

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15284

研究課題名(和文)炎症性腸疾患患者の免疫系と腸内細菌叢を移植したヒト化マウスで腸炎は再現できるか？

研究課題名(英文)Gene-microbiota interaction of inflammatory bowel disease

研究代表者

角田 洋一 (Kakuta, Yoichi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50509205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝的背景と腸内細菌叢との関連を見るため、代表的な環境の探索を試みた。疾患感受性を示す遺伝子多型以外に、パネート細胞異常に異なる遺伝子の多型が関係していることが判明した。腸内細菌叢について潰瘍性大腸炎患者16名について、同一患者内での腸管内の細菌叢を盲腸およびS状結腸の2か所において採取し、次世代シーケンサーでの解析を行った結果、同一患者においても、炎症部位と非炎症部位では細菌叢の多様性が有意に変化していることが判明した。以上から、遺伝的背景も腸内細菌叢のいずれにおいても、疾患を代表する組み合わせを選択するには多種多様なパターンを作成する必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To see the interaction between the genetic background and gut microbiota in Japanese patients with inflammatory bowel disease (IBD), we investigated the 'typical' signature of genetics and microbiota of IBD. The genetic background was known to be associated with IBD, but we found that it was associated with abnormal Paneth cells in Japanese CD. We also investigated the gut microbiota from 16 Japanese patients with ulcerative colitis, the diversity of microbiota was significantly different between the involved region and non-involved region even in the same patient. From the above, further analysis will be needed to prepare the model to see the gene-environmental interaction in IBD.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎とクローン病からなる炎症性腸疾患は、消化管の慢性炎症によって様々な症状や合併症を引き起こし、著しく患者のQOLを害する原因不明の難病である。その発症には遺伝要因と環境要因が関わるとされ、遺伝要因としては、現在までに163もの感受性多型が報告されており、環境要因としては腸内細菌叢が重要な要因として注目されている。

(1) 健常人腸内細菌叢移植は炎症性腸疾患の治療法として検討されている

腸内細菌叢が疾患の病態に強く関わっていることが基礎的な研究によって示されてきているが、実際に健常人の腸内細菌叢を患者に移植することで寛解導入するという試みが行われ有効であると報告されている。このことは、実際にヒトの患者で腸内細菌叢が病勢の悪化による結果だけでなく、原因、あるいは増長する因子であることを示している。

(2) 骨髄移植による免疫系リセットはクローン病に有効である

骨髄移植によるクローン病の寛解導入治療の報告があり、欧米を中心に臨床試験が進んでいる。長期の寛解維持効果もあることが自験例でも確認されており、骨髄移植による免疫システムの入替え(リセット)が有効であることは、腸内細菌だけではなく宿主側の免疫システムが重要であるということを示している。

(3) 遺伝要因だけでは疾患の病因の1割程度しか説明できない

欧米では163もの感受性遺伝子多型が報告されているが、それだけでは疾患要因(表現型分散)のクローン病では13.6%、潰瘍性大腸炎では7.5%しか説明できていない。これは、遺伝要因だけでは発症しないことを意味し、環境要因との相互作用の存在を示唆するものである。

(4) 患者の遺伝背景と腸内細菌叢の両方を再現した実験モデルが必要である

以上より、炎症性腸疾患は、その発症要因を遺伝的に持つヒトにそれと相互作用がある腸内細菌叢が形成されることで発症するという仮説が現在最も有力である。しかし、複雑な宿主免疫系と腸内細菌叢の相互作用の再現には、in vivoでの検討が必要であるが、ヒトで再現することは難しく、適切な実験モデルの登場が期待されている。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患の発症における腸内細菌叢・遺伝的背景の相互作用の重要性を明らかにする。遺伝背景と環境因子をコントロールし、疾患の発症のトリガー因子や、再燃に関わる因子、遺伝背景の違いによる細菌叢の定着の違いなど、宿主要因と環境要因の相互作用を

再現できる、新規の炎症性腸疾患マウスモデルを確立する。遺伝要因、環境要因の相互作用を見るために、両方の要因を一つのモデル動物で展開する研究は初めてであり、実現すれば疾患が発症に至る複雑な相互作用メカニズムの解明のために必要な系が確立され、この系を用いればさらなる研究展開が期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝的背景と環境要因との相互作用を確認するため、患者(健常人)の遺伝背景を持つ血球系細胞を移植したヒト化マウスの作成と、ヒト腸内細菌叢のマウスへの移植という二つの要素を同一マウスに行って、その表現型としての腸炎の評価を行う。

(1) 代表的な遺伝的背景の同定

先行研究から得られている日本人炎症性腸疾患の遺伝的背景の解析結果をもとに、日本人炎症性腸疾患で特徴的な遺伝的背景を持つ患者を同定する。

また、腸内細菌叢との相互作用にかかわるような表現型(パネート細胞などの機能異常)を呈する特徴的な遺伝的背景がないかも検討する。具体的には、日本人用ジェノタイプングアレイによる全ゲノムタイピングを行った患者において、その回腸末端の組織におけるパネート細胞の形態異常にかかわる遺伝的背景を検討する。

(2) 代表的な腸内細菌叢の同定

ヒト腸内細菌叢をマウスに移植するにあたり、炎症性腸疾患患者を代表するような腸内細菌叢を評価、選択する。具体的には、炎症性腸疾患患者16名の盲腸、S状結腸の2か所から、内視鏡的に腸管洗浄液を採取し、16s-rDNAのV3-4領域のメタゲノム解析を次世代シーケンサで行う。これにより、腸管内で炎症がある部位、ない部位での腸内細菌叢の違いがないかを確認したうえで、炎症性腸疾患患者の腸内細菌叢として、典型的な変化を見つけ出し、それに最も近い便サンプルを選定する。

(3) 炎症性腸疾患患者および健常人ボランティア由来の造血幹細胞の作成

患者および健常人ボランティア由来iPS細胞の作製

奇形腫を介した造血幹細胞ドナーマウスの作成

造血幹細胞の採取

マウスの骨髄を採取し、抗ヒトCD3 4抗体とCD4 5抗体を用いてCD34陽性CD45弱陽性細胞を造血幹細胞としてソーティングし、マウスへの移植まで凍結保存する。

(4) 患者・健常人由来ヒト化マウスの作成
6-7週齢のNOD/Shi-scid, IL-2R null (NOG)マウスを入手する。これはすでに公益財団法人実験動物中央研究所が市販しているマウスである。T細胞、B細胞、NK細胞が欠損

している重度の免疫不全マウスでありヒトの造血幹細胞を移植すると定着しヒト免疫系を再構築することが可能である。

(5) ヒト化マウスへのヒト由来糞便移植
糞便移植は造血幹細胞移植後8週で施行する。ヒト化マウスの胃内にチューブを用いて投与する3種類のヒト化マウス(潰瘍性大腸炎・クローン病・健常人ボランティア由来)と3種類(同3人由来)の糞便サンプルで作成し、計3×3=9種類のマウスを作成する。

(6) ヒト糞便移植ヒト化マウスの評価
作成された9種類のマウスについて、以下の項目を糞便移植後20週まで評価する

(7) 移植後の腸内細菌叢の変化に関する検討

患者由来糞便移植を行ったマウスについては、移植した糞便中の腸内細菌と、移植後にマウスで定着した腸内細菌の比較を行う。

(8) 移植後のマウス免疫系細胞の評価
糞便移植後の経過中にマウスの免疫細胞がどの程度ヒト化できていたかを確認する。

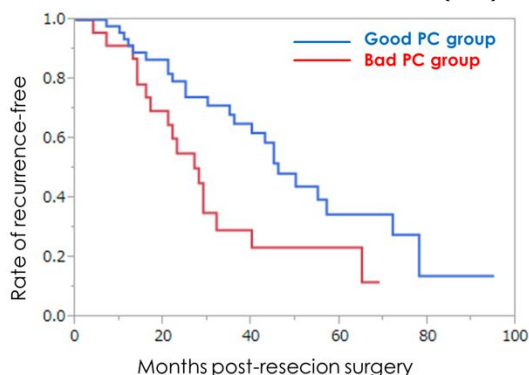
糞便移植後20週経過したマウスの血中、脾臓および腸管のリンパ球について、抗マウスCD45抗体と抗ヒトCD45抗体を用いたフローサイトメトリーで、どの程度がヒト化できていたかを確認し、実験系としての妥当性を評価する。

4. 研究成果

(1) 腸内細菌叢にかかわるパネート細胞は、遺伝的な背景によって形態異常を呈することがあり、クローン病では術後の再燃率に変化をもたらす。

代表的な遺伝的背景を確認するため、先行研究の結果を参考にして、特徴的な遺伝的背景を確認し、HLA, TNFSF15のIBDのリスク遺伝子型を持つ症例を選定した。

その一方で、腸内細菌叢との相互作用の上で重要なパネート細胞の異常も遺伝的に決定されているという報告が海外であった。そのため、日本人での遺伝的背景の中にもパネート細胞をきたすグループがないかどうかを検討した。その結果、日本人においてパネート細胞の異常を伴うクローン病の存在が確認された。さらに、術後の再燃までの期間はパネート細胞異常が多い群は少ない群よりも有意に短いことが確認された。(図)



欧米で認められている ATG16L1 T300A 遺伝子多型とパネート細胞異常との相関は認められなかったが、GWASではLRRK2遺伝子のアミノ酸置換をもたらす多型など、自然免疫やオートファジーに関連する遺伝子とパネート細胞異常との相関が示唆された(表)。そのため、このような遺伝的背景も腸内細菌叢との相互作用がある可能性もあり、遺伝要因の候補とした。

SNP ID	gene	function	P
rs2296441	PYROXD2	Ala533Thr	1.34E-05
rs28364680	MFSD1	Pro73Ser	1.91E-05
rs12224646	PATE4	Cys90Gly	4.45E-05
rs3742076	FOXO1	Ser627Pro	1.42E-04
rs4841399	RP1L1	Pro1495Arg	1.49E-04
rs3732675	CAND2	Ser533Pro	2.44E-04
rs2282542	CEP192	Val1365Met	3.61E-04
rs3761863	LRRK2	Met2397Thr	3.62E-04

(2) 腸内細菌叢は同一患者においても、部位による炎症の違いを大きく受ける

16症例・全32検体について、その菌叢の多様性(Shannon index)に影響を与えるパラメータを確認するため、一般化線形モデルを用いた多変量解析を行ったところ、性別、診断時年齢、内視鏡時年齢、採取部位では相関を認めなかったものの、Mayo内視鏡所見サブスコアで有意な相関をみとめた($p=0.0357$, $=-0.332$)。また、内視鏡スコアが盲腸とS状結腸で2点以上異なる症例(A群6例)と、2か所の内視鏡スコアの差が1点以下の症例(B群10例)について、盲腸とS状結腸での多様性指標の差が、B群よりも有意にA群で大きいことが分かった。($p=0.0225$, Mann-Whitney U test)

このことから、腸内細菌叢と内視鏡スコアとの関係性を、同一患者同一日の部位が異なる検体で認めた。しかし、同意患者でも部位による変化が認められることから、日本人炎症性腸疾患に特徴的な腸内細菌叢を決定することはできなかった。

遺伝的背景も多彩である一方で腸内細菌叢も多彩であり、これらすべてを再現できるモデルの作成は困難であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

(1) Liu TC, Naito T, Liu Z, VanDussen KL, Haritunians T, Li D, Endo K, Kawai Y, Nagasaki M, Kinouchi Y, McGovern DP,

Shimosegawa T, Kakuta Y, Stappenbeck TS.
LRRK2 but not ATG16L1 is associated with
Paneth cell defect in Japanese Crohn's
disease patients. JCI Insight. 2017 Mar
23;2(6):e91917,doi:
10.1172/jci.insight.91917. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 角田洋一、横山直信、下瀬川徹、「潰瘍性大腸炎患者における大腸部位別の腸内細菌叢と内視鏡的活動性との関係性について」第93回日本消化器内視鏡学会総会、2017年5月13日、ワークショップ [内視鏡を用いた腸内微生物叢へのアプローチ]、大阪国際会議場(大阪)

(2) Naito T, Liu TC, Kakuta Y, Head R, Liu Z, Haritunians T, Li D, Endo K, Kinouchi Y, McGovern D, Stappenbeck Tm Shimosegawa T, Paneth Cell Phenotype is Associated With Novel Genetic Determinants and Clinical Outcome in Japanese Crohn's Disease Patients, Digestive Disease Week 2016, 2016年5月23日, サンディエゴ(アメリカ合衆国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田 洋一 (KAKUTA, Yoichi)

東北大学・病院・助教

研究者番号：50509205