

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07905

研究課題名(和文)潰瘍性大腸炎における移植便中細菌の定着に関わる免疫機構の研究

研究課題名(英文) Role of immune reaction during fecal microbiota transplantation in ulcerative colitis

研究代表者

北村 和哉 (Kazuya, Kitamura)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：00579633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎は原因不明の腸管の慢性炎症性疾患であるが、その一因に腸内細菌叢の乱れが存在する。この乱れを是正する方法として糞便細菌叢移植がある。糞便細菌叢移植を成功させる要素として、移植細菌の患者粘膜への生着が重要である。本研究では、移植細菌が患者粘膜に生着する免疫学的機序を明らかにすることを目的とした。本研究の結果、糞便細菌叢移植の移植細菌の生着に、ステロイドが負の役割を果たすことが明らかとなった。このステロイドの作用は、主に粘液中のMUC2の発現抑制によるものであり、外的に粘液を投与したり、内的な粘液分泌を促すレバミピド投与で、移植細菌叢の生着が改善することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎は、原因不明の難病であり、本邦でも世界的にも患者数は増加の一途を辿っている。患者増加の一因に、衛生環境や食習慣の変化に伴う腸内細菌叢の乱れの存在が挙げられており、その補正が重要な治療標的となる。その方法として注目されているのが糞便細菌叢移植である。今回、糞便細菌叢移植における粘液の重要性、粘液分泌を誘導する手法について研究を行い、効率よく移植細菌を生着させる新たな糞便細菌叢移植手技を確立した。

研究成果の概要(英文)：Ulcerative colitis is a chronic inflammatory disease of the intestinal tract of unknown cause, partly due to the disturbance of the intestinal flora. Fecal microbiota transplantation (FMT) is a method of correcting this disorder. Engraftment of the transplanted bacteria on the patient's mucosa is important as a factor for successful FMT. The purpose of this study was to clarify the immunological mechanism by which transplanted bacteria engraft in the patient's mucosa. The results of this study have revealed that steroids play a negative role in the engraftment of transplanted bacteria in FMT. The action of this steroid is mainly due to the suppression of MUC2 expression in mucus, and the engraftment of the transplanted bacterial flora is improved by external administration of mucus or administration of rebamipide that promotes internal mucus secretion.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：潰瘍性大腸炎 糞便細菌叢移植 粘膜免疫

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎は、原因不明の大腸の慢性炎症性疾患であり、本邦に約 30 万人の患者が存在する。世界的にも患者数は増加の一途をたどり、特に近代化が完了した国で患者数の急激な増加を認めている。潰瘍性大腸炎患者数増加の一因に、衛生環境や食習慣の変化に伴う腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) の存在が挙げられており、dysbiosis の補正が重要な治療標的と考えられている。その方法として注目されているのが便中細菌叢移植 (FMT; fecal microbiota transplantation) である。研究代表者は、これまで臨床研究として潰瘍性大腸炎患者に対し FMT を施行してきた (UMIN000020954)。その中で、FMT を成功させる要素として、ドナー細菌の患者大腸粘膜への定着が最も重要であると考えられるようになった。

### 2. 研究の目的

便中細菌叢移植 (FMT) において、移植便中細菌が定着する条件として、ドナー選択 (腸内細菌叢の組成)、FMT 回数 (細菌量)、投与経路 (パイエル板への曝露) が重要であると考えられたが、その背景にある病態は不明である。そこで本研究では、FMT における移植細菌の定着メカニズムを明らかにすることを目的とした。このメカニズムを解明することで、効果的かつ効率的な FMT 手技、さらには潰瘍性大腸炎の根治療法の確立が可能になると考えられた。

### 3. 研究の方法

潰瘍性大腸炎患者に便中細菌叢移植を行い、有効例と無効例の便中および直腸粘膜内の腸内細菌叢の組成を、16S rRNA の V3-V4 領域を PCR で増幅し、MiSeq (Illumina 社) を用いてシーケンシングし同定した。得られたデータは、QIIME™ を用いて細菌組成解析、UniFrac 法による距離計量・多様性解析を行った。また直腸粘膜の TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-12B、IL-22 などのサイトカイン、defensin、REG IIIa、REG IIIg などの抗微生物ペプチド、IgA、MUC2、MUC5AC などの免疫グロブリンや粘液の発現を比較検討した。またマウス炎症性腸疾患モデルを用いて、ヒト粘膜と同様に、移植細菌の生着に関わる分子の同定を行った。さらに、潰瘍性大腸炎患者の解析で、ステロイド長期投与が FMT における移植細菌の定着に負に作用することが明らかとなったため、マウス IBD モデルを用いて、FMT とステロイド投与の背景に存在する分子機構を明らかにした。

### 4. 研究成果

潰瘍性大腸炎患者に対して FMT を施行したところ、FMT 有効例では無効例に比して、腸内細菌叢の組成がドナー型に近づいていた。FMT 無効例の臨床背景を検討したところ、ステロイド依存例で FMT が無効であった。そのため、ステロイド投与が移植細菌の生着に負に作用すると考え、更なる検討を行った。このステロイドの作用は、レシピエントの粘膜免疫機構に作用し生じると考え、レシピエント直腸粘膜の TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-12B、IL-22 などのサイトカイン、defensin、REG IIIa、REG IIIg などの抗微生物ペプチド、IgA、MUC2、MUC5AC などの免疫グロブリンや粘液の発現を比較検討したところ、ステロイド依存例では大腸粘膜の MUC2 の発現ならびに粘液産生が有意に抑制されていることが明らかとなった (図 1 A, B)。また、マウス FMT モデルを用いて、ステロイド投与が FMT におけるレシピエント腸内細菌叢に及ぼす影響を検討したところ、同じドナー便を移植したにも関わらず、ステロイド投与の有無でレシピエント腸内細菌叢組成は有意に変化していた (図 2)。この結果より、MUC2 発現により分泌される粘液が、FMT において生着する細菌群を選別しており、ステロイド投与によって、この作用がキャンセルさせることが示唆された。実際に、ステロイド投与による粘液産生の抑制は、外的に粘液を投与したり、内的な粘液分泌を促すレバミピド投与で改善した (図 3)。本研究成果により、効率よく移植細菌を生着させる新たな糞便細菌叢移植手技確立の可能性が示唆された。

Figure 1

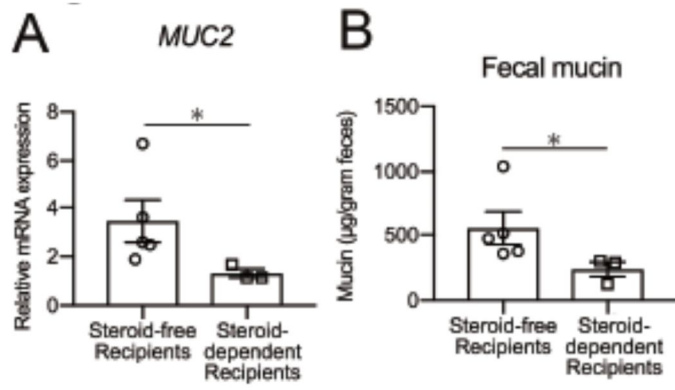


Figure 2

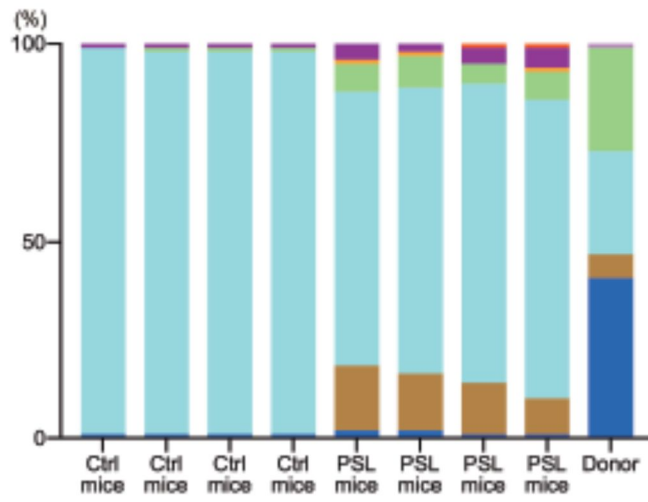
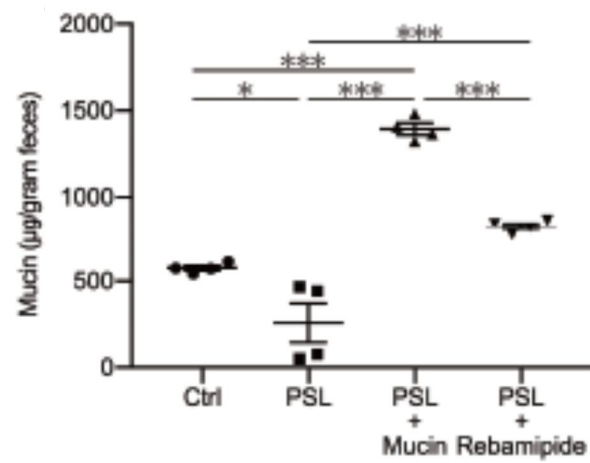


Figure 3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Seishima Jun, Iida Noriho, Kitamura Kazuya, Yutani Masahiro, Wang Ziyu, Seki Akihiro, Yamashita Taro, Sakai Yoshio, Honda Masao, Yamashita Tatsuya, Kagaya Takashi, Shirota Yukihiro, Fujinaga Yukako, Mizukoshi Eishiro, Kaneko Shuichi	4. 巻 20
2. 論文標題 Gut-derived Enterococcus faecium from ulcerative colitis patients promotes colitis in a genetically susceptible mouse host	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genome Biology	6. 最初と最後の頁 1, 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13059-019-1879-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okafuji Hirofumi, Iida Noriho, Kitamura Kazuya, Seishima Jun, Wang Ziyu, Yutani Masahiro, Yoshio Takatoshi, Yamashita Taro, Sakai Yoshio, Honda Masao, Yamashita Tatsuya, Fujinaga Yukako, Shinkura Reiko, Hamaguchi Yasuhito, Mizukoshi Eishiro, Kaneko Shuichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Oral Corticosteroids Impair Mucin Production and Alter the Posttransplantation Microbiota in the Gut	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 1~18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000522039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 北村和哉、林智之、岡藤啓史、飯田宗穂、鷹取元、水腰英四郎、金子周一
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎の治療標的としてのMayo Endoscopic Subscore 1の検討
3. 学会等名 日本消化器免疫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kitamura K, Okafuji H, Matsukawa H, Seishima J, Miyazawa M, Asahina Y, Hayashi T, Iida N, Takatori H, Kaneko S.
2. 発表標題 Management of anti-TNF antibody therapy for long-term remission of Crohn's disease.
3. 学会等名 UEG Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuya Kitamura, Hirofumi Okafuji, Yoshiro Asahina, Tomoyuki Hayashi, Hajime Takatori, Shuichi Kaneko
2. 発表標題 The Rutgeerts score can be a predictor for short-term prognosis of early Crohn's disease
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	飯田 宗穂	金沢大学・附属病院・助教	
	(Iida Noriho)		
	(40705604)	(13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関