

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590948

研究課題名(和文) 生物学的製剤抵抗機序におけるヒト腸内細菌フローラパターンの経時的変化

研究課題名(英文) The microbiota in inflammatory bowel disease with resistance to anti-TNF therapy.

研究代表者

岡沢 啓 (Okazawa, Akira)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50286457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、活動期炎症性腸疾患の腸内細菌叢を解析したところ、Clostridia目の細菌の減少を認めた。生物学的製剤および他治療法によって寛解導入された患者では、このClostridia目の細菌は増加を認める一方で、寛解導入できなかった患者では増減を認めず腸炎の病態への関与が考えられた。さらにこのClostridia目の細菌の死菌体は、ヒト潰瘍性大腸炎患者や各種腸炎マウス及びの腸管の免疫担当細胞から抗炎症性サイトカインであるIL-10産生を亢進させた。以上から、Clostridia目の細菌がIBD患者において抗炎症効果を有し、更には治療に応用できる可能性があるといえる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the bacterial composition of fecal samples from inflammatory bowel disease (IBD). We found that the prevalence of one of Clostridia was lower in active ulcerative colitis (UC) than quiescent UC. We stimulated colitic lamina propria mononuclear cells (LPMC) from UC patients and IBD model mice with heat-killed this Clostridia. LPMC incubated with Clostridia produced higher amounts of IL-10 compared to controls. The results suggest Clostridia can suppress intestinal inflammation, probably through IL-10 induction. Therefore FS can be a new strategy of IBD therapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：腸内細菌 炎症性腸疾患 probiotics

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) は原因不明の慢性腸管炎症性疾患である。近年、Tumor necrosis factor (TNF)- に対する生物学的製剤をはじめとした宿主の免疫応答を調整する薬剤の有効性により、免疫異常の関与は明らかである。さらに、近年、ヒトやマウスモデルに於いての腸内細菌叢が IBD に限らず、他の自己免疫疾患、糖尿病、NASH、自閉症など幅広い疾患との関連が示唆され、その原因として腸内細菌叢が宿主の異常な免疫応答を惹起していることが想定されているが、詳細な検討はいまだなされていない。

2. 研究の目的

我々は治療前の IBD の患者の腸内細菌を解析することによって、治療への反応性や病態に関与している腸内細菌を新たに探索し、新規プロバイオティクスにつなげたいと考えた。

3. 研究の方法

IBD 患者及び健常者の便検体を 16s rRNA 系統解析法を用いて、腸内細菌叢について詳細に解析を行った。この 16srRNA によって、培養用では検出できなかった嫌気性菌も検出が可能である。

さらに、上記解析をもとに活動期患者でターゲットとなる細菌を絞り込み、ターゲット菌を用いて、IBD 患者の大腸手術検体及び腸炎モデルマウス (Oxazolone 腸炎、DSS 腸炎、CD45RBhigh 移入腸炎) の大腸検体の腸管粘膜固有層単核球 (LPMC) への作用を解析した。具体的には共培養し、上清中のサイトカインを測定し、無刺激及び陽性コントロールとして *Enterococcus faecalis* を用いて比較検討した。

4. 研究成果

1g あたりの便中腸内細菌数を潰瘍性大腸

炎、CD のそれぞれ治療介入前後で比較すると健常人では 10^{11} 程度に対し、UC では活動期に 10^7 個と少なく、治療介入に伴い上昇を認めた。一方 CD は変化を認めなかった (図 1)。

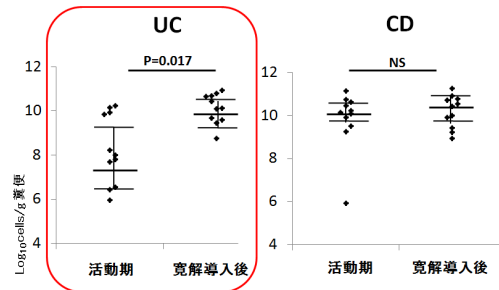


図 1 寛解導入前後での総細菌数

さらに我々は、既に IBD 活動期患者で低下すると報告のある *C. coccooides* group に着目した。当院での保有率の結果でも、健常者では保有率が 100% に対して、活動期 CD 患者では 77%、活動期 UC 患者では 65% と低下を認めた。さらにこのグループのプライマーの中でも、*Fusicatenibacter saccharivorans* (FS) は、活動期 CD は 31%、活動期 UC は 20% と活動期 IBD 患者で著しい低下を認めた。

さらに治療前後での経過を追うと、活動期潰瘍性大腸炎の患者において、寛解導入前後で FS の保有率の増加を認めた (図 2)。

以上の結果から FS の腸炎の病態に関与していると考え、炎症状態の大腸への FS の影響を検証した。

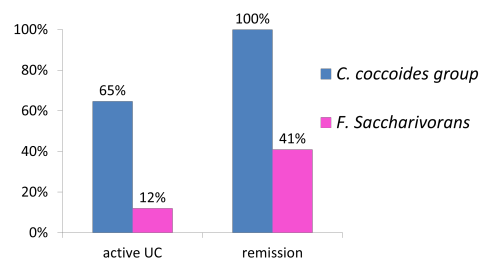


図 2 潰瘍性大腸炎における寛解導入前後における保有率の変化

具体的には、UC 患者の大腸手術検体から LPMC を採取してし、および *E. faecalis* で刺激を行い、上清中サイトカインを測定した。その結果、炎症部では FS 刺激によって、IL-10 産生亢進を認めた。

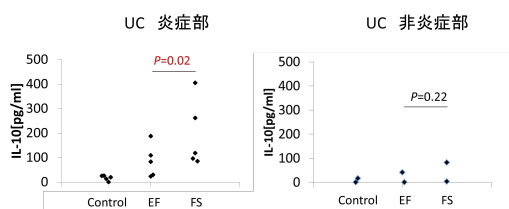


図3 FS刺激によるヒトUC患者大腸LPMCのIL-10産生誘導能

また、腸炎モデルマウスを用いて、同様に大腸 LPMC を採取して、菌で刺激を行ったところ、DSS 腸炎モデル、RBhigh 移入腸炎モデル、OXA 腸炎モデルのいずれの腸炎モデルでも FS 刺激によって IL-10 産生亢進を認めた。

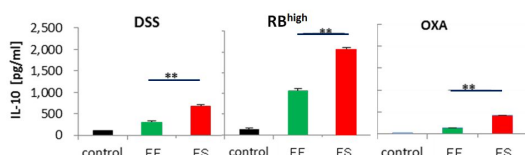


図4 FS刺激による腸炎モデルマウスLPMCのIL-10産生誘導能

一方 gnotobiotto マウスの作成を試みたが、定着が不良で現在改良を加えながら取り組んでいる。代替として、若週齢の SPF マウスに FS 死菌体を 4 週間投与し、それに伴い、大腸 LPMC における免疫担当細胞の変化を解析したが、総細胞数、制御性 T 細胞や B 細胞、マクロファージいずれも細胞数に変化を認めなかった。

以上の結果から、FS は IBD 患者腸内で減少を認め、炎症大腸腸管免疫細胞からの IL-10 産生誘導能を有しており、腸炎の病態に関与している事が示唆された。今後の展望として

は、gnotobiotto の作成により、FS による免疫細胞誘導や、in vivo で FS 投与による腸炎マウスでの腸炎抑制効果について検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡沢 啓 (OKAZAWA, Akira)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50286475

(2)研究分担者

金井 隆典 (KANAI, Takanori)

慶応義塾大学・医学部・教授

研究者番号： 40245478

(3)連携研究者

なし