

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09374

研究課題名(和文)腸肝指向性腸内細菌と肝臓内免疫応答を介した原発性硬化性胆管炎の進展機序の解明

研究課題名(英文)Role of gut microbiota in the pathogenesis of primly sclerosing cholangitis

研究代表者

中本 伸宏 (NAKAMOTO, NOBUHIRO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：40383749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：PSC患者由来糞便微生物を無菌マウスに移入したヒトフローラ化マウス(PSCUCマウス)において肝臓内TH17細胞の増加を認め、同マウスの腸間膜リンパ節から*Klebsiella pneumoniae* (KP)、*Proteus mirabilis* (PM)、*Enterococcus gallinarum* (EG) のbacterial translocation (BT)誘導菌3菌を分離した。定量PCRの結果、上記BT誘導菌はPSC患者の糞便中に高率に検出され(PSC/UC患者18名中17名で検出)、腸管病変を有するPSCの診断マーカー、および治療標的として有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発性硬化性胆管炎(Primary Sclerosing Cholangitis; PSC)は肝臓内外の胆管に障害を認め胆汁うっ滞をきたす原因不明の自己免疫性疾患である。本邦における総患者数は約2,000名と推計され今後患者数の増加が予想される。高率に肝硬変への進展、胆管癌の合併を認め、肝移植以外に根本的な治療法が存在せず新規治療法の開発が待たれている。本研究課題の成果により、PSC患者に効率的に存在する腸内細菌が病態の発症、および進展に寄与する可能性が示唆された。また、PSCの新規バイオマーカー、また治療標的としての有用性も期待され、学術的、社会的に大きな意義を有する成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Primary sclerosing cholangitis (PSC) is a chronic inflammatory liver disease and its frequent complication with ulcerative colitis highlights the pathogenic role of epithelial barrier dysfunction. Intestinal barrier dysfunction has been implicated in the pathogenesis of PSC, yet its underlying mechanism remains unknown. Here, we identify *Klebsiella pneumoniae* in the microbiota of PSC patients and demonstrate that *K. pneumoniae* disrupts the epithelial barrier to initiate bacterial translocation and liver inflammatory responses. Gnotobiotic mice inoculated with PSC-derived microbiota exhibited T helper (Th)17 cell responses in the liver. Bacterial culture of mesenteric lymph nodes in these mice isolated *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, and *Enterococcus gallinarum*, which were prevalently detected in PSC patients. These results highlight the role of pathobionts in intestinal barrier dysfunction and liver inflammation, providing insights into therapeutic strategies for PSC.

研究分野：消化器内科

キーワード：原発性硬化性胆管炎 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

原発性硬化性胆管炎(Primary Sclerosing Cholangitis; PSC)は肝臓内外の胆管に障害を認め胆汁うっ滞をきたす原因不明の自己免疫性疾患である。本邦における総患者数は2,300名と推計され今後患者数の増加が予想され、国の難病特定疾患に認定されている。高率に肝硬変への進展、胆管癌の合併を認め、肝移植以外に根本的な治療法が存在せず新規治療法の開発が待たれている。PSCの病因として多くの遺伝的要因、免疫学的要因、環境的要因の関与が報告されているが病態の解明には至っていない。PSCは高率に炎症性腸疾患を合併することを特徴とし、一部の症例において抗生物質の投与により肝胆道系酵素の改善が認められることから、疾患特異的な腸内細菌が胆管-腸-肝臓を循環する免疫細胞との相互作用を介してPSCの病態に寄与することが予想される。近年のPSC患者の大腸生検検体や糞便検体を用いた検討においても、健康人と比較して腸内細菌叢の種類や多様性が有意に低下していることや、特定の腸内細菌叢が増加していることが報告されている。

2. 研究の目的

これらの背景、知見をもとに本研究において、疾患特異的腸内細菌が胆管-腸管-門脈-肝臓を経由する腸肝循環を介した肝臓内免疫細胞との相互作用によりPSC病態に寄与する、という仮説を疾患モデルマウス、患者臨床検体を用いた検討で検証する。さらにトランスレーショナル研究としてノトバイオート技術を用いたヒトフローラ化無菌マウスの検討を行い、疾患特異的腸内細菌叢の制御によるPSC進展抑制の可能性を探り、新規治療薬の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)患者糞便検体を用いた腸内細菌の解析

(2)疾患腸内細菌移植ノトバイオートマウスの疾患感受性の検討

PSC患者由来腸内細菌を無菌マウスに投与しノトバイオートマウスを作成し、肝臓、大腸、小腸をはじめとする各臓器における免疫細胞の誘導を検証した。さらに、上記ノトバイオートマウスの実験的肝障害・肝線維化の感受性、抗生剤投与による肝臓内免疫細胞誘導能の増強、減弱の有無を評価した。

4. 研究成果

(1)当院に通院中の腸管病変を合併したPSC患者18名について、糞便中の腸内細菌の16S rRNAを用いたメタゲノム解析を行い、潰瘍性大腸炎(UC)患者および健康人コントロール(HC)と比較検討した。PSC患者において健康人コントロールと比較して有意に腸内細菌叢の多様性が低く、またUniFrac解析の結果、PSC患者の糞便中の腸内細菌はUC、健康人と比較して類似度が異なる集団に属していた。さらに構成する各腸内細菌の解析の結果、PSC患者においてProteobacteria(Phylum)、中でもEnterobacteriaceae(Family)が有意に増加していた。

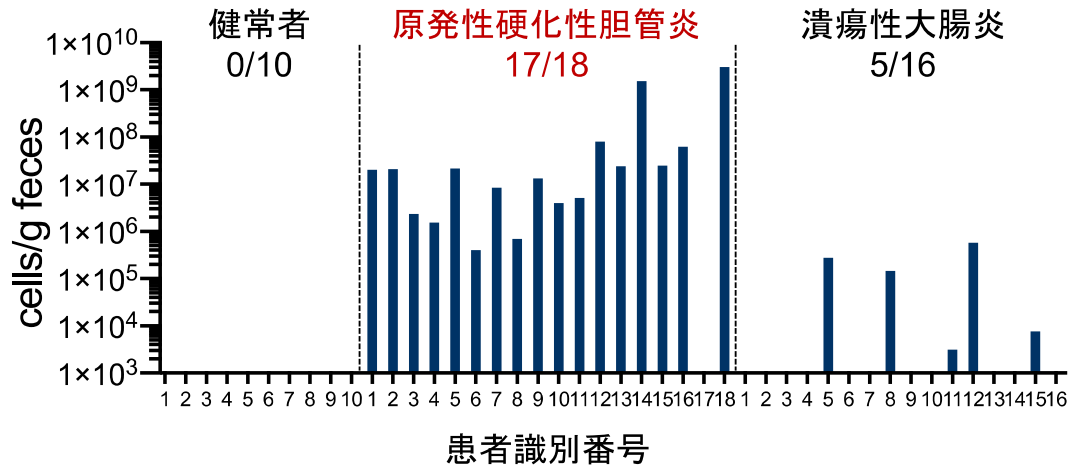
(2)腸内細菌叢と免疫細胞との相互作用を明らかにするために、患者由来糞便微生物を無菌マウスに経口的に移植しヒトフローラ化マウスを作製し、移植21日後に小腸、大腸、肝臓、脾臓各臓器における免疫細胞の解析を行った。健康人由来糞便微生物を無菌マウスに移植したHCマウス、同様にUCマウス、PSCマウスいずれにおいても無菌マウスと比較して、大腸IL-17産生T細胞(Th17)数の有意な増加を認めた。一方HCマウス、UCマウス、PSCマウス間で大腸Th17数の差は認められなかった。興味深いことにPSCマウスにおいて無菌マウス、HCマウス、UCマウスと比較して肝臓内Th17の増加を認めた。さらにPSCマウスは他のマウスと比較して3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC)投与により惹起した二次性胆管炎、肝線維化の増悪を認めた。本結果からPSC患者腸内細菌に肝臓内免疫応答性Th17誘導に寄与する腸内細菌が存在する可能性が示唆された。

(3)PSC患者由来糞便微生物を移植したPSCUCマウスの腸間膜リンパ節からKlebsiella pneumonia (KP)、Proteus mirabilis (PM)、Enterococcus gallinarum (EG)のbacterial translocation (BT)誘導菌3菌を分離した。EUB338を用いたFISH法により、上記3菌を移植したノトバイオートマウスにおいてSPFマウスで認められない菌の大腸上皮移行像を認めた。

(4)定量PCRの結果、上記BT誘導菌3菌はPSC患者の糞便中に高率に検出され(KP; PSC/UC: 17/18, UC: 5/16, HC: 0/10)、腸管病変を有するPSCの診断マーカー、および治療標的として有用である可能性が示唆された(次ページ図参照)。

(5)ヒト腸管上皮オルガノイドと腸内細菌の共培養の結果、PSC患者由来KPは上皮障害能を有することを見出した。興味深いことにPSC患者以外のサンプルから分離したKPは大腸上皮に対する上皮障害能を有さず、本菌が腸管バリアの破壊、BT、肝臓TH17誘導を介して病態に寄与する可能性が示唆された。

患者便サンプル中 クレブシエラ・ニューモニエの定量



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

(1)

著者名

Nakamoto N, Sasaki N, Aoki R, Miyamoto K, Suda W, Teratani T, Suzuki T, Koda Y, Chu PS, Taniki N, Yamaguchi A, Kanamori M, Kamada N, Hattori M, Ashida H, Sakamoto M, Atarashi K, Narushima S, Yoshimura A, Honda K, Sato T, Kanai T.

論文標題

Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver Th17 immune responses in primary sclerosing cholangitis

雑誌名

Nature Microbiology 2019年4月号 492-503 DOI; 10.1038/s41564-018-0333-1

査読 有り

〔学会発表〕(計1件)

(1)

発表者名

Nobuhiro Nakamoto

発表標題

Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver Th17 immune responses in primary sclerosing cholangitis

学会名

EASL annual meeting 2019

発表年

2019年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称: Pore-forming *Klebsiella pneumoniae* strains enriched in primary sclerosing cholangitis trigger bacterial translocation and pathogenic Th17 priming in the liver

発明者: 中本伸宏

権利者: 中本伸宏

種類: 特許

番号: 2018-082192

出願年: 2018年

国内外の別: 国内

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

原発性硬化性胆管炎の病態に関与する腸内細菌を発見 - 腸内細菌を標的とした新たな治療法の開発に期待 - <https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2019/1/15/28-50637/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：須田 互

ローマ字氏名：SUDA, Wataru

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命医科学研究センター

職名：副チームリーダー

研究者番号（8桁）：20590847

研究分担者氏名：福田 真嗣

ローマ字氏名：FUKUDA, Shinji

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：政策・メディア研究科

職名：特任教授

研究者番号（8桁）：80435677

(2)研究協力者

研究協力者氏名：楮 柏松

ローマ字氏名：CHU, Po-Sung

研究協力者氏名：谷木 信仁

ローマ字氏名：TANIKI, Nobuhito

研究協力者氏名：寺谷 俊昭

ローマ字氏名：TERATANI, Toshiaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。