

摂取塩分による腸内環境変化を起因とした感染症への抵抗性変化の原理の解明

佐藤 佳

京都大学ウイルス・再生医科学研究所システムウイルス学分野

概要 日本人の塩分摂取量は他の欧米先進国に比べて顕著に高いことから、塩分摂取が人体およびヒトの健康維持に与える影響の理解の重要性は日本国において頓に高く、塩分の過剰摂取および不足が生体に与える影響をより正確かつ多面的に理解・解明することが希求される。特に塩分摂取が生体環境に与える大きな影響のひとつとして、腸内細菌叢(腸内フローラ)のバランスが破綻する(“dysbiosis”と呼ぶ)ことが近年明らかとなってきている(Peterson and Round, *Cell Microbiol*, 2014)。腸内フローラは生体恒常性維持に必須な構成要素であり、またこの破綻は、さまざまな感染症に対する感受性・抵抗性と密接に関連することが明らかとなってきている。しかし、慢性的な塩分の過剰摂取(および不足)によって引き起こされる *dysbiosis* が、ヒトの免疫系および感染症への抵抗性に与える影響についてはほとんど明らかとなっていない。さらに、乳幼児や未成年の健全な腸内フローラ形成期における塩分の過剰摂取および不足の影響は特に考慮すべき対象のひとつであり、塩分の異常摂取による *dysbiosis* は、乳幼児や未成年の健康形成・維持を促進する上で喫緊の課題と言える。

本研究では、ヒトの慢性感染性疾患のひとつであるヒト免疫不全ウイルス(HIV)を感染症モデルシステムとして用いた。本申請研究では、まず、HIV 感染ヒト化マウスを主たるモデルシステムとして用い、ウイルス感染病態と *dysbiosis* のクロストークを解明することを目的とした。

非感染ヒト化マウス(通常環境で飼育したマウス)と、HIV に感染させたマウスを 15 週間飼育し、定期的に麻酔を施して採血を行った。血漿中のウイルス RNA 量を *real-time RT-PCR* で、血中 CD4 陽性 T 細胞数を *flow cytometry* と血液成分測定器(*hematology*)でそれぞれ測定した。その結果、HIV 感染ヒト化マウスにおいては、高いレベルのウイルス血症が 15 週間維持され、また、HIV 感染者で確認されるような、漸進的な CD4⁺ T 細胞の減少が確認された。以上のことから、申請者らが作製したヒト化マウスは、HIV 感染に感受性であり、また、ヒトにおける感染病態を忠実に再現した動物モデルであることが確認された。

次に、HIV 感染および非感染のヒト化マウスの糞を採取し、DNA を抽出し、それぞれの腸内細菌を 16S rRNA を対象とした次世代シーケンス解析(マイクロビーム解析)を実施した。得られた大規模データをオミクス解析し、どのような腸内細菌科・属・種がウイルス感染によって増減しているかを検討した。その結果、HIV 感染により、腸内細菌科(*Enterobacteriaceae*)が顕著に増加していることを明らかにした。重要なこととして、ここで増加が確認された菌は、実際に HIV 患者の糞便(臨床検体)においても増加していることが、先行研究において確認されていることが挙げられる(Vujkovic-Cvijin et al, *Sci Transl Med*, 2013)。このことは、ヒト化マウスの糞便においても、実際にヒトで確認されている腸内環境の変容を再現できることを示唆している。

そして、得られたマイクロビームデータをオミクス解析することにより、腸内細菌科(*Enterobacteriaceae*)の増加によって変動する代謝産物の推定を行なった。その結果、アラキドン酸を始めとする脂質代謝産物量が増加する可能性を示唆する結果を得た。この可能性を検証するために、非感染および HIV 感染マウスの血漿中のアラキドン酸量を定量したところ、HIV 感染マウス特異的にアラキドン酸量が有意に増加していることを確認した。以上の結果は、HIV 感染によって腸

内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) の増大という *dysbiosis* が惹起され、腸内細菌に起因する代謝産物 (アラキドン酸) が感染個体内で増加することを示唆している。

今後は、摂取塩分量の変動が *dysbiosis* およびウイルス感染病態にどのような影響を与えるかを解析していく予定である。

1. 研究の背景と目的

塩分の過剰摂取および不足は、腎機能の低下や低体温症に代表されるさまざまな影響を生体に与える。日本人の塩分摂取量は他の欧米先進国に比べて顕著に高いことから、塩分摂取が人体およびヒトの健康維持に与える影響の理解の重要性は日本国において頓に高く、塩分の過剰摂取および不足が生体に与える影響をより正確かつ多面的に理解・解明することが希求される。特に塩分摂取が生体環境に与える大きな影響のひとつとして、腸内細菌叢 (腸内フローラ) のバランスが破綻する ("*dysbiosis*" と呼ぶ) ことが近年明らかとなってきた (Peterson and Round, *Cell Microbiol*, 2014)。腸内フローラは生体恒常性維持に必須な構成要素であり、またこの破綻は、さまざまな感染症に対する感受性・抵抗性と密接に関連することが明らかとなってきた。しかし、慢性的な塩分の過剰摂取 (および不足) によって引き起こされる *dysbiosis* が、ヒトの免疫系および感染症への抵抗性に与える影響についてはほとんど明らかとなっていない。さらに、乳幼児や未成年の健全な腸内フローラ形成期における塩分の過剰摂取および不足の影響は特に考慮すべき対象のひとつであり、塩分の異常摂取による *dysbiosis* は、乳幼児や未成年の健康形成・維持を促進する上で喫緊の課題と言える。

本研究では、ヒトの慢性感染性疾患のひとつであるヒト免疫不全ウイルス (HIV) を感染症モデルシステムとして用いる。申請者は特に、ヒト造血幹細胞を移植した "ヒト化マウス" という小動物モデルを作製した。作製したヒト化マウスは、HIV 感染病態を忠実に再現することを確認しており (図1)、本モデルシステムは世界的に高い評価を得ている。

本申請研究では、HIV 感染ヒト化マウスを主たるモデルシステムとして用い、ウイルス感染病態と *dysbiosis* のクロストークを解明することを目的とした。

2. 研究結果

まず、非感染ヒト化マウス (通常環境で飼育したマウス) と、HIV に感染させたマウスを 15 週間飼育し、定期的に麻酔を施して採血を行った。血漿中のウイルス RNA 量を *real-time RT-PCR* で、血中 CD4 陽性 T 細胞数を *flow cytometry* と血液成分測定器 (*hematometry*) でそれぞれ測定した。その結果を図2に示す。図2に示したように、HIV 感染ヒト化マウスにおいては、高いレベルのウイルス血症が 15 週間維持され (図2A)、また、HIV 感染者で確認されるような、漸進的な CD4⁺ T 細胞の減少が確認された (図2B)。以上のことから、申請者らが作製したヒト化マウスは、HIV 感染に感受性であり、また、ヒトにおける感染病態を

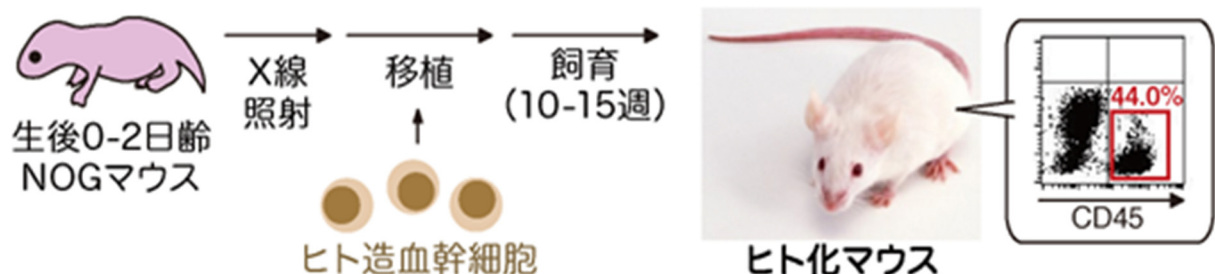


図1 ヒト化マウスの作製方法。レシピエントマウスで分化したヒト CD45 陽性細胞 (ヒト白血球、図赤枠) が 1 年以上にわたりマウス体内に維持される。

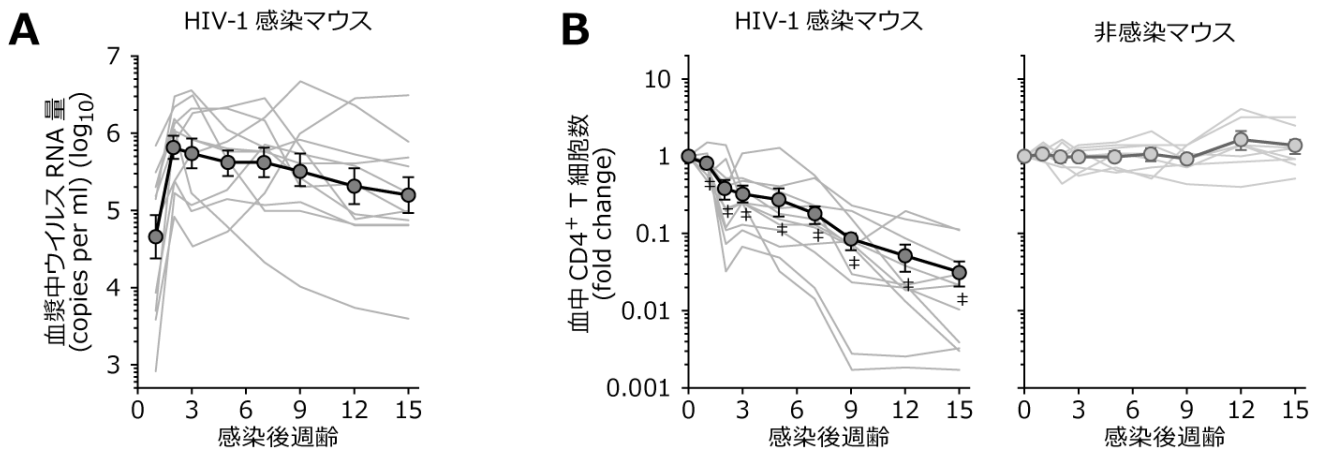


図 2 HIV-1 感染ヒト化マウスで確認される感染病態 .

(A) ウイルス血症 . 血漿中ウイルス RNA 量を real-time RT-PCR により定量した .
 (B) 血中 CD4⁺ T 細胞の漸進的な減少 . 血中 CD4⁺ T 細胞数を、flow cytometry および hematology により測定した . 各マウスの結果を細線で、平均値と SEM を太線で示した .

忠実に再現した動物モデルであることが確認された。

次に、HIV 感染および非感染のヒト化マウスの糞を採取し、DNA を抽出し、それぞれの腸内細菌を 16S rRNA を対象とした次世代シーケンス解析 (マイクロビーム解析) を実施した。得られた大規模データをオミクス解析し、どのような腸内細菌科・属・種がウイルス感染によって増減しているかを検討した。その結果を図 3 に示す。その結果、HIV 感染により、腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*; 図 3 の矢印で示された菌) が顕著に増加していることを明らかにした。重要なこととして、ここで増加が確認された菌は、実際に HIV 患者の糞便 (臨床検体) においても増加していることが、先行研究において確認されていることが挙げられる (Vujkovic-Cvijin et al, *Sci Transl Med*, 2013)。このことは、ヒト化マウスの糞便においても、実際にヒトで確認されている腸内環境の変容を再現できることを示唆している。

そして、得られたマイクロビームデータをオミクス解析することにより、腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*; 図 3 の矢印で示された菌) の増加によって変動する代謝産物の推定を行なった。その結果、アラキドン酸を始めとする脂質代謝産物量が増加する可能性を示唆する結果を得た。この可能性を検証するために、非感染および HIV 感染マウスの血漿中のアラキドン酸量を定量したところ、HIV 感染マウス特異的にアラキドン酸量が有意に増加していることを確認した。以上の結果は、HIV 感染によって腸内細菌

科 (*Enterobacteriaceae*; 図 3 の矢印で示された菌) の増大という dysbiosis が惹起され、腸内細菌に起因する代謝産物 (アラキドン酸) が感染個体内で増加することを示唆している。

3. 考察, 今後の展望

日本人の腸管環境と免疫細胞を、動物モデルを用いて解析するためには、以下の全ての条件を満たす必要がある。

- 1) 日本人の造血幹細胞を用いてヒト化マウスを作製し、適切に実験する技術がある (それにより、日本人の免疫細胞がマウス生体内で再構築される)。
- 2) ウイルス感染に用いるための、biosafety level 3 (BSL3) の実験動物施設がある。
- 3) ウイルス感染実験を実施するための BSL3 細胞培養実験室がある。
- 4) 感染の調整・感染など、各種ウイルス学的実験技術・知識の蓄積が必要である。
- 5) 摂取食品の調整など、動物実験を適切に実施する技術と知識がある。

申請者は、上記の 5 つの条件を満たしており、この研究を実施できるのは、国内では申請者が所属する研究室のみである。特に、ヒト化マウスモデルを用いた研究を実施するにはさまざまなハードルをクリアすることが必須である

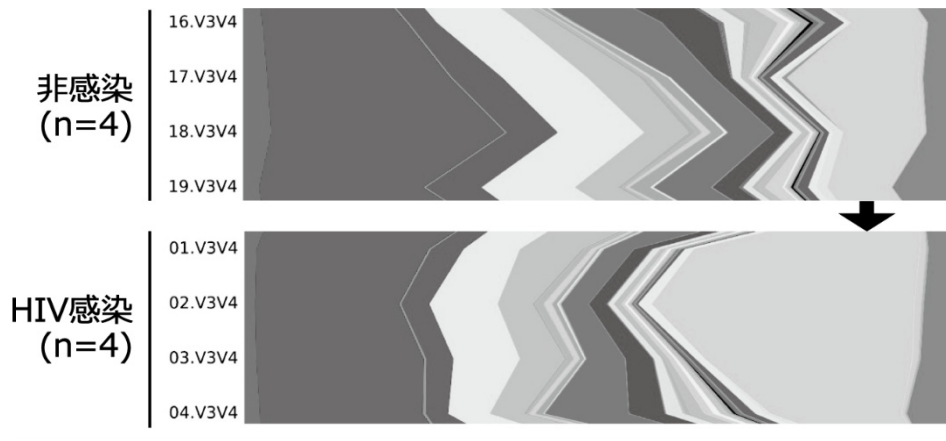


図3 HIV感染ヒト化マウスにおける腸内細菌の変容. 各色はそれぞれ腸内細菌の科 (family)を示す. 非感染マウスの腸内フローラに比べ、HIV感染マウスにおいて、腸内細菌科(図中■色(矢印))のが顕著に増えている.

(作製に必須なヒト造血幹細胞の安定的な入手, レシピエントマウスである NOG マウスの維持, ヒト造血幹細胞を新生仔 NOG マウスに適切に移植する技術, など)。申請者はこれまで、ウイルス感染ヒト化マウスモデルを用いた研究に従事しており、世界的に非常に高い評価を得ている。

腸内細菌の構成が人種によって多様であり、食成分によって強く影響を受けることはよく知られているが、特に日本食に着目し、それによって構成される腸内細菌が感染症への抵抗性に与える影響を検討した研究はまだ実施されていない。それを実施するためには、日本人の免疫環境を保持したヒト化マウスモデルを作成し、ウイルス感染実験をする技術と知識、経験が必須であるが、申請者はそのすべてを網羅している。本計画で検討していた実験技術・検体調整のためのすべてのプロトコールはすでに確立済みであり、ウイルス感染と dysbiosis の関係性はすでに

に確認・再現することに成功している(図3)。今後は、摂取塩分量の変動が dysbiosis およびウイルス感染病態にどのような影響を与えるかを解析していく予定であるが、申請者の異動(本年4月に、京都大学ウイルス・再生医科学研究所から東京大学医科学研究所感染症国際研究センターに異動)に伴い、計画していた研究を実施するための研究施設、各種承認の再整備が必要となる。現在、他のウイルスに感染した場合の腸内細菌環境への影響を解析しているが、食成分の影響の評価については、東京大学への異動後に実施することを予定している。さらに、シンバイオティクス(乳酸菌など、腸内フローラの恒常性を正常に保つように作用する飲食物質)によって、塩分の異常摂取に起因する dysbiosis を阻害し、適切な塩分摂取が困難な乳幼児や未成年の健康維持(すなわち、ウイルス感染症に対する抵抗性を賦与する)可能性についても、実験的に検証・実証する予定である。

Investigation of the Effect of Salt Intake-Mediated Dysbiosis on the Sensitivity to Viral Infectious Diseases

Kei SATO

Laboratory of Systems Virology, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University

Summary

Salt crucially affects human body and can be the triggers of several disorders such as high blood pressure. Additionally, it has been recently revealed that salt intake is closely associated with human homeostasis including intestinal flora and potently causes "dysbiosis". "Dysbiosis" means the destruction of the balance of intestinal flora and can break the immuno-homeostasis leading to affect the sensitivity and resistance to infectious diseases. However, the effect of the dysbiosis caused by salt intake on the sensitivity and resistance to infectious diseases is unrevealed.

To investigate the association of virus infection, salt intake and the dysbiosis caused by infection and/or salt, we used a hematopoietic stem cell-transplanted "humanized mouse" model. Our "humanized mouse" is susceptible to the infection of human immunodeficiency virus (HIV), which is a human-specific pathogenic virus and the causative agent of acquired immunodeficiency syndrome, and is able to reproduce the disorders observed in infected individuals. By using HIV-infected humanized mice, we investigated the effect of virus infection on the intestinal flora.

We inoculated HIV into four humanized mice and obtained the stools at six weeks post-infection. We also obtained the stools of four uninfected humanized mice. We then extracted DNA from these stools and performed 16S rRNA sequencing analysis to determine the intestinal flora. Through the bioinformatics analyses of the 16S rRNA sequence data, we found that the family *Enterobacteriaceae* is predominant in the intestinal flora of HIV-infected humanized mice.

As our findings correspond to the previous observations in HIV-infected individuals, these results suggest that our experimental system using humanized mice and HIV is an ideal platform to investigate the effect of human-specific pathogenic virus infection on intestinal flora. By using this platform, we will investigate the effect of salt intake on the sensitivity/resistance to virus infection which is closely associated with intestinal flora and *vice versa*.