

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15876

研究課題名（和文）川崎病の罹患因子としての腸内細菌叢の役割の検討

研究課題名（英文）Dysbiosis of the gut microbiota as a susceptibility factor for Kawasaki disease

研究代表者

赤川 翔平（Akagawa, Shohei）

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：80714881

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）：川崎病(KD)は小児に多発する原因不明の全身性血管炎である。本研究ではKDの発症に腸内細菌叢の乱れ(dysbiosis)が関連しているかを明らかにすることを目的とした。KDに罹患後約1年が経過した児26名と、KD既往のない健康小児57名を対象として、腸内細菌叢を比較した。その結果、KD既往群では *Ruminococcus gnavus* が多く、*Blautia* が少なかった。*R. gnavus* はアレルギー疾患や自己免疫疾患の発症への関与が指摘されている一方、*Blautia* は免疫調節に関与する。このことから、KDの既往を有する児はdysbiosisを来たしており、KD罹患感受性因子である可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

川崎病の病因は未だに不明であり、本研究結果は川崎病の病因解明の一助となると考える。将来的にはプレバイオティクスやプロバイオティクスによるdysbiosisの是正など、新しい川崎病の発症予防法や治療法の開発に繋がる可能性がある。また、本研究結果や研究手法が川崎病だけではなく、他の血管炎や膠原病などの疾患の病因解明にも応用できる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Introduction: Gut microbial imbalance (dysbiosis) has been reported in patients with acute Kawasaki disease (KD). However, no studies have analyzed the gut microbiota while focusing on susceptibility to KD. Methods: Fecal DNA was extracted from 26 children with a history of KD approximately 1 year prior (KD group) and 57 age-matched healthy controls (HC group). 16S rRNA gene analysis was conducted. Results: Comparing microbial composition at the genus level, Compared with the HC group, the KD group had higher relative abundance of *Ruminococcus gnavus* group and lower relative abundance of *Blautia*. Discussion and conclusion: *Ruminococcus gnavus* group reportedly includes pro-inflammatory bacteria. In contrast, *Blautia* suppresses inflammation via butyrate production. Therefore, dysbiosis characterized by decreased abundance of *Blautia* in parallel with increased abundance of *Ruminococcus gnavus* group might be a susceptibility factor for KD.

研究分野：小児科学

キーワード：川崎病 腸内細菌叢 dysbiosis

## 1. 研究開始当初の背景

### 腸内細菌叢の解析方法の変遷について

腸内細菌叢の研究は 100 年以上前から分離培養法を用いて行われているが、既存の細菌学的方法には感度・特異性に限界があり、十分な菌の定量や菌種の方法が困難であった。しかし、近年次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer: NGS) を用いた網羅的な 16S rRNA 遺伝子解析により、腸内細菌叢をより迅速かつ正確に把握することが可能となり、「腸内細菌叢」は医学研究の一つの大きなテーマとなっている。

### 腸内細菌叢と慢性疾患について

腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) は小児期だけでなく、生涯において様々な疾患の発症に関与することが明らかとなってきている。具体的には炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、壊死性腸炎などの消化管疾患だけでなく、アレルギー関連疾患、肥満やメタボリックシンドローム、糖尿病、自己免疫疾患、自閉症スペクトラム、乳幼児突然死症候群の発症にも関与している。申請者らの研究グループも、川崎病やネフローゼ症候群の発症に dysbiosis が関与している可能性を報告した。

### 川崎病と腸内細菌叢

川崎病は生後 6 か月から 5 歳の小児に好発する全身性血管炎で、500 人に 1 人が罹患する。無治療の場合には約 25~30% の割合で心臓の冠動脈に拡大性病変 (coronary artery lesion: CAL) を合併し、適切な治療を行っても 2% 程度の患児では CAL を合併する。この病変は、血栓形成によって心筋梗塞発症の危険因子となり、小児の後天性心疾患の最大の原因となる。1967 年に川崎富作博士によって急性熱性皮膚粘膜リンパ節症候群として報告されてから、原因について多くの研究が行われてきた。様々な病原体や免疫調節に関する遺伝子、食事や気候などの生活環境が原因となる可能性が考えられてきたが、その特定には至っていない。現在では、遺伝的あるいは環境的に罹患しやすい状態にある子どもが、感染症を契機に過剰な免疫反応を起こして発症する多因子疾患であると考えられている。これまでに川崎病の発症リスクを高める環境因子として、帝王切開で出生したこと、乳児期に人工乳栄養であったこと、抗生薬の使用歴があることなどが報告されています。興味深いことに、これらはいずれも乳幼児の腸内細菌叢を乱す因子として知られている。そこで、腸内細菌叢の乱れが川崎病の発症リスクになるのではないかと考え本研究を計画した。近年、川崎病に罹患中の児の腸内細菌叢が乱れていることがいくつかの論文で報告されている。しかし、その腸内細菌叢の乱れは川崎病の原因であるのか、異常な免疫反応の結果であるのかは明らかではない。そのため、本研究では川崎病に罹患してから約 1 年が経過し、健康な状態にある児の腸内細菌叢が乱れているか否かを検証した。急性期疾患の罹患や抗生薬の使用などの一時的な腸内細菌叢の乱れは 1 か半月程度でおおむね回復するため、川崎病罹患後約 1 年経過した児の腸内細菌叢の乱れは川崎病発症のリスク因子であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では「川崎病治癒後 1 年経過した児の腸内細菌叢は dysbiosis を来しているか否かを明らかにし、dysbiosis が川崎病の罹患感受性因子であることを明らかにすること。」を目的とする。本研究の成果は川崎病の病因解明の一助となり、将来的には川崎病の発症予防や治療法の開発に繋がる重要な一歩であると考えられる。

## 3. 研究の方法

2017 年 3 月から 2021 年 12 月に川崎病と診断された児 (発症時月齢 6 か月から 48 か月) を対象とし、罹患から約 1 年を経過した時点で糞便を採取した。比較対照として、川崎病の既往がない年齢が一致したボランティアの健康小児の便を用いた。なお検体採取前 1 か月間に抗生薬を使用したものは除外した。

腸内細菌叢を同定するため、採取した検体から細菌 DNA を抽出し、Illumina Miseq システムを用いて 16S rRNA 遺伝子解析を行った。dysbiosis の有無を検討するため、得られた遺伝子データから QIIME2 による多様性、多様性、細菌の相対存在量の比較、さらに PICLSt2 による機能予測を行った。

#### 4. 研究成果

川崎病群(KD) 26人、対照群(HC) 57人が対象となった。対象の年齢、性別に有意差はなかった。背景因子である分娩方法、乳児期の栄養方法にも有意差はなかった。検体採取時の年齢の中央値は32.5か月であった。

多様性はShannon指数、Simpson指数、Observed Speciesでは有意差がなかったが、Faiths PDでは有意差があった(それぞれ、 $p=0.64$ 、 $p=0.20$ 、 $p=0.38$ 、 $p=0.005$ )。多様性はBray-Curtis非類似度指数で有意差があった( $p=0.003$ ) (図1)。

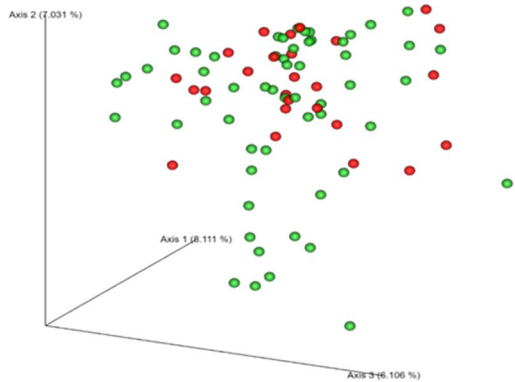


図1 川崎病群と対照群の腸内細菌叢多様性の比較

各プロットが各個人の腸内細菌叢を示す。各プロットの距離が離れているほど、腸内細菌叢構成が異なっていることを視覚的に示す。2群は統計学的に有意に異なるクラスターを形成しており、2群の腸内細菌叢が異なることを示している。

細菌の相対存在量は川崎病群に *Ruminococcus gnavus* が多く (KD vs. HC, 1.9% vs. 1.3%;  $p=0.0014$ )、対照群に *Blautia* が多かった (KD vs. HC, 3.6% vs. 6.8%;  $p=0.0094$ )。 (図2)

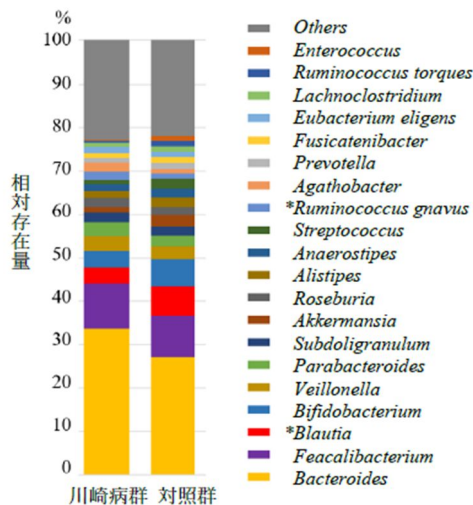


図2 川崎病群と対照群の腸内細菌叢構成の比較  
\*は統計学的に有意差があった菌を示す。川崎病群には *Ruminococcus gnavus* (水色) が多く、*Blautia* (赤色) が少ない。

機能予測では川崎病群で8つの代謝機能の低下が特定された。中でもATP binding cassette (ABD) トランスポーターに著しい機能低下があった (KD vs. HC, 2.08% vs. 0.45%;  $p=0.010$ )。

本研究は、川崎病に罹患したことのある児は、回復後の健康な状態でも dysbiosis があることを初めて報告した。川崎病やその治療の影響を排除するために、川崎病罹患後から約1年経過したことを対象の条件とした報告は筆者らが初めてである。多様性と多様性の違いからは川崎病群と対照群は腸内細菌叢の特徴が異なるグループであることが示された。また、細菌の構成では川崎病群に *Ruminococcus gnavus* が多く、*Blautia* が少ないという特徴がみられた。

*Blautia* は短鎖脂肪酸である酪酸を産生する菌である。酪酸は腸管上皮のエネルギー源であり、腸管での制御性T細胞の分化を誘導する働きをもつことがわかっている。制御性T細胞は過剰な免疫を抑制する細胞であり、川崎病では *Blautia* が減少していることによって制御性T細胞の分化誘導が低下していることが発症に関わる可能性がある。また、川崎病群で多い *Ruminococcus gnavus* は炎症を惹起するリポ多糖をもつことが知られており、川崎病急性期に認められる強い炎症反応との関連性が示唆される。

本邦において、川崎病の罹患率は年々上昇しているが、分娩方法や栄養などの生活環境の変化が dysbiosis を引き起こし、それによる免疫の異常が川崎病の罹患しやすさに影響を与えている可能性がある。本研究成果は川崎病の原因究明の一助となるだけでなく、プロバイオティクスやプレバイオティクスを用いた腸内細菌叢を標的とした新たな川崎病の予防・治療戦略の開発に繋がる可能性がある。

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 1件）

1. 著者名 Teramoto Yoshiki, Akagawa Shohei, Hori Shin-ichiro, Tsuji Shoji, Higasa Koichiro, Kaneko Kazunari	4. 巻 14
2. 論文標題 Dysbiosis of the gut microbiota as a susceptibility factor for Kawasaki disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1268453
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1268453	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 寺本芳樹、赤川翔平、堀真一郎、辻章志、金子一成
2. 発表標題 川崎病の罹患感受性因子としての腸内細菌叢に関する検討
3. 学会等名 第55回日本小児感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshiki Teramoto, Shohei Akagawa, Yuko Akagawa, Shin-ichiro Hori, Sohsaku Yamanouchi, Shoji Tsuji, Koichiro Higasa, Kazunari Kaneko
2. 発表標題 Gut microbiota as a susceptibility factor for Kawasaki disease
3. 学会等名 International Human Microbiome Consortium 9th Congress（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiki Teramoto, Shohei Akagawa, Yuko Akagawa, Shin-ichiro Hori, Sohsaku Yamanouchi, Takahisa Kimata, Kenji Mine, Shoji Tsuji, Masaki Hashiyada, Atsushi Akane and Kazunari Kaneko
2. 発表標題 Gut microbiota as a susceptibility factor for Kawasaki disease
3. 学会等名 The 13th International Kawasaki Disease Symposium（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺本芳樹、赤川翔平、赤川友布子、辻章志、金子一成
2. 発表標題 川崎病の罹患感受性因子としての腸内細菌叢の検討
3. 学会等名 第124回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------