌の減少が UC におけるムチン O 結合型糖鎖依存的な酪酸産生経路の破綻に関与する可能性が考えられる。*Clostridium* cluster XIVa の他の細菌属である *Anaerotypes* 属には、*A. caccae* や *A. hadrus* のような数種の酪酸産生菌が含まれている<sup>71,72</sup>。一方、残りの3種 *R. bromii*、*B. wexlerae* および *B. vulgatus* は、酪酸産生に至る細菌代謝ネットワークの構成細菌として機能する可能性がある。例えば、*B. vulgatus* は多糖類利用に関連する遺伝子を豊富に有する<sup>73</sup>。*R. bromii* および *B. wexlerae* はそれぞれ *Clostridium* クラスタ IV および XIVa 種に分類され、澱粉分解細菌として知られている<sup>74,75</sup>。*R. bromii* はヒト結腸における RS の分解と利用において中心的役割を果たす。*B. wexlerae* は *in vitro* 発酵において RS を利用することが知られる。これらの細菌による多糖類の分解は、酪酸産生菌に発酵源としてオリゴ糖または単糖類を提する可能性がある。*R. bromii* と *B. wexlerae* の細菌割合は活動性 UC 患者で有意に低かった。従って、多糖類と RS の微生物消化はこれらの患者で低下すると推測される。

結論として、本研究では酪酸産生が CD と UC 患者の両方で減少することを見出した。しかし、その根底にある機序は両疾患間で異なっていた。CD 患者では、*F. prausnitzii* を含む酪酸産生菌の減少により酪酸濃度が減少した。逆に、UC 関連細菌叢ではムチン O 結合型糖鎖の利用能が減少することで、最終的に酪酸産生が減少した。ムチン O 結合型糖鎖依存的な酪酸経路を詳細に明らかにするためには更なる研究が必要であるが、本研究の知見により UC の病態に関する新しい展望が提示された。

## 第 5 章 参考文献

1. Khor, B., Gardet, A. & Xavier, R. J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **474**, 307–317 (2011).
2. Wlodarska, M., Kostic, A. D. & Xavier, R. J. An integrative view of microbiome-host interactions in inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe* **17**, 577–91 (2015).
3. Honda, K. & Littman, D. R. The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 759–95 (2012).
4. Kamada, N., Seo, S.-U. U., Chen, G. Y. & Núñez, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 321–35 (2013).
5. Gevers, D. *et al.* The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* **15**, 382–92 (2014).
6. Halfvarson, J. *et al.* Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nat. Microbiol.* **2**, nmicrobiol20174 (2017).
7. Manichanh, C. *et al.* Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* **55**, 205–211 (2006).
8. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59 (2010).
9. Honda, K. & Littman, D. R. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* **535**, 75–84 (2016).
10. Elinav, E. *et al.* NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis.

*Cell* **145**, 745–57 (2011).

11. Garrett, W. S. *et al.* Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell* **131**, 33–45 (2007).

12. Nagao-Kitamoto, H. *et al.* Functional Characterization of Inflammatory Bowel Disease-Associated Gut Dysbiosis in Gnotobiotic Mice. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 468–481 (2016).

13. Cummings, J. Fermentation in the human large intestine: evidence and implications for health. *Lancet* **1**, 1206–9 (1983).

14. Høverstad, T. & Midtvedt, T. Short-chain fatty acids in germfree mice and rats. *J. Nurt.* **116**, 1772–6 (1986).

15. Cummings, J., Pomare, E., Branch, W., Naylor, C. & Macfarlane, G. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* **28**, 1221–7 (1987).

16. Kelly, C. J. *et al.* Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell Host Microbe* **17**, 662–71 (2015).

17. Kim, M., Qie, Y., Park, J. & Kim, C. H. Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses. *Cell Host Microbe* **20**, 202–214 (2016).

18. Arpaia, N. *et al.* Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* **504**, nature12726 (2013).

19. Furusawa, Y. *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of

colonic regulatory T cells. *Nature* **504**, 446–50 (2013).

20. Barcenilla, A. *et al.* Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1654–61 (2000).

21. Louis, P. *et al.* Restricted Distribution of the Butyrate Kinase Pathway among Butyrate-Producing Bacteria from the Human Colon. *J. Bacteriol.* **186**, 2099–2106 (2004).

22. Harig, J., Soergel, K., Komorowski, R. & Wood, C. Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. *N. Engl. J. Med.* **320**, 23–8 (1989).

23. Scheppach, W. *et al.* Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* **103**, 51–6 (1992).

24. McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P. & Florin, T. H. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 265–278 (2011).

25. Johansson, M. E. *et al.* The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 15064–15069 (2008).

26. Johansson, M. E., Larsson, J. M. & Hansson, G. C. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host–microbial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 4659–65 (2011).

27. Li, H. *et al.* The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nat. Commun.* **6**, ncomms9292 (2015).

28. der Sluis, M. *et al.* Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology* **131**, 117–129 (2006).

29. Sommer, F. *et al.* Altered Mucus Glycosylation in Core 1 O-Glycan-Deficient Mice Affects Microbiota Composition and Intestinal Architecture. *PLoS ONE* **9**, e85254 (2014).
30. Johansson, M. E. *et al.* Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut* **63**, 281–91 (2014).
31. Yamada, T. *et al.* Mucin O-glycans facilitate symbiosynthesis to maintain gut immune homeostasis. *Ebiomedicine* (2019) doi:10.1016/j.ebiom.2019.09.008 .
32. Takahashi, K. *et al.* Validation of a Food Frequency Questionnaire Based on Food Groups for Estimating Individual Nutrient Intake. *Jpn. J. Nutr. Diet.* **59**, 221–232 (2001).
33. Lennard-Jones, J. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol. Supplement* **170**, 2–6; discussion 16-9 (1989).
34. Podolsky, D. Inflammatory bowel disease (1). *N. Engl. J. Med.* **325**, 928–37 (1991).
35. Podolsky, D. Inflammatory bowel disease (2). *N. Engl. J. Med.* **325**, 1008–16 (1991).
36. Best, W. R., Bectel, J. M., Singleton, J. W. & Kern, F. Development of a Crohn's Disease Activity Index National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* **70**, 439–444 (1976).
37. Rachmilewitz, D. Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. *BMJ* **298**, 82 (1989).
38. Imaeda, H. *et al.* Relationship between serum infliximab trough levels and endoscopic activities in patients with Crohn's disease under scheduled maintenance treatment. *J.*

*Gastroenterol.* **49**, 674–82 (2014).

39. Matts, S. The value of rectal biopsy in the diagnosis of ulcerative colitis. *QJM* **30**, 393–407 (1961).

40. Illumina. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. (2013). [http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)

41. Caporaso, G. J. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **7**, nmeth.f.303 (2010).

42. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 10–12 (2011) doi:10.14806/ej.17.1.200 .

43. Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, 2460–2461 (2010).

44. Tsuda, A. *et al.* Influence of Proton-Pump Inhibitors on the Luminal Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **6**, e89 (2015).

45. Dixon, P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J. Veg. Sci.* **14**, 927–930 (2003).

46. Ward, T. *et al.* BugBase Predicts Organism Level Microbiome Phenotypes. *bioRxiv* 133462 (2017) doi:10.1101/133462 .

47. Cobo, E., Kisson-Singh, V., Moreau, F. & Chadee, K. Colonic MUC2 mucin regulates the expression and antimicrobial activity of  $\beta$ -defensin 2. *Mucosal Immunol.* **8**, 1360–72 (2015).



48. Tanabe, H., Sugiyama, K., Matsuda, T., Kiriyama, S. & Morita, T. Small intestinal mucins are secreted in proportion to the settling volume in water of dietary indigestible components in rats. *J. Nutr.* **135**, 2431–7 (2005).
49. Bovee-Oudenhoven, I., Termont, D., Heidt, P. & der Meer, V. R. Increasing the intestinal resistance of rats to the invasive pathogen *Salmonella enteritidis*: additive effects of dietary lactulose and calcium. *Gut* **40**, 497–504 (1997).
50. Harrison, M. J. & Packer, N. H. Glycoprotein Methods and Protocols. *Methods Mol.* **125**, 211–216 (2000).
51. Ogata, M. *et al.* Chemoenzymatic synthesis of sialoglycopolypeptides as glycomimetics to block infection by avian and human influenza viruses. *Bioconjugate Chem.* **20**, 538–49 (2009).
52. Komura, M. *et al.* A short-term ingestion of fructo-oligosaccharides increases immunoglobulin A and mucin concentrations in the rat cecum, but the effects are attenuated with the prolonged ingestion. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 1592–602 (2014).
53. HAN, K.-H. *et al.* Comparison of the Effects of Longer Chain Inulins with Different Degrees of Polymerization on Colonic Fermentation in a Mixed Culture of Swine Fecal Bacteria. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **60**, 206–212 (2014).
54. Weigmann, B. *et al.* Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nat. Protoc.* **2**, nprot.2007.315 (2007).
55. Suzuki, K. *et al.* Intestinal Epithelial Cell-specific Deletion of  $\alpha$ -Mannosidase II Ameliorates Experimental Colitis. *Cell Struct. Funct.* **43**, 25–39 (2018).

56. Pollard, K., Dudoit, S. & van der Laan, M. Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. *springer* 249–271 (2005) doi:10.1007/0-387-29362-0\_15 .
57. Segata, N. *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **12**, 1–18 (2011).
58. Asnicar, F., Weingart, G., Tickle, T. L., Huttenhower, C. & Segata, N. Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn. *PeerJ* **3**, e1029 (2015).
59. Larsson, J. M., Karlsson, H., Sjövall, H. & Hansson, G. C. A complex, but uniform O-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn. *Glycobiology* **19**, 756–766 (2009).
60. Tangvoranuntakul, P. *et al.* Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12045–12050 (2003).
61. Morita, T. *et al.* Resistant proteins alter cecal short-chain fatty acid profiles in rats fed high amylose cornstarch. *J. Nutr.* **128**, 1156–64 (1998).
62. Frank, D. N. *et al.* Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 13780–13785 (2007).
63. Machiels, K. *et al.* A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* **63**, 1275–1283 (2014).
64. Fujimoto, T. *et al.* Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **28**, 613–619 (2013).

65. Thorburn, A. N. *et al.* Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nat. Commun.* **6**, 7320 (2015).
66. den Abbeele, P. *et al.* Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *ISME J.* **7**, 949 (2013).
67. Nava, G. M., Friedrichsen, H. J. & Stappenbeck, T. S. Spatial organization of intestinal microbiota in the mouse ascending colon. *ISME J.* **5**, 627 (2011).
68. Obata, Y. *et al.* The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **15**, 571–9 (2014).
69. Smith, P. M. *et al.* The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic T<sub>reg</sub> Cell Homeostasis. *Science* **341**, 569–573 (2013).
70. Louis, P. & Flint, H. J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol. Lett.* **294**, 1–8 (2009).
71. Allen-Vercoe, E. *et al.* Anaerostipes hadrus comb. nov., a dominant species within the human colonic microbiota; reclassification of Eubacterium hadrum Moore et al. 1976. *Anaerobe* **18**, 523–529 (2012).
72. Schwartz, A. *et al.* Anaerostipes caccae gen. nov., sp. nov., a New Saccharolytic, Acetate-utilising, Butyrate-producing Bacterium from Human Faeces. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**, 46–51 (2002).
73. Kaoutari, A., Armougom, F., Gordon, J. I., Raoult, D. & Henrissat, B. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**,

nrmicro3050 (2013).

74. Ze, X., Duncan, S. H., Louis, P. & Flint, H. J. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME J.* **6**, 1535 (2012).

75. Yang, J., Martínez, I., Walter, J., Keshavarzian, A. & Rose, D. J. In vitro characterization of the impact of selected dietary fibers on fecal microbiota composition and short chain fatty acid production. *Anaerobe* **23**, 74–81 (2013).

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、研究全般に渡って直接指導賜った慶應義塾大学薬学部・大学院薬学研究科 長谷耕二教授に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、御指導賜りました静岡大学農学部 森田達也先生、日野真吾先生に深く感謝致します。また、実験や解析において御協力してくださりました大阪大学大学院医学系研究科 飯島英樹先生、静岡大学農学部 源田知美博士、グリコ株式会社 青木亮様、帯広畜産大学食品科学研究部門 福島道広先生、韓圭鎬先生、永田龍次様、理化学研究所生命医科学研究センター 服部正平先生、須田互先生、富山県立大学教養教育センター 古澤之裕先生、医薬基盤・健康・栄養研究所ワクチン・アジュバント研究センター 國澤純先生、沖縄科学技術大学院 廣田雅人様、そして慶應義塾大学薬学部 金倫基教授、木梨祐輔様、藤村由美子様に深く感謝致します。

諸々お世話になっている慶應義塾大学薬学部生化学講座の方々に感謝致します。その他、大学院生活をサポートしてくださった学生課や事務、管理会社の方々、他講座の教職員、学生方に感謝致します。

本研究の遂行中、日本免疫学会「きぼう」プロジェクト・免疫学博士課程学生支援より経済的な支援および研究の方向性についての助言を頂きました。日本免疫学会の方々に深く感謝致します。

最後に、どんな時も私を支えてくれた家族に心から感謝致します。