

学 校 名	兵 庫 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	細菌叢変化による潰瘍性大腸炎発症機構の解明 —抗菌剤による潰瘍性大腸炎の治療戦略への道—		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①炎症性腸疾患 ②腸内細菌叢 ③腸管免疫 ④ノバイオート			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 戸 聡	医 学 部	主 任 教 授	研究統括、細菌叢解析、細菌数解析、動物実験

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 椋 英 樹	医 学 部	講 師	細菌叢解析、細菌数解析、動物実験
池 内 浩 基	医 学 部	主 任 教 授	臨床サンプル収集のマネージメント・統括
内 野 基	医 学 部	准 教 授	臨床データの収集・解析
大 野 博 司	理 化 学 研 究 所 生命医科学研究センター	チ ー ム リ ー ダ ー	臨床と細菌叢のデータの統計学的解析の指導
加 藤 完	理 化 学 研 究 所 生命医科学研究センター	研 究 員	臨床と細菌叢のデータの統計学的解析
中 西 裕 美 子	理 化 学 研 究 所 生命医科学研究センター	研 究 員	臨床サンプルの代謝産物解析

細菌叢変化による潰瘍性大腸炎発症機構の解明 — 抗菌剤による潰瘍性大腸炎の治療戦略への道 —

1. 研究の目的

(1) 潰瘍性大腸炎 (UC) の発症にかかる異常細菌叢の関与を検討し、発症機構の解明を目指すことを目的としている。具体的には、潰瘍性大腸炎術後回腸囊炎を UC のモデルとして解析することを目的としている。

2. 研究の計画

(1) 回腸囊炎患者の糞便における細菌叢解析

- ① 回腸囊炎患者の糞便におけるMiseqによる細菌叢解析をおこなう。
- ② 回腸囊炎患者の臨床スコア (mPDAI) と細菌叢との関連を調べる。

(2) 病因と関連する可能性のある細菌の培養分離

- ① (1) にて変化が認められた細菌群からpathobiontあるいはsymbiontと考えられる細菌を選択し、MinIONを用いて同定単離培養する。

(3) マウスを用いた細菌叢、および単離細菌の病理学的検討

- ① (1) にて得られた疾患スコアの高い患者糞便サンプル、あるいは、(2) にて得られた病因に関連する可能性のある単離細菌を、予め抗菌剤にて常在細菌叢を欠失させたマウスに投与し、それらの炎症誘起作用について検討する。

3. 研究の成果

(1) 回腸囊炎患者の糞便における細菌叢解析

- ① Enterobacteriaceaeが回腸囊炎 (臨床スコア (mPDAI) が5以上) にて優位に増加しており、mPDAIスコアとの正の相関を認め、最大90%を占めている回腸囊炎患者を認めた (図1)
- ② 抗菌剤治療が著効した患者において、治療前に約40%を占めていたFusobacteriaceaeがほぼ消失した例を3例認めた。
- ③ Lachnospiraceae、Bifidobacteriaceaeが回腸囊炎にて優位に減少しており、それぞれmPDAIスコアと負の相関を認めた。

(2) 病因に関連する可能性のある細菌の分離

- ① 炎症あるいは病原性常在細菌 (Pathobiont) として、Fusobacteriaceae、Pasteurellaceae、Enterobacteriaceae、Erysipelotrichaceaeを上げることが出来、一部の細菌を単離培養し保存した。
- ② 恒常性維持に関わる細菌群 (Symbiont) として、Lachnospiraceae、Bifidobacteriaceae、Bacteroidaceae、Clostridiaceaeを上げることが出来、一部の細菌を単離分離し、保存した。

(3) マウスを用いた細菌叢、及び単離細菌の病理学的検討 (図 2)

- ① mPDAI high scoreサンプルは、low scoreサンプルに比べて、マウス大腸において炎症細胞を優位に増加させた。
- ② (1) ②にて示した症例から得られた細菌は、マウス大腸にて炎症細胞を優位に増加させた。
- ③ これらの結果から、①mPDAI highの患者サンプルには、炎症を引き起こしうる細菌が存在することが示され、その候補として、Fusobacteriaceae、Enterobacteriaceaeを上げることが出来た。さらに、②mPDAI lowの患者サンプルには、可能性として炎症を抑制する細菌が存在することを示し、その候補として、Lachnospiraceae、Bifidobacteriaceaeを上げることが出来た。

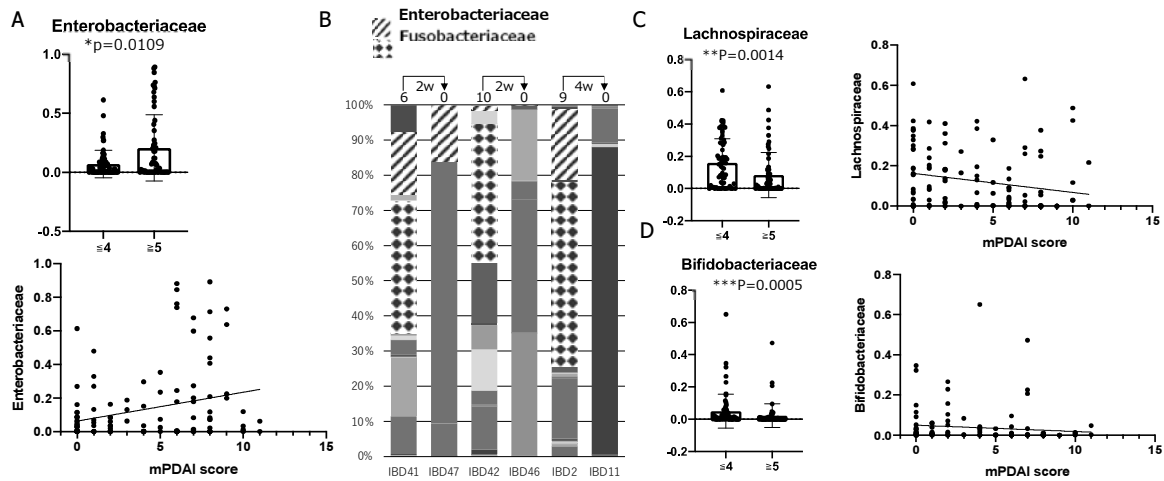


図1. 回腸囊における Pathobiont と Symbiont の候補
 (A) 回腸囊炎患者 (mPDAI が 5 以上: 上グラフの二番目のカラム) にて Enterobacteriaceae が優位に増加しており (上)、その細菌叢における割合と mPDAI score との間には優位な正の相関を認めた ($R=0.2628$, $P=0.0032$) (下)。(B) IBD41-47、IBD42-46、IBD2-11 の 3 人の患者のシクロキサン治療による細菌叢変化を示す。上の矢印 (治療経過を示している) が示すように、mPDAI スコアが 2-4 週間の間に顕著に改善しており、その間に Fusobacteriaceae が消失している。(C, D) 回腸囊を持つが回腸囊炎ではない患者では、Lactospiraceae と Bifidobacteriaceae が優位に増加している。それぞれの割合と mPDAI スコアとの間に、優位な負の相関を認めた (Lactospiraceae: $R=-0.2708$, $P=0.0024$, Bifidobacteriaceae: $R=-0.259$, $P=0.0037$)。

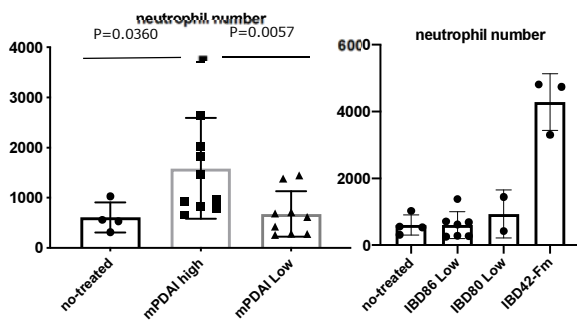


図2. mPDAI high のサンプル (糞便) と Fusol による炎症
 (左) mPDAI スコアが高い患者 (mPDAI high)、低い患者のサンプル (mPDAI Low) をマウスに移植し、移植しなかったマウス (no-treated) と比較した。大腸粘膜固有層における neutrophil が、スコアの高い患者由来サンプルの移植によって優位に増加した。(右) Fusobacteriaceae が優位で抗生剤治療にて完全に消失し、寛解となった患者 (IBD42) から嫌気培養にて Fusol を分離し、マウスに移植した。その結果、スコアの低い患者サンプル (IBD86, 80) に比較し、顕著に neutrophil を増加させた。

4. 研究の反省・考察

現在まで、概ね計画通り研究を遂行することが出来ている。すでに、病因に関連する可能性のある細菌の単離が行われ、マウスへの投与による検討実験が進められている。マウスへの投与実験は、予め抗生剤によるマウス常在細菌の除去をもとに行っているため、マウスの水分摂取が落ち (抗生剤入の水をマウスが嫌うため)、細菌投与前にやや脱水状態となる。これらの影響、さらに、常在細菌叢の除去率などを考慮して、実験結果を考える必要がある。したがって、細菌叢によるマウスへの病原性に関する検討に、無菌マウスを用いた検討も視野に入れて今後の検討を進める予定である。さらに、細菌を種レベルまで決定する必要があるため、さらに deep sequence を行うことも視野に入れて検討を行っていく予定である。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
なし
- (2) 口頭発表
なし
- (3) 出版物
なし