

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17828

研究課題名（和文）造血幹細胞移植後の腸内細菌叢変化に着目した、腸管GVHD発症の新規予防法の開発

研究課題名（英文）A novel prophylaxis for gut GVHD through microbiota analysis

研究代表者

新井 康之（Arai, Yasuyuki）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10826564

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）：本研究は、造血器腫瘍に対する骨髄移植後の腸内細菌叢の採取と同一、AIを用いた機械学習による腸内細菌叢の分類と、移植後臨床データベースとの融合と解析、マウス実験モデルでの同様の検討と生菌製剤を用いた予防実験、およびそれを踏まえたヒト臨床試験の準備、に分けられる。の腸内細菌叢採取に関しては、移植前処置開始から2ヶ月に渡り、患者便検体を毎週採取する。細菌に特異的な遺伝子である16SリボソームRNAコード遺伝子の塩基配列を、次世代シーケンサで決定する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

検体採取は順調に進行し、これまでに合計21患者を対象とし、100サンプル以上を検討した。予定したプロトコールによって、患者からの同意取得、検体の採取、院内検査室への搬送、解析研究室への輸送、検体の保存、次世代シーケンスを用いた測定、コンピュータを用いた解析には大きな問題は発生せず、予定通り進捗している。結果は、属レベルまでの細菌分類が可能であった。

研究成果の概要（英文）：This study can be divided into (1) collection and identification of intestinal microbiota after bone marrow transplantation for hematopoietic tumors, (2) classification of intestinal microbiota by machine learning using AI, and integration and analysis with post-transplant clinical database, (3) similar investigation in mouse experimental models and prevention experiments using live bacteria preparations, and preparation for human clinical trials based on these studies. The first is the collection of intestinal microbiota. The collection of intestinal microbiota in (1) will be conducted weekly for 2 months from the start of the pre-transplantation treatment. The patient's stool samples will be collected weekly for 2 months from the start of the pre-transplantation treatment. The nucleotide sequence of the 16S ribosomal RNA-coding gene, which is a gene specific to the bacteria, will be determined using a next-generation sequencer.

研究分野：造血幹細胞移植

キーワード：腸内細菌叢

## 1. 研究開始当初の背景

今回の研究テーマの基盤となる同種移植後の腸管 GVHD に関して、申請者のグループはこれまでに、骨髄破壊的前処置が腸管 GVHD のリスク因子となることを、日本造血細胞移植学会の大規模データベース解析で示した (Arai Y, et al, Bone Marrow Transplant. 2016;51:96-102. )。

一方で、自施設の後方視的解析において、第 4 世代セファロスポリン系抗生剤 (Abx) の使用が腸管 GVHD 発症のリスク因子 (ハザード比 2.05 倍) となることを、世界で初めて発見した (論文投稿中)。これらの研究を通じて、移植前処置や抗生剤の使用により、腸内細菌叢に dysbiosis が生じることが、腸管 GVHD の原因となりうると考え、本研究に着想した。

急性白血病やリンパ腫などの難治性造血器腫瘍に対して、同種造血幹細胞移植 (いわゆる骨髄移植) は根治を導く現在唯一の治療法である。しかし、移植後には様々な合併症が知られ、中でも腸管の急性移植片対宿主病 (GVHD) は、極めて予後不良である。

この腸管 GVHD の「発症リスク因子」に関しては、これまでに、患者・ドナー間の白血球型不一致、特定の移植前処置や抗生剤使用と、腸管 GVHD 合併との関連が報告されてきた。しかし、いずれも移植前の一時点での所見や状況と GVHD の関連を臨床疫学的に示したのみで、生物学的裏付けに乏しい。また、移植後には、検査所見や全身状態が劇的に変動するが、これらのリアルタイムな生体情報と GVHD との関連性は未解明であり、GVHD の発症予知バイオマーカーも確立していない。さらには、GVHD 高リスク症例を抽出できても、全身免疫抑制剤以外の手段はなく、腸管局所に特異的な GVHD 予防法は存在しない。

このような状況で、「新たな腸管 GVHD バイオマーカーと新規予防法の確立は可能か?」が移植領域での長年の問いである。申請者はこの答えを、「腸内細菌叢」に求めた。炎症性腸疾患などの腸管免疫疾患において、腸内細菌叢の構成変化 (dysbiosis) が病態と関連することが、近年明らかになった。腸管 GVHD は、患者腸管粘膜に対するドナー由来リンパ球の免疫応答が病因であるため、dysbiosis と腸管 GVHD 発症との関連性が推察される。しかし、短期間で複雑に様態を変える移植後の腸内細菌叢に関する検討は、莫大な量の情報 (ビッグデータ) を扱う必要があり、従来法での解析が困難であった。

そこで本研究では、次世代シーケンスと機械学習を用いて、dysbiosis の推移を時系列に沿って詳細に解析し、腸内細菌叢の観点から GVHD のバイオマーカーと予防法を確立する。

本研究は、平成 30 年 6 月より準備を始めており、現時点までに、京都大学医の倫理委員会でのプロトコール承認、研究協力者との技術協力契約締結が完了している。研究協力者である京都大学臨床病態検査学講座の長尾美紀准教授は生体肝移植後前後での腸内細菌叢の変化と、移植後肝硬変・移植肝拒絶・感染症との間に関連があることを、移植外科との研究で明らかにした (Kato K, Nagao M, et al. Transplant Direct. 2017;10:e144. )。感染症領域での豊富な経験を生かし、今回は検体の精度管理と、生菌製剤の作成・投与に関して、アドバイスを仰ぐ。また、栄養病理学研究所の塚原隆充所長は、幅広い生物種で、腸内細菌叢を同定してきた (Tsukahara T, et al. Biosci

Biotechnol Biochem. 2016;82;329-33.)。本研究では、次世代シーケンスを用いた解析を支援する。

このように、円滑な研究遂行のために準備がすでに出来つつあり、実際に患者検体の集積も始めている。次世代シーケンスによる腸内細菌叢の同定には、多額の費用がかかるため、本研究課題に対する科学研究費をもとに、本格的に研究を推進したい。

## 2. 研究の目的

同種造血幹細胞移植は、造血器腫瘍の根治的治療であるが、移植後には様々な合併症が知られる。特に重篤な合併症である腸管の急性移植片対宿主病 (GVHD) に関しては、発症予知バイオマーカーや、局所的予防・治療法が探索されてきたが、未だ確立されたものはない。

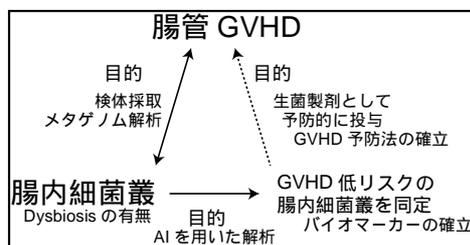
近年、炎症性腸疾患など腸管の免疫疾患において、腸内細菌叢の構成変化 (dysbiosis) と病態との関連が証明されてきた。この知見から推察すると、患者腸管粘膜に対するドナーリンパ球の攻撃 (同種免疫) である腸管 GVHD においても、dysbiosis が関連する可能性がある。

そこで本課題では、「腸管 GVHD のバイオマーカーと予防法の確立による予後改善」を目的として、次世代シーケンスを用いて、移植後患者の腸内細菌叢を定期的に同定し、人工知能による自動化機械学習を用いて、腸管 GVHD 発症と関係する dysbiosis パターンを抽出して、バイオマーカーとして確立し、GVHD 低リスクパターンに含まれる腸内細菌を組合せて作成した生菌製剤を、GVHD 高リスク症例に投与し、腸管 GVHD の予防効果を検証する。

本研究の最終目的は「腸内細菌叢に着目した腸管 GVHD の新規バイオマーカーと予防法の確立と、同種移植の予後改善」である。本課題は以下の小目的から構成される (下図)。

同種移植後に便検体を定期的に採取し、腸内細菌叢の変化 (dysbiosis) を検出人工知能 (AI) を用いて dysbiosis を網羅的に層別化し、臨床情報と融合することで、GVHD 発症と関連する dysbiosis パターンを同定し、バイオマーカーとして確立

GVHD 発症低リスクパターンに含まれる腸内細菌を配合した生菌製剤を作成し、高リスク症例に投与することで GVHD の予防が可能か、マウスでの検証とヒト臨床試験の計画



次世代シーケンスやバイオインフォマティクス技術の発展によって、腸内細菌叢の構成を正確に同定することが可能となった。しかし、移植後の時系列に沿った便検体から得られる腸内細菌叢データは、非常に膨大となり、そのままでは解析できない。そこで「AIによる教師なし自動化機械学習」の技術を用いて、時系列に沿って有意な変化を自動的にパターン化することで、このデータ量の問題を解決する。腸内細菌叢の解析に AI を使うのは世界初の試みであり、従来のヒトの目と手を使った解析に比べて、より網羅的に、そして恣意性を排除して解

析できる。Dysbiosis パターンが有望なバイオマーカーになると証明できれば、今後、臨床検査分野で使用されるが、これは次世代シーケンスとバイオインフォマティクスを実臨床に導入する初の試みとなりうる。

また、本研究の後半では、生菌製剤の投与により、腸内細菌叢の置き換えを図り、腸管 GVHD の発症抑制に取り組む。腸内細菌叢を入れ替えるために、いわゆる「糞移植」の臨床試験が欧米を中心に行われつつあるが、骨髄移植領域ではまだ発展途上であり、まとまった報告例はない。また、便そのものを移植するのではなく、特定の細菌叢を模倣した生菌製剤を投与することで腸内細菌叢を置換する試みも、既報はほとんどない。

これまで腸管 GVHD の予防は、免疫抑制剤の全身投与が唯一の選択肢であり、予防強化が必要な場合、副作用（腎不全や免疫不全）が問題であった。生菌製剤投与は、腸管局所療法であり、既存の副作用増悪なしに高い効果が期待できる、新たな概念の予防となる。

これらの点を鑑みると、本研究は、冒頭に掲げた「新たな腸管 GVHD バイオマーカーと予防法の確立は可能か？」という、臨床現場における長年の疑問・要望に応えるものである。同時に、腸内細菌叢や dysbiosis がもつ生物学的意義を解明する上で大きな情報を与えるとともに、臨床の観点においても、患者予後を改善できる重要な研究になる。さらには、次世代シーケンスと AI という、情報工学における近年の大きなブレイクスルーとなった技術を組み合わせる手法は、今後の同様の研究においても、広く応用可能である。

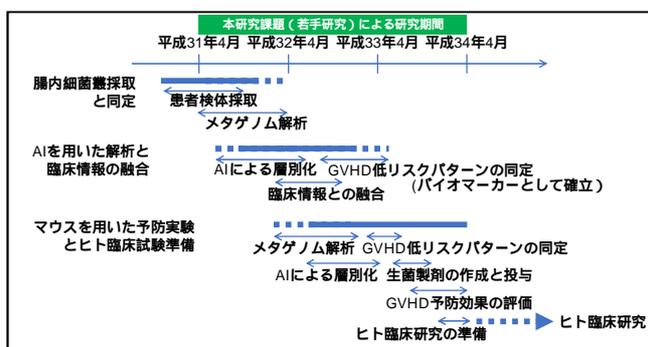
今回対象とする疾患は、同種移植後の腸管 GVHD という、限られたものである。本研究が順調に進捗すれば、その他の細菌叢解析（皮膚や口腔内）も行い、皮膚 GVHD や口腔粘膜傷害との関連解析にも取り組む予定である。細菌叢の dysbiosis をバイオマーカーとして、移植合併症の評価とその予防を目指すという、申請者の独創的なアイデアをさらに発展させることで、難治性造血器腫瘍の移植成績改善を多方面から実現したい。

### 3. 研究の方法

本研究は、造血器腫瘍に対する骨髄移植後の腸内細菌叢の採取と同定、AI を用いた機械学習による腸内細菌叢の分類と、移植後臨床データベースとの融合と解析、

マウス実験モデルでの同様の検討と生菌製剤を用いた予防実験、およびそれを踏まえたヒト臨床試験の準備、に分けられる。平成 30 年 8 月より検体採取を始め、平成 31 年度より本格的に解析し、3 年計画で行う（右図）。

の腸内細菌叢採取に関しては、移植前処置開始から 2 ヶ月に渡り、患者便検体を毎週採取する。約 80 名の患者を対象とし、検体は、栄養病理学研究所の協力を得て、細菌に特異的な遺伝子である 16S リボソーム RNA コード遺伝子の塩基配列を、次世代シーケ



ンサで決定する。このメタゲノム解析により、検体に含まれる腸内細菌叢の構成を同定し、各患者で dysbiosis を時系列に沿って解析する（平成 31 年度）。

に関しては、今回得られる膨大な量のメタゲノム解析結果から、AI を用い共通点を見いだすことで、30~50 種類に層別化する。この結果を、同種移植の臨床データベースと融合させる。前処置や抗生剤使用などの移植前パラメータ、腸内細菌叢 dysbiosis、さらには GVHD 発症イベントの間で、相関関係を見つけ、バイオマーカーとして確立する。これにより、ヒトでの腸管 GVHD リスクが低い腸内細菌叢組成を同定する（平成 31~令和 2 年度）。

については、マウス骨髄移植モデル（C57BL/6 BALB/c）を用いて、GVHD 発症とマウス腸内細菌叢 dysbiosis の相関を、と同様に次世代シーケンスと AI を組み合わせ解析する。この際、マウス食餌（糖質と脂質のバランス）や飼育環境（Specific Pathogen Free 条件か、コンベンショナル条件か）に変化を持たせることで、予め腸内細菌叢に多様性を持たせたマウスコロニーで実験を行う。GVHD リスクが低かった腸内細菌叢組成を参考に、人工的に細菌を配合したカプセル製剤（生菌製剤）を作成する。生菌製剤の作成と投与は、同様の実験経験を持つ京都大学臨床病態検査学講座の協力を得る。GVHD 発症高リスクのマウスに、この生菌製剤を投与することで、腸内細菌叢を置き換え、GVHD の発症を抑制できるかを検討する。また、経過中に腸管上皮細胞を採取し、細胞内シグナル分子の変化についても詳細に解析し、メカニズムの点からも裏付けを取る（令和 2 年度~令和 3 年度）。

動物実験に引き続き、ヒトにおいて、生菌製剤に関する臨床試験の準備を行う。過去の同種移植治療患者をコントロール群とし、「腸管細菌叢を定期的に同定し、GVHD 発症高リスクパターンを示す場合に生菌製剤を投与する症例」を介入群とする。介入群で、「腸管 GVHD 発症の抑制」と「生命予後改善」が得られるか解析する。両群それぞれ 50 症例を想定し、患者年齢や前処置強度などのパラメータを多変量解析モデルに組込むことで、介入がもたらす、真の効果を評価する。本プロトコールに関しては、臨床試験法に基づき、倫理委員会への申請準備を進める（令和 3 年度）。令和 4 年度より安全性試験を開始し、その後、両群を比較する臨床試験を行う。申請者の単施設で良い成績が得られた場合は将来的には、多施設共同研究も実施予定である。

#### 4. 研究成果

検体採取は順調に進行し、これまでに合計 21 患者を対象とし、100 サンプル以上を検討した。予定したプロトコールによって、患者からの同意取得、検体の採取、院内検査室への搬送、解析研究室への輸送、検体の保存、次世代シーケンスを用いた測定、コンピュータを用いた解析には大きな問題は発生せず、予定通り進捗している。結果は、属レベルまでの細菌分類が可能であった。これまでの結果を解析したところ、Shannon index（細菌叢の多様性を反映）は、移植前に最高値を記録し、その後、移植後 21 日目で最低値を取った後、徐々に改善することが分かった。Chao1 index も同様の経過を経ていた。さらに詳細に解析すると、Shannon および Chao1 index は、より強い前処置である、骨髄破壊的前処置を受けた患者でより大きく低下することが分かった。また、腸管細菌叢の多様性喪失（dysbiosis）は、腸管内の残存抗生剤濃度と関連することが分かった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 0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 Onda Yoshiyuki, Kanda Junya, Hanaoka Nozomu, Watanabe Mizuki, Arai Yasuyuki, Hishizawa Masakatsu, Kondo Tadakazu, Yamashita Kouhei, Nagao Miki, Fujimoto Tsuguto, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 100
2. 論文標題 Possible nosocomial transmission of virus-associated hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 753 ~ 761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-021-04414-1	査読の有無 無
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 Akahoshi Yu, Arai Yasuyuki, Nishiwaki Satoshi, Mizuta Shuichi, Marumo Atsushi, Uchida Naoyuki, Kanda Yoshinobu, Sakai Hitoshi, Takada Satoru, Fukuda Takahiro, Fujisawa Shin, Ashida Takashi, Tanaka Junji, Atsuta Yoshiko, Kako Shinichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Minimal residual disease (MRD) positivity at allogeneic hematopoietic cell transplantation, not the quantity of MRD, is a risk factor for relapse of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03094-x	査読の有無 無
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 Yanada Masamitsu, Takami Akiyoshi, Yamasaki Satoshi, Arai Yasuyuki, Konuma Takaaki, Uchida Naoyuki, Najima Yuho, Fukuda Takahiro, Tanaka Masatsugu, Ozawa Yukiyasu, Ikegame Kazuhiro, Takanashi Minoko, Ichinohe Tatsuo, Okamoto Shinichiro, Atsuta Yoshiko, Yano Shingo	4. 巻 99
2. 論文標題 Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia conducted in Japan during the past quarter century	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 1351 ~ 1360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-020-04051-0	査読の有無 無
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 Watanabe Mizuki, Kanda Junya, Arai Yasuyuki, Takaori-Kondo Akifumi, et al	4. 巻 26
2. 論文標題 Impact of Donor Source on Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Mature T Cell and Natural Killer Cell Neoplasms in the Kyoto Stem Cell Transplantation Group	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Blood and Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 2346 ~ 2358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbmt.2020.07.032	査読の有無 無
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 Noguchi Misa, Chen-Yoshikawa Toyofumi F., Arai Yasuyuki, Kondo Tadakazu, Ohsumi Akihiro, Nakajima Daisuke, Hamaji Masatsugu, Takita Junko, Takaori-Kondo Akifumi, Date Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Expanded indications for lung transplantation for pulmonary complications after hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtcvs.2020.10.065	査読の有無 無
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 Muranushi Hiroyuki, Kanda Junya, Arai Yasuyuki, Shindo Takero, Hishizawa Masakatsu, Yamamoto Takashi, Kondo Tadakazu, Yamashita Kohei, Matsubara Kazuo, Takaori Kondo Akifumi	4. 巻 86
2. 論文標題 Drug monitoring for mycophenolic acid in graft vs host disease prophylaxis in cord blood transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Clinical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 2464 ~ 2472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bcp.14354	査読の有無 無
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 Morita-Fujita Mari, Kyoto Stem Cell Transplantation Group (KSCTG), Arai Yasuyuki, Yoshioka Satoshi, Ishikawa Takayuki, Kanda Junya, Kondo Tadakazu, Akasaka Takashi, Ueda Yasunori, Imada Kazunori, Moriguchi Toshinori, Yago Kazuhiro, Kitano Toshiyuki, Yonezawa Akihito, Nohgawa Masaharu, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Indication and benefit of upfront hematopoietic stem cell transplantation for T-cell lymphoblastic lymphoma in the era of ALL-type induction therapies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78334-x	査読の有無 無
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 Minaga Kosuke, Watanabe Tomohiro, Arai Yasuyuki, Shiokawa Masahiro, Hara Akane, Yoshikawa Tomoe, Kamata Ken, Yamashita Kouhei, Kudo Masatoshi	4. 巻 55
2. 論文標題 Activation of interferon regulatory factor 7 in plasmacytoid dendritic cells promotes experimental autoimmune pancreatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 565 ~ 576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01662-2	査読の有無 無
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 Matsui Hiroyuki, Arai Yasuyuki, et al	4. 巻 4
2. 論文標題 Risk factors and appropriate therapeutic strategies for thrombotic microangiopathy after allogeneic HSCT	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 3169 ~ 3179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020002007	査読の有無 無
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 Iemura Tomoki, Arai Yasuyuki, Kanda Junya, Kitawaki Toshio, Hishizawa Masakatsu, Kondo Tadakazu, Yamashita Kouhei, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Impact of HLA class I allele-level mismatch on viral infection within 100?days after cord blood transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78259-5	査読の有無 無
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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yasuyuki Arai, Takamitsu Tsukahara, Miki Nagao, Tadakazu Kondo, Akifumi Takaori-Kondo
2. 発表標題 Dysbiosis in gut microbiota after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation can be determined by the combination of conditioning regimen and antibiotic usage
3. 学会等名 24th European Hematology Association (Amsterdam, Netherland) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新井康之, 塚原 隆充, 松元 加奈, 長尾 美紀, 近藤 忠一, 高折 晃史
2. 発表標題 同種移植後の腸内細菌叢の変化に対する前処置および抗生剤使用の影響
3. 学会等名 第81回日本血液学会総会(東京)
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