

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16972

研究課題名（和文）潰瘍性大腸炎・病態型と腸内細菌叢、T細胞機能バランスおよびHLA型の関連解析

研究課題名（英文）Analysis of the association between pathological type of Ulcerative Colitis and gut microbes, balance of functional T cell subset, and type of HLA.

研究代表者

金子 元基（Kaneko, Motoki）

東海大学・医学部・助教

研究者番号：80869058

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）：潰瘍性大腸炎（UC）は、大腸に限局した慢性炎症を典型的な病態とする難治性疾患であり、近年、患者数の増加が著しい。抗TNF- α 抗体療法が奏功する症例がある一方で、再燃と寛解を繰り返す難治例も多く、症例の個別化に資する有用なバイオマーカーが求められている。本研究では、患者末梢血中の機能性T細胞バランス、抗原提示分子としてのHLA型、腸内細菌叢の3つの観点からUC患者の細分化を試みた。それぞれに特徴的な集団を同定したが、相互の関連性については明確にはできず、さらなる解析が望まれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

UCを含む炎症性腸疾患の治療については、抗TNF- α 抗体療法を中心として、炎症および免疫応答に関与する種々の分子を標的とした新規薬剤の開発が続いているが、いまだ十分な治療法は確立されていない。本研究では、新たに機能性T細胞バランスに偏向を認める新たな集団を見出した。現在、UCの新規治療法として期待されているTh2型サイトカイン標的化との相関が想定され、その同定法とともに、今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Ulcerative colitis (UC) is an intractable disease typically characterized by chronic inflammation confined to the colon, and the number of patients has been increasing rapidly in recent years. While some cases respond to anti-TNF- α antibody therapy, there are many refractory cases with repeated relapses and remissions, and a useful biomarker that contributes to individualizing cases is needed. In this study, we attempted to subdivide UC patients from three perspectives: the balance of functional T cell subsets, HLA types as antigen-presenting molecules, and gut microbiota. A characteristic population was identified for each, but their relationships were not clear, and further analysis was required.

研究分野：消化器内科学

キーワード：潰瘍性大腸炎 T細胞バランス HLA 腸内細菌叢

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 (UC) は、同じ炎症性腸疾患 (IBD) であるクローン病 (CD) と比較しても、多様な病態を示す不均一な疾患であり、新たな指標を用いて疾患群を細分化し、適切な治療法の選択につなげることが重要と考えられている。しかし、UC 発症の原因は明らかにされておらず、複数の環境・遺伝要因が交錯する多因子疾患との認識に留まっており、発症要因からの疾患の理解は進んでいない。近年、16S リボソーム RNA 遺伝子を標的とした分子生物学的手法による腸内細菌叢に関するデータが蓄積し、一部の IBD と腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) に相関が認められ、環境要因として重要な意味を持つものと考えられているが、因果関係を含め、不明な点が多い。また、その他の患者要因についても様々な解析が報告されているが、個別化指標として利用するに至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、UC 細分化の指標として、a) 末梢血中の機能性 T 細胞/制御性 T 細胞 (Teff/Treg) 比 (免疫応答背景を反映)、b) HLA 型 (T 細胞への抗原提示段階における特徴を反映)、c) 腸内細菌叢 (腸内環境における抗原供与体としての特徴を反映) の 3 つの要素を調べ、その相互関係や病態との関連性を解析し、個別化治療の基盤構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 患者

東海大学医学部付属病院に通院する 20 歳以上で、厚生労働省難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班の診断基準により UC、CD と診断された者、および炎症性腸疾患の罹患歴のない少数の健常人 (10 人) を対象とした。潰瘍性大腸炎とクローン病患者については、過去手術歴がなく、腸内細菌叢へ影響する 3 か月以内での整腸剤および抗生剤の使用歴のない症例を対象とした。

(2) 試料の調製

患者末梢血より Ficoll 密度遠心法により単核球を分離し、セルバンカー (日本全薬工業) にて -80°C 冷凍保存した。一部細胞は HLA 型決定のための DNA 回収用に別途冷凍保存した。患者糞便は回収後速やかに -80°C 冷凍保存した。

(3) 機能性 T 細胞/制御性 T 細胞比の測定

冷凍保存した単核球を 10%FCS 存在下に解凍後 18 時間培養した細胞をフローサイトメトリー解析に供した。同細胞を、FITC-CD45RA、PE-CCR4、APC-CCR7、PE/Cy7-CD25、Alexa700-CD4、APC/Cy7-CD3、BV421-CXCR3、BV510-CCR6、BV650-CD127 (すべて BioLegend 社製) にて染色し、フローサイトメトリー解析を行った (図 1)。

(4) HLA 型の決定

凍結保存した単核球より DNA を抽出し、HLA-A、-B、-C、-DRB1345、-DQB1、-DPB1 の各型を、NGS-based HLA DNA タイピング法 (*BMC Genomics*. 16:318, 2015) によって決定した。NGS は、Ion S5 シークエンスキットおよび Ion 530 Chip キット (Thermo Fisher Scientific) にて行った。HLA 型判定には、TypeStream Visual Ver. 2.0.1 (Thermo Fisher Scientific) と IMGT Ver 3.42.0 を用いた。

(5) 腸内細菌叢解析 (メタ 16S 解析)

患者便より菌体 DNA を回収 (NucleoSpin® DNA Stool) し、16SrDNA を PCR 増幅し、増幅産物を精製後、バーコード標識を行った (SQK-NBD112.24, Oxford Nanopore Technologies)。これらの配列をナノポアシーケンサー (R10.4 フローセル) にて決定し、BLASTN にて細菌同定を行った。

4. 研究成果

(1) 末梢血 CD4 T 細胞の存在比

近年、末梢血中の機能性リンパ球について、各細胞系列マーカーに加えて、サイトカイン・ケモカイン受容体等の発現を組み合わせ、フローサイトメトリーにて同定する手法が広く用いられている (*Nat Med* 22:991, 2016; *J Clin Immunol* 37:486, 2017)。本研究でも、方法欄に記載した各表面分子の発現を指標とし、CD4⁺ T 細胞中の機能性細胞 (Th1、Th2、Th17、Treg) を同定した (図 1)。本手法を元に、本学付属病院消化器内科を受診中の UC および CD 患者、91 名について、末梢血 CD4⁺ T 細胞中の存在比を測定した。その結果、UC 患者において、健常人や CD 患者に比較し、いずれも有意な Th2 細胞の上昇と Treg 細胞の減少を認めた (図 2)。一方で、Th17 細胞については、

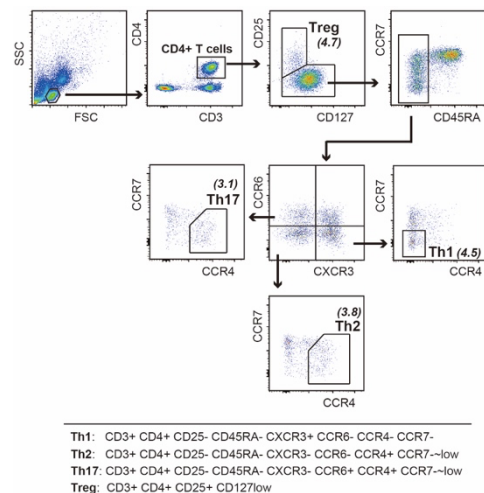


図 1 末梢血機能性 T 細胞の同定

CD患者にて、有意な上昇を認めている。この傾向は、各機能性T細胞の存在割合として求めた場合にも、顕著な差異として認められた。以上の結果は、これまで様々な自己免疫疾患にて認められる機能性T細胞のバランス異常 (*Nat Med* 22:991, 2016; *Br J Dermatol* 179:127, 2018; *Allergy Asthma Clin Immunol* 16:61, 2020) と同様に、炎症性腸疾患 (IBD) 発症やその治療法の選択に有用な情報と考えられる。

(2) Th2/Treg バランスと臨床症状の関連性

上記した Th2/Treg 比が高値 (>1.0) を示す UC 患者に特徴的な臨床症状について調べたところ、ステロイド使用歴の低値 (P=0.0424) が唯一、有意差を示す結果を得た。Th2/Treg 比高値の UC 患者と、特定の臨床症状との関連性は認められず、症状としてはステロイド処方に至らない軽度の UC を多く含むことが示唆された。

(3) 機能性 T 細胞のバランス異常と HLA の関連性

機能性 T 細胞バランスの偏りが特定の HLA 分子による抗原提示と関連する可能性を考慮し、次に UC 患者 HLA のタイピングを行った。その結果、HLA-DRB1*15:02 を始めとした特定のアリル保有者が、日本人健常人と比較し、UC 患者において多数、同定された。この結果の一部は、既報での報告と一致した。しかし、Th2/Treg 高値患者には、特定の HLA 型を有する症例は有意に少なく、同 HLA による抗原提示が直接的に機能性 T 細胞バランスに影響する可能性は低いと考えられた。

(4) 腸内細菌叢解析

ナノポアシーケンサーを用いた患者腸内細菌叢の 16SrDNA メタゲノム解析を行った。これを元に主座標分析 (PCoA) を行ったが、Th2/Treg 値: 1.0 を基準に分けた 2 群間では、腸内細菌叢の差異は認めず、特徴的な収束パターンも見出せなかった。一方で、両群間での存在比が異なる細菌を探索すると、*Desulfovibrionales* が、Th2/Treg 高値群で有意に多く存在することが判明した。同細菌はこれまで、UC 患者にて多く存在し、UC 発症との関連が示唆される細菌として報告がある。また同細菌が産生する硫化水素 (H₂S) は、同様に、UC の悪化と関連することが示唆されている。現在のところ、Th2 細胞や Treg 細胞の機能分化との関連性は不明であるが、同細菌の存在による T 細胞機能分化の影響について、今後、さらに探索する必要がある。

(5) 機能性 T 細胞バランスと HLA による 4 分類

各 UC 患者を、Th2/Treg 比の高値・低値群 (Th2/Treg-hi、-lo) と特定の HLA 保有者・非保有者群 (HLA+, -) をそれぞれ分類し、4 つの患者群に分割し、臨床症状との関連性を解析した。その結果、HLA(+) 群では、Th2/Treg-lo 群にて「全大腸炎型」が著しく多いのに対し、HLA(-) 群ではそれが逆転し、Th2/Treg-hi 群に多い傾向が認められた。このことから、特定の HLA 保有者と非保有者間では病態が異なり、特定の HLA の存在下では、Th2/Treg 比が高い集団にて、全大腸炎型にはならない傾向を認めた。

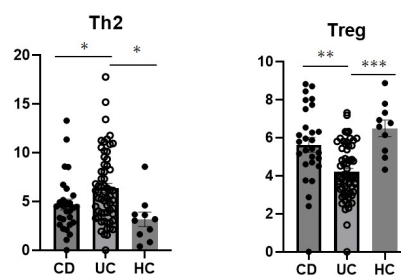


図 2. UC 患者の末梢血では Th2 が高く、Treg が低い傾向にあった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Imai J, Ichikawa H, Kaneko M, Ito H, Takashimizu S, Shirai T, Tajiri T, Watanabe N, Suzuki H	4. 巻 16(1)
2. 論文標題 Primary Sclerosing Cholangitis Complicated with Aphthoid Colitis Difficult to Diagnose from IgG4-Related Sclerosing Cholangitis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Case Rep Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 23-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000521538. eCollection 2022 Jan-Apr.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Imai J, Hanamura T, Kawanishi A, Ueda T, Mishima Y, Ito A, Shirataki Y, Morimachi M, Kodama T, Sato H, Kaneko M, Sano M, et al.	4. 巻 3(1)
2. 論文標題 A case of breast cancer with extensive colon metastasis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DEN Open	6. 最初と最後の頁 e189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/deo2.189. eCollection 2023 Apr.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 anaka R, Imai J, Tsugawa H, Eap KB, Yazawa M, Kaneko M, Ohno M, Sugihara K, et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Adherent-invasive E. coli - induced specific IgA limits pathobiont localization to the epithelial niche in the gut.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 1031997
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2023.1031997. eCollection 2023.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ueda T, Mori H, Sekiguchi T, Mishima Y, Sano M, Teramura E, Fujimoto R, Kaneko M, Nakae H, et al.	4. 巻 70(3)
2. 論文標題 Successful endoscopic hemostasis compared to transarterial embolization in patients with colonic diverticular bleeding.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr.	6. 最初と最後の頁 283-289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbrn.21-123. Epub 2021 Nov 26.	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 Imai Jin, Ichikawa Hitoshi, Kitamoto Sho, Golob Jonathan L., Kaneko Motoki, Nagata Junko, Takahashi Miho, Gilliland Merritt G., Tanaka Rika, Nagao-Kitamoto Hiroko, Hayashi Atsushi, Sugihara Kohei, Bishu Shrinivas, Hozumi Katsuto, Suzuki Hidekazu, Kamada Nobuhiko	4. 巻 6
2. 論文標題 A potential pathogenic association between periodontal disease and Crohn's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	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) 10.1172/jci.insight.148543	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 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Motoki Kaneko, Jin Imai, Hidekazu Suzuki, Katsuto Hozumi
2. 発表標題 A HIGHER TH2/TREG RATIO MAY BE A MARKER OF REFRACTORY ULCERATIVE COLITIS WITH LONGER DISEASE DURATION AND FREQUENT USE OF STEROIDS AND/OR IMMUNOSUPPRESSANTS, WHEREAS HLA GENOTYPE IS NOT
3. 学会等名 UEG Week 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------