

学 校 名	兵 庫 医 科 大 学	研究所名等	
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	兵 庫 医 科 大 学 部 兵 医 学	主 任 教 授	研究統括、細菌叢解析、細菌単離、動物実験

## ○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 椋 英 樹	兵 庫 医 科 大 学 部 兵 医 学	講 師	細菌叢・免疫細胞解析、動物実験
孫 安 生	兵 庫 医 科 大 学 部 兵 医 学	助 教	細菌叢・免疫細胞解析、細菌単離、動物実験
池 内 浩 基	兵 庫 医 科 大 学 部 兵 医 学	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	兵 庫 医 科 大 学 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 科 学 研 究 セ ン タ ー	チ ーム リ ー タ 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 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 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検討 (2021 年度までに収集したサンプルについての統合的解析)
- ① 検査時における抗菌剤 (シプロキサ) 投与の有無別に次の点についての検討を行う
    - ア alpha diversity, beta diversity と臨床スコア mPDAI との関係についての解析
    - イ 臨床スコア mPDAI および Calprotectin との相関を持つ細菌の同定
    - ウ 抗菌剤治療前後での細菌叢の変化の同定
- (2) 回腸囊炎患者の細菌叢における pathobiont、symbiont の探索
- ① アから得られた pathobiont、symbiont の候補菌の毒性に関する in vivo での検討

## 3. 研究の成果

- (1) 回腸囊炎患者の糞便における検討 (2021 年度までに収集したサンプルについての統合的解析)
- ① 検査時における抗菌剤 (シプロキサ) 投与の有無別についての検討

ア alpha diversity, beta diversity と臨床スコア mPDAI との関係についての解析

抗菌剤投与有無の区別なしでの total 165 サンプルの解析の結果

a. alpha diversity (Shannon) と mPDAI あるいは calprotectin との関連

alpha diversity と mPDAI とは  $R=-0.21$ ,  $p=0.007$ 、alpha diversity と calprotectin とは  $R=-0.27$ ,  $p=0.001$  でありそれぞれ優位な相関が認められた。回腸囊炎の重症度によって、細菌叢の多様性が減少することが明らかとなった。

b. beta diversity と mPDAI あるいは calprotectin との関連

beta diversity (Bray Curtis) とそれぞれの相関は、 $p=0.002$  (mPDAI)、 $p=0.016$  (calprotectin) と優位であった。これらのことから、回腸囊炎の重症度によって、細菌叢構成が変化することが明らかとなった。

エントリーの際に抗菌剤投与を受けていなかった症例 (101 サンプル) での検討

a. mPDAI と calprotectin の関連

初診時に抗菌剤投与を受けていなかった群にて、 $R=0.65$ ,  $p<0.001$  と優位な相関が認められ、臨床所見と実際の炎症状態がリンクすることが明らかとなった。

b. alpha diversity と mPDAI あるいは calprotectin との関連

alpha diversity (Shannon) と mPDAI は  $R=-0.21$ ,  $p=0.038$ 、alpha diversity (Inverese Simpson) と calprotectin は、 $R=-0.2$ ,  $p=0.047$  であり、それぞれ優位な相関が認められた。抗菌剤投与有無を区別しない検討と同様の結果であり、回腸囊炎の重症度によって細菌叢の多様性が減少することが明らかになった。

イ 臨床スコア mPDAI との相関を持つ細菌の同定 (Phylum, Family, Genus レベルでの検討)

抗菌剤投与有無の区別なしでの total 165 サンプルの解析の検討

Phylum での検討では、Firmicutes が mPDAI と負の相関 ( $R=-0.19$ ,  $p=0.015$ )、Proteobacteria が正の相関 ( $R=0.22$ ,  $p=0.004$ ) を示した。Family での検討では、Lachnospiraceae, Bifidobacteriaceae, Clostridiaceae 1, Ruminococcaceae, Veillonellaceae が mPDAI と負の相関と示し、Enterobacteriaceae, Actinomycetaceae, Saccharimonadaceae が mPDAI と正の相関を示した。Genus での検討では、[Ruminococcus] gnavus group, Bifidobacterium, Clostridium sensu stricto 1 が mPDAI を負の相関を示した。Gemella, Rothia が mPDAI と正の相関を示した。

エントリーの際に抗菌剤投与を受けていなかった症例での検討

基本的に抗菌剤投与有無の区別なしでの検討と同じ結果であった。Phylum では、

FirmicutesがmPDAIと負の相関、ProteobacteriaがmPDAIと正の相関を示した。Familyでの検討では、Lachnospiraceae, Bifidobacteriaceae, Ruminococcaceae, ErysipleotrichaseaeがmPDAIと負の相関と示し、PasteurellaceaeがmPDAIと正の相関を示した。Genusでの検討では、[Ruminococcus] gnavus group, BifidobacteriumがmPDAIを負の相関を示した。FusobacteriumがmPDAIと優位に正の相関を示した。

#### ウ 抗生剤治療前後での細菌叢の変化の同定

エントリー時に抗生剤の投与を受けていなかった21人の回腸囊炎患者について、抗生剤（シプロキサ）による治療前後での細菌叢変化と、治療効果との相関について検討を行った。その結果、alpha diversity (Shannon)は、治療効果と関係なく、効果ありと、効果なし群で両者ともに減少傾向を示しており、優位な差は認められなかった。Phylumレベルでの検討にて、Firmicutesが、治療奏効群にて優位に抗生剤治療後に増加し、Proteobacteria、Fusobacteriaが優位に減少した。これらの結果と前述の結果（回腸囊炎のmPDAIと相関する細菌変化）を合わせると、Firmicutesの減少、Proteobacteriaの増加が回腸囊炎の原因である可能性を強く示唆していると考えられた。

#### (2) 回腸囊炎患者の細菌叢における pathobiont、symbiont の探索

##### ①アから得られたpathobiont、symbiontの候補菌の毒性に関するin vivoでの検討

(1)①から、Proteobacteria、Fusobacteriaに属する細菌が、pathobiontの候補と考えられた。したがって、それぞれに属する細菌を単離培養し、マウスへの投与実験にてそれらの病原性についての検討を行った。マウスは予め抗生剤にて常在菌を消失させ、その後、単離された候補細菌を移植し、約30日後にマウス大腸の粘膜固有層における炎症性細胞の数、炎症性マーカーについての検討を行った。その結果、Fusobacteriaに属する細菌がマウスの大腸にて生着し、その増加により炎症性細胞数が増加することを見出した。しかしながら、炎症マーカーの上昇は認められなかった。symbiontの候補細菌として、Lachnospiraceae, Bifidobacteriaceaeに属する細菌が候補として挙がり、それらを分離した。それらをマウスへの投与実験によって、炎症抑制作用の検討を行ったが、残念ながら、優位に炎症を抑制するとの結果を得ることは出来なかった。

## 4. 研究の反省・考察

#### (1) 回腸囊炎患者の糞便における検討（2021年度までに収集したサンプルについての統合的解析）

①今回の検討から、回腸囊炎の発症原因としての細菌群の有力候補を得ることが出来た。これらの結果は欧州での結果と同様であることから、さらなる検討によって、日本のみではなく、世界レベルにおける原因細菌の同定に向かうことが出来ると考えられる。本施設は、炎症性腸疾患の治療において日本有数のハイボリュームセンターであることから、引き続き解析を行い、世界へ重要な発信ができるものとする。

#### (2) 回腸囊炎患者の細菌叢における pathobiont、symbiont の探索

①我々の研究施設は、gnotobionteを用いての検討が出来ない状態であった。その中で、抗生剤により常在菌を消失させることによって、マウスへの投与実験を行ったが、抗生剤のみによるdysbiosisによる炎症によって解析が困難となった。すなわち、コントロールにてすでに、dysbiosisによる腸炎がおり、pathobiontの検討が極めて困難であった。その中で、Fusobacteriaがマウス腸管に生着し、炎症前状態を誘起する可能性が得られたことは、評価に値するものであると考える。まずは、この結果をもとに、さらに研究環境を整えgnotobionteを用いてのpathobiontの検討を行いたいと考えている。さらには、マウスでのヒト細菌叢の検討が出来る環境の構築が必要であるとも考えている。ヒト由来の細菌がマウスにて定着することで初めて詳細な病理学的な解析が可能になると考えられることから、様々なヒト細菌がマウスにて生着出来るマウスモデルの構築が、これからのヒト細菌叢のin vivoでの解析に重要であると考えられた。具体的には、ヒト由来細菌のレセプターを持つ遺伝子改変マウスの作成などを今後検討したいと考えている。

## 5. 研究発表

#### (1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①2021年度近畿腸管微生物研究会 研究発表会 ヤクルト本社中日本支店 2021年6月12日

(3) 出版物

なし