

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07900

研究課題名(和文) 糞便移植療法の最適化を目指した宿主免疫機構の可塑性と曝露すべき腸管微生物叢の解明

研究課題名(英文) Plasticity of host immune mechanisms and intestinal microbiota to be exposed to optimize fecal microbiota transplantation

研究代表者

松浦 稔 (Matsuura, Minoru)

杏林大学・医学部・臨床教授

研究者番号：30402910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：4週および10週齢の無菌(GF)マウスにSPFマウスから腸管微生物叢移入(FMT)を行った。週齢を一致させたFMTに加え、4週齢GFマウスに4週齢または10週齢SPFマウスからFMTを行った。週齢を一致させたFMTでは4週齢と10週齢レシピエントの細菌構成は有意に異なった。週齢の異なったFMTではいずれの細菌構成も4週齢ドナーに類似した。相関解析の結果、Lachnospiraceae NK4A136 group属とRoseburia属が4週齢GFマウスの腸管粘膜で優位に発現する遺伝子と正の相関を示した。幼少期腸管粘膜の特徴的な遺伝子発現が幼少期に生着する細菌選択に関与す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

腸内細菌叢の乱れ(dysbiosis)が炎症性腸疾患(IBD)の発症や病態に関連することが報告され、微生物叢を標的としたIBD治療として糞便微生物移植(FMT)が注目されている。しかし、IBDにおけるFMTでは発症後のdysbiosisを改善しても背景にある宿主の免疫異常が是正されず、その効果は限定的である。本研究では健全な免疫発達に必要な腸管微生物叢に曝露すべき時期が幼少期にあり、幼少期の腸管環境に有利に生着する細菌群の存在とその生着に関する腸管環境の特徴を明らかにした。本研究で得られた知見は現在のIBD治療としてのFMTが抱える課題を解決する糸口になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We employed germ-free (GF) mice early in life (4 weeks of age) and later in life (10 weeks of age) for fecal microbiota transfer (FMT) from specific pathogen-free (SPF) mice. We performed age-unmatched FMT between recipients early in life and donors early or later in life, in addition to common age-matched FMT. Age-matched FMT resulted in significantly different bacterial compositions between recipients early vs. later in life. Age-unmatched FMT revealed that bacterial compositions of recipients from donors later in life were similar to those of recipients from donors early in life. Correlation analysis demonstrated that genera Lachnospiraceae NK4A136 group and Roseburia were positively correlated to genes expressed predominantly early in life. The characteristic gene expression of the intestinal mucosa early in life might contribute to select specific bacteria in the intestinal microbiome early in life.

研究分野：消化器内科学

キーワード：腸管微生物叢 免疫可塑性 糞便微生物移植

1. 研究開始当初の背景

腸管微生物叢は宿主の健全な免疫機構の成立に重要な役割を果たしている。近年、腸内細菌叢の乱れ(dysbiosis)が炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease; IBD)の発症や病態に関連することが報告されている。そのため、dysbiosisの改善を目的に腸内細菌を標的とした新たな治療として糞便微生物移植(fecal microbiota transplantation, FMT)が注目されている。しかし、Clostridioides difficile 感染症での高い奏効率とは対照的に、IBDにおけるFMTの奏効率は低く(約20~30%)、その一因としてIBDでは発症後のdysbiosisを改善しても背景にある宿主の腸管免疫異常までは是正されない可能性が推測されている。一方、腸管免疫の構築には腸管微生物叢が深く関与し、宿主との代謝、栄養、免疫など様々な側面での相互作用(共生関係)を介して生後間もない時期から形成され、成長とともに定常的な状態(ホメオスタシス)に達すると考えられる。特に、このような腸管微生物叢および腸管免疫の双方の発達では、幼少期の特定の期間における健全な環境(影響)が重要と考えられている。例えば、ヒト疫学研究において妊娠中や小児期の抗菌薬使用により児のIBD発症リスクが上昇することが報告されている。さらにこれを模した周産期抗菌薬投与IBD動物モデルを用いた検討では、幼少期に生じたdysbiosisは成長後も持続し、宿主の免疫発達異常と腸炎発症リスクの上昇につながるということが明らかとなっている。そこで、申請者は、幼少期における健全な免疫発達に必要な微生物叢に曝露・獲得すべき適切な時期、適切な微生物が存在し、この期限内にdysbiosisを改善することにより宿主の免疫発達を健全な方向へ導き(免疫可塑性)、腸炎の発症リスクを軽減できるのではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、腸管微生物叢が宿主の免疫発達に与える影響と免疫可塑性の時期、およびその決定因子を明らかにし、腸炎発症リスクの低下につながるFMTを行う適切な時期の検討につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 無菌マウスに対する腸管微生物叢移入による細菌生着の評価

4週齢無菌(germ-free, GF)マウスと10週齢GFマウスに同性のspecific pathogen-free (SPF)ドナーマウス由来の腸管微生物叢を移入した。ドナーおよびレシピエントから採取した糞便から抽出したDNA検体について、16S rRNAのV4領域のアンプリコンシーケンシング解析を行った。解析パイプラインとしてQuantitative Insights into Microbiome Ecology (QIIME)2、DADA2を用いた。Amplicon sequence variants (ASVs)について、Silva database 138を用いて分類学的な割り当てを行った。

(2) 宿主腸管の形態学的・免疫学的可塑性の検討

腸管微生物叢移入4週後のレシピエントマウスの腸管形態を光学顕微鏡および電子顕微鏡にて評価した。また脾臓および腸間膜リンパ節を採取してフローサイトメトリーによりCD4陽性T細胞分画を解析した。

(3) 宿主腸管粘膜の遺伝子発現プロファイルの解析

回腸粘膜、大腸粘膜からRNAを抽出し、マイクロアレイチップ解析を行なった。

(4) 幼少期に特徴的な腸管粘膜遺伝子発現と相関する細菌群の探索

各遺伝子の発現量と各ASVの占有割合の相関性をmixOmicsにより解析した。

4. 研究成果

4週齢GFマウスと10週齢GFマウスに同性・同週齢のSPFマウス由来の腸管微生物叢を移入した(週齢を一致させた)FMTでは、移入4週後におけるレシピエントマウスとそれぞれのドナーマウスの腸内細菌叢の構成は類似し、それぞれの腸管形態も類似していた。CD4陽性T細胞分画については4週齢レシピエントにおいて10週齢レシピエントよりも可塑性を示し、ドナーに類似していた。一方、4週齢GFマウスに同性の4週齢または10週齢SPFマウスの腸管微生物叢を移入した(週齢の異なった)FMTでは、いずれの腸内細菌構成も4週齢ドナーに類似した。またCD4陽性T細胞分画は両レシピエント群で同様の発達を示した。以上より、幼少期の宿主は腸管の形態学的・免疫学的可塑性を有し、4週齢の宿主において曝露した細菌叢から幼少期に適した細菌叢が選択されると考えられた。そこで、我々は、このような幼少期における健全な発達を可能とするために、幼少期の宿主が必要とする細菌群を選択・獲得する機構があるのではないかという仮説を立てた。

そこで、4週齢GFマウス(E群)と10週齢GFマウス(L群)の回腸・大腸粘膜における遺伝子発現を比較検討した。E群とL群は主成分分析によるプロット図において異なるクラスターを形成し、特に回腸粘膜では週齢によって遺伝子発現パターンが異なることが示された。さらに、

回腸粘膜における E 群と L 群の比較で発現量比が 2 倍以上で有意に異なる遺伝子として、解析対象となった 22206 遺伝子から 120 遺伝子が抽出され、E 群で優位に発現している遺伝子は 66 遺伝子、L 群で優位に発現している遺伝子は 54 遺伝子であった。これらの遺伝子について、10 週齢 SPF マウスをドナーとして 4 週齢または 10 週齢 GF マウスに腸管微生物叢を移入した際に生着した細菌構成との相関解析を行った (図 1)。E 群の回腸粘膜に優位に発現している遺伝子と強い正の相関関係を示す細菌 ASV は 31 種であり、そのうち細菌属としては、Lachnospiraceae NK4A136 group 属、Roseburia 属が同定された。これらの 2 細菌属は、4 週齢 SPF マウスにおいて最も高い占有割合を示す 2 細菌属であった。さらに、4 週齢 SPF マウスにおいて、10 週齢 SPF マウスよりも、有意に高い占有割合であった。以上より、幼少期の腸管環境に有利に生着する細菌群が存在し、それらの生着には幼少期腸管粘膜に特徴的な遺伝子発現プロファイルが寄与している可能性が示唆された。

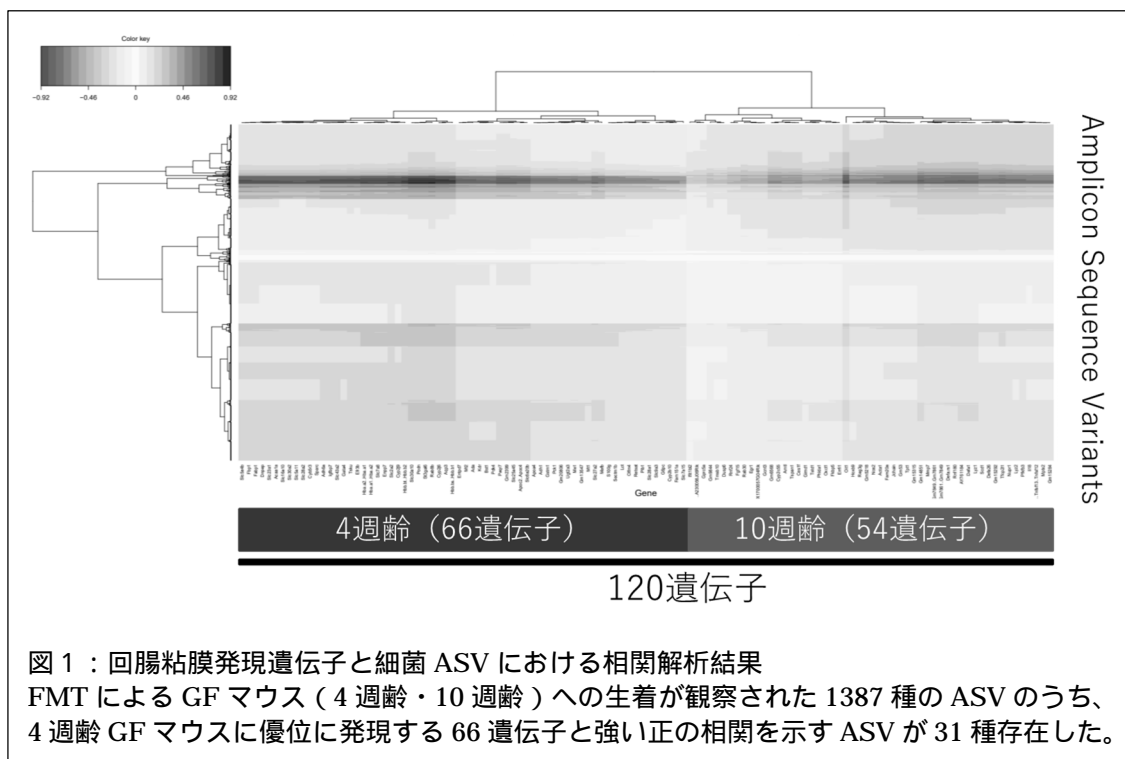


図 1：回腸粘膜発現遺伝子と細菌 ASV における相関解析結果

FMT による GF マウス (4 週齢・10 週齢) への生着が観察された 1387 種の ASV のうち、4 週齢 GF マウスに優位に発現する 66 遺伝子と強い正の相関を示す ASV が 31 種存在した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西成田悠, 三好潤, 和田晴香, 小栗典明, 黒沼智, 日比則孝, 竹内修, 松浦稔, 小林拓, 秋元義弘, 日比紀文, 久松理一.
2. 発表標題 幼少期における腸管微生物叢成立と宿主免疫発達の特徴
3. 学会等名 第59回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西成田悠, 三好潤, 和田晴香, 小栗典明, 黒沼智, 日比則孝, 竹内修, 松浦稔, 小林拓, 秋元義弘, 日比紀文, 久松理一
2. 発表標題 幼少期における腸管微生物叢成立と宿主免疫発達の特徴
3. 学会等名 第50回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------