

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15746

研究課題名(和文) 便細菌叢移植による腸内細菌叢の変化

研究課題名(英文) Changes in intestinal microbiota by FMT

研究代表者

岡藤 啓史 (Okafuji, Hirofumi)

金沢大学・附属病院・特任助教

研究者番号：20772958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近年増加している炎症性腸疾患の新しい治療、便細菌叢移植に関して効果及び合併症などを明らかにすることを目的とした。結果、潰瘍性大腸炎患者3名が寛解し、合併症は認めなかった。その過程で、ステロイド依存患者では効果が乏しいことに気づきマウス実験を追加した。マウスにステロイドを投与すると、大腸粘膜を保護するムチンを減少させさらに細菌叢を変化させた。ムチンを補充して、ステロイド投与マウスに便移植行くと、ムチンを補充しないマウスに比べて補充した方が便移植の治療効果が高いことが分かった。大腸ムチンは腸内細菌叢を制御し、ステロイドは大腸ムチンを減少させ腸内細菌叢を変化させていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年増加の一途を辿っている炎症性腸疾患は、既存の内科的治療で効果がなかった場合は最終的に手術で腸管切除となってしまう。そのような背景もあり、新しい治療法の開発が急務であった。今回、腸内細菌をターゲットとする新しい治療法、糞便細菌叢移植の効果が報告されているがその方法は確立されていなかった。今回私たちは、ステロイド依存の潰瘍性大腸炎に対する、便細菌叢移植の効果減弱の原因、及びその治療効果を上昇させるであろうムチンの関連に関して解明することができた。今後、炎症性腸疾患患者が便細菌叢移植を受ける際に、この研究結果によって治療効果が上昇する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the efficacy and complications of stool microflora transplantation, a new treatment for inflammatory bowel disease, which has been increasing in recent years. As a result, three patients with ulcerative colitis showed remission and no complications. In the process, we noticed that the effect was not good in steroid-dependent patients, so we added a mouse experiment. Administration of steroids to mice decreased mucin, which protects the colonic mucosa, and further altered the bacterial flora. When the mice were supplemented with mucin and then underwent fecal transplantation in steroid-treated mice, it was found that the treatment was more effective in the supplemented mice than in the non-supplemented mice. Colonic mucin regulates the intestinal microbiota, and steroids decreased colonic mucin and altered the intestinal microbiota.

研究分野：消化器内科

キーワード：便細菌叢移植 炎症性腸疾患

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(クローン病と潰瘍性大腸炎)は原因不明の難病である。治療には内科的薬物療法と外科的手術療法の2本の柱が存在する。ステロイドホルモン、免疫抑制薬、抗TNF抗体製剤などの薬物療法により寛解導入、維持し、腸管切除を回避するのが内科的治療の方針である。しかし、薬物療法抵抗例や重症例では外科的腸管切除を要する症例も存在する。問題は、これら既存の治療では簡単に寛解導入ができない症例や、薬物や切除で寛解に入っても再燃する症例がまだまだ多く存在することである。そこで新しい治療法として、腸内細菌を変化させる治療法“便細菌叢移植”の開発が進行している。しかしどのような細菌が粘膜に定着することが寛解に有効なのかは分かっていない。

## 2. 研究の目的

粘膜定着細菌叢の経時的な変化が、腸管の炎症と、便細菌叢移植の治療効果に及ぼす影響を相関関係から明らかにする。そのため下記の3つを行う。

- (a) 炎症性腸疾患患者に対する便細菌叢移植の後の粘膜細菌叢の変化をメタゲノム解析を用いて経時的に評価する
- (b) 臨床的寛解の有無、血清学的炎症の指標、内視鏡による炎症所見を経時的に評価し、細菌叢との相関をみる
- (c) 粘膜定着細菌叢は粘膜上皮細胞や免疫炎症細胞と相互作用することで、腸炎の病態を決定していると考えられる。よって、腸管組織の遺伝子発現、腸管組織の免疫組織染色を経時的に評価し、存在する粘膜定着細菌との相関を解析する。

## 3. 研究の方法

### (A) 便細菌叢移植の施行と臨床所見評価、内視鏡評価

ドナーの選択基準: Bakkenらが報告した便細菌叢移植ガイドライン(Bakken JS. The clinical journal of AGA2011)に準じ35項目以上を全てを満たす者とし、目標症例数は10人である。

レシピエントの選択基準: 軽症または中等症の炎症性腸疾患患者(クローン病または潰瘍性大腸炎)で既存の治療で寛解に至らない症例を対象とし、20人を予定する。

便細菌叢移植の実際: ドナーから得た便から浮遊液を作成し、第0日と第21日に全結腸内視鏡を用いてレシピエントとなる患者に移植を行う。臨床所見と内視鏡所見にて移植前、移植56日後の疾患活動性を評価し、移植の有効性を検討する。

### (B) ヒト便・腸粘膜検体を用いたメタゲノム解析

ドナー、レシピエントそれぞれの便かつ内視鏡下の生検で得られた直腸粘膜付着の細菌叢の解析のためにDNAを抽出し、16SrDNAのアンプリコンをIllumina社のMiseqを用いてシーケンシングする。得られたリードからクオリティのフィルタリングを行った後に、ソフトウェアQIIMEを用いて細菌の組成解析、UniFrac法による距離計量、多様性の計算を行う。また、便中細菌の遺伝子の代謝経路を知るために全ゲノムショットガンシーケンシングもMiseqにて行い、ソフトウェアHUMANにて存在する遺伝子とその経路について解析する。

便細菌叢移植で寛解となった群と、寛解にならなかった群の比較を行い、寛解となった群に特異的に変化した粘膜定着細菌叢を同定する。

### (C) 腸管粘膜の遺伝子発現・蛋白の免疫染色

腸管粘膜定着細菌叢は粘膜上皮と相互作用し病態に影響を与えられ、便細菌叢移

植前後の患者レシピエント、かつドナーの粘膜の遺伝子発現について cDNA microarray にて網羅的に解析を行う。移植によって寛解が得られた症例の遺伝子発現が、移植後にどう変化するかを理解する。また腸管組織の免疫組織染色によって、炎症・免疫細胞のマーカー CD68、CD4、CD8、Tbet、FoxP3 についても染色し移植前後での評価を行う。これらの分子の発現が、便細菌叢移植の寛解の有無、あるいは移植後の活動性スコアの改善とどのように関連するかを解析する。

(D) 粘膜定着細菌叢と、治療効果・粘膜分子発現の相関解析

(A) ~ (C) のそれぞれの解析で集めたデータから、便細菌叢移植での寛解群と非寛解群の比較を行う。寛解群で移植後有意に変化した粘膜定着細菌叢を同定する。また寛解群で移植後に有意に変化した粘膜組織発現遺伝子、免疫染色分子を明確にする。さらに、移植後に変化した細菌と発現遺伝子の相関を解析し、寛解に特異的な粘膜細菌 粘膜遺伝子の連関を明確にする。相関は Spearman または Pearson の相関解析にて行う。

4. 研究成果

(A) 潰瘍性大腸炎患者 8 人に対し、基準を満たしたドナー便を用いて便中細菌叢移植を施行した。重篤な合併症は認めず、4 例で Mayo スコアが改善し、3 例で内視鏡的スコアが改善した(図 1)。

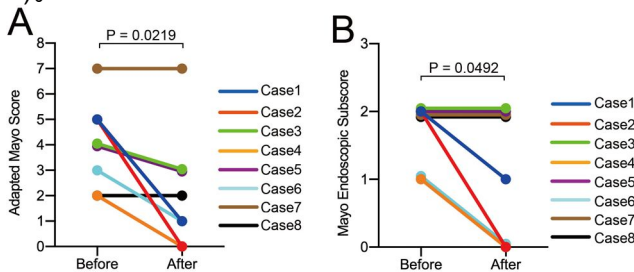


図 1. 便細菌叢移植により臨床的变化

(B) 便細菌叢移植を施行されたレシピエントの腸内細菌叢の変化を示す。UniFrac 解析の結果、56 日後の糞便細菌叢は、寛解患者ではドナーの細菌叢に近づくが、非寛解患者では細菌叢は近づくことはなかった。また大腸粘膜細菌叢では、両者とも細菌叢に変化はなかった(図 2)。

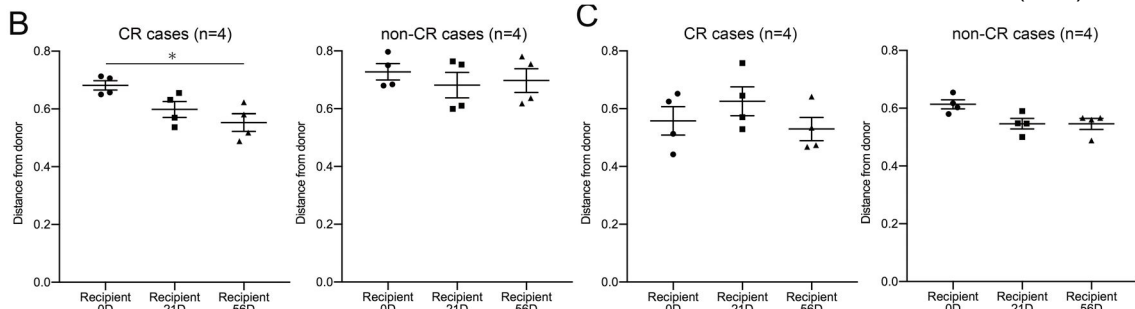


図 2. 便細菌叢移植による便中および大腸粘膜細菌叢の変化

(C) 便細菌叢移植で非寛解例では、ステロイド依存症例が多く含まれていた。そのことから、ステロイドが便移植の治療効果に影響している可能性を考えその原因を探求した。その結果、ムチンをコードする遺伝子 MUC2 がステロイド依存症例で発現が低下し、便中ムチンも減少していた(図 3)。

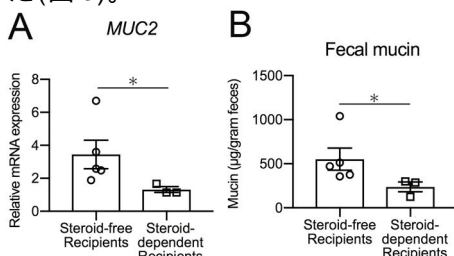


図 3. ステロイド有無による MUC2 発現および便中ムチン量

ステロイドの粘膜防御に関する影響を調べるためにマウス実験を行ったが、ステロイドを内服

したマウスで MUC2 遺伝子の発現が低下した(図 4)。

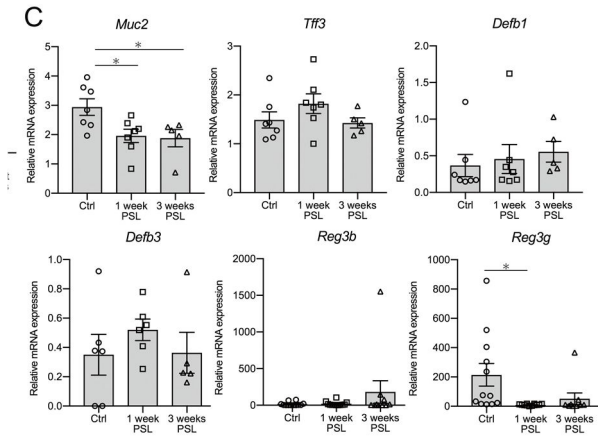


図 4 . 大腸粘膜防御遺伝子に対するステロイドの影響

ステロイド内服マウスにムチンを補充して便細菌叢移植を行うと、細菌叢がドナー便に近似し、ムチンを補充しない例と異なる便細菌叢を呈した(図 5)。これは、ムチンを補充すると便細菌叢移植の効果が改善する可能性を示唆する。

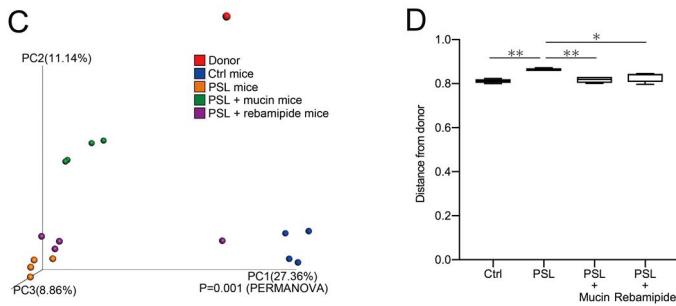


図 5 . ムチン投与が与える FMT 後の便中細菌叢の変化

大腸炎に対するムチン置換の効果を調べる目的で、病原性 *E. faecium* 株 (IB44a) を IL10KO マウスにさせて大腸炎モデルを作成した。これらのマウスに内因性及び外因性ムチンを摂取させ便移植を行うと、内因性ムチンを投与したマウスの便中の *E. faecium* 数が減少し、大腸炎の病理スコアが低下した。

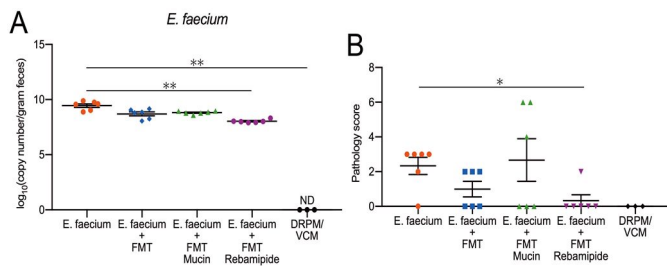


図 6 . 大腸炎に対する FMT のムチン補充の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 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 -
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡藤啓史、北村和哉、金子周一
2. 発表標題 当院における重症潰瘍性大腸炎の検討
3. 学会等名 第105回日本消化器病総会シンポジウム
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------