

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390190

研究課題名(和文) 腸内細菌パターンの決定因子の同定と腸内細菌パターン戦前化計画

研究課題名(英文) Identification of Symbiosis pattern decision factors and its reeducation program

研究代表者

金井 隆典 (Kanai, Takanori)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40245478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：Clostridium butyricum (CB)には健常時はFoxp3+制御性T細胞 (Treg)を誘導すること明らかとした。CBはDSS腸炎を抑制したが、Tregは減少しIL-10産生マクロファージが増加していた。マクロファージ特異的IL-10欠損マウスでCBの腸炎抑制効果が認められなかった。CBを幼児期の無菌マウスに定着させると腸炎は抑制された。バンコマイシン投与かつビオチン欠乏食マウスで広範な脱毛が出現することを見出した。脱毛マウスではlactobacillus菌が優位菌として存在し便中にある種のアミンが増加することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In the first project, a probiotic strain, Clostridium butyricum (CB), induced FOXP3+ regulatory T cells (iTreg) in the colon of normal mice. Although CB suppressed the development of acute DSS colitis, CB did not induce iTreg, but did IL-10-producing macrophages. The preventive effect of CB was not observed in DSS-administered macrophage-specific IL-10 KO mice. In addition, CB-monoassociated mice did not develop DSS colitis (Cell Host & Microbe 2013).

In the second project, surprisingly, mice treated with vancomycin and biotin-deficient diet suffered from broad alopecia on the back with dysbiosis composed of a specific lactobacillus strain that reached to 60% dominancy. Also, these mice produced a large amount of a specific amines that seemed to be the key metabolites to induce alopecia.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：プロバイオティクス 腸内細菌 炎症性腸疾患 ディスバイオーシス

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(IBD)である潰瘍性大腸炎(UC)およびクローン病(CD)は、現時点、根治が困難で生涯にわたって専門医による治療が継続する難病である。UCおよびCDは本邦において近年増加の一途をたどり、かつ、就学、就労、結婚、出産といった社会生活の真最中の若年者を襲い、再燃と緩解を繰り返し生涯にわたり治療の継続を余儀なくされる難病であり新規治療法開発は急務な国民的要請である。21世紀に突入し、IBDに生物学的製剤の臨床応用が開始され従来の治療法に比べ格段と進歩したが決して根治に至るものではない。戦後わずか60年で激増する背景には遺伝子異常の要因より、環境の激変(衛生状況、食餌の欧米化など)が中心的に関与するものと我々は考えている。しかし、これまでIBD発症として環境因子の関与を提唱する学説は存在していたが、ほとんどが疫学的調査によるものであり、実験的実証はほとんど存在しない。

さらに、これまでの研究ではIBDには腸内細菌が必須であると証明されているが、実は発症での必須性のみ証明されているだけであり、IBD腸炎維持に必須であることは証明されていない。この点に着目し、我々はマウスモデルで、無菌システムと移入大腸炎モデルと組み合わせることによって、驚くべきことに、腸炎惹起性メモリーT細胞は腸内細菌の存在をもって腸炎を再発することばかりではなく、驚くべきことに、無菌状態でもIL-7依存性に長期にメモリー細胞として生体に生存可能であることを証明した(J Immunol. 2010)。このことはIBDの根絶の方向として予防の重要性を示すものであり、ひとたび発症すると終世免疫によりIBDが永続するという従来からの我々の仮説を裏付けるものと言える。

さらには、近年の粘膜免疫学におけるトピックとして、Th17細胞のIBDにおける病因論の展開がある。これまで、Th1細胞とTh2細胞のバランスの乱れがIBD発症の要とされてきたが、突如、2003年にTh17細胞がすべての自己免疫疾患のキーとなる細胞集団として着目されるようになった(Cua DJ et al. Nature. 2003;421:744-8)。しかし、我々は2011年、Gastroenterology誌に腸炎惹起性Th17細胞はTh1細胞と独立して分化するのではなく、Th17細胞Th1細胞と直線的に分化する経路をin vivo腸炎モデルで発見した。このことはGastroenterology誌Editorialにおいて大々的に紹介され、注目を集めている。

本研究課題のための予備的検討では、UC、CDいずれにおいても治療介入によって症状の改善と一致して、*Bacteroides fragilis*, *Clostridium coccooides*, *Clostridium leptum*が健常レベルまで復帰することを最近見出した(Gastroenterology; submitted)。すなわち、IBD患者の腸内細菌環境の正常化維持システムを実験的に解明することはIBDの治療のみの応用ではなく、戦前はほとんど皆無で

あったIBDの罹患率まで引き下げるという予防的アプローチの可能性を秘め医療経済に多大な貢献をするものと信じている。確かにこれらの試みはすでに多くの発酵健康食品や乳酸飲料、さらにはプロバイオティクスとして応用されているのも事実であるが、実証医学的にはエビデンスに乏しいというのが世界的な現状である。

2. 研究の目的

我々がこれまでに数々発見してきたIBDでの免疫学的IBD病態機序、腸内細菌も含めた細菌学的な知見に立脚して、本研究課題ではライフスパン幼少期の徹底的腸内細菌パターン健全化というアプローチによるIBD発症予防という概念提唱し、ヒトIBDへの画期的な予防法の基盤的エビデンスの創出を目指す。すなわち、ヒト幼少期という極めて重要な時期に予防的に戦前腸内環境を作り上げる試みである。さらに、本研究プロジェクトは決してIBD領域だけに留まるものではなく、近年本邦で激増する自己免疫疾患へ応用可能なアプローチと言える。

3. 研究の方法

1) *Clostridium butyricum* (CB; Cluster I)の免疫性制御機構を明らかとするために、以下の実験を計画した。

- a) CBのノットマウスを作成し、GF、SPFと比較し、大腸での制御性T細胞の誘導能を検討する。
- b) CBのノットマウスを作成し、電子顕微鏡にてCBのマウス生体大腸での相互反応を検討する。
- c) CBのノットマウスを作成し、GF、SPFと比較し、腸炎重症度を検討する。
- d) heat-killed CBによる正常、腸炎大腸免疫担当細胞からのIL-10産生を検討する。
- e) IL-10 KOでのCB腸炎抑制能を検討する。
- f) マクロフォージ特異的IL-10欠損マウスのCB腸炎抑制能を検討する。

2) Dysbiosisによる生体疾患フェノタイプの変化を探索する目的で、以下の実験を計画した。

- a) 正常マウスに対して、グラム陽性腸内細菌を死滅する目的でバンコマイシン投与、グラム陰性腸内細菌に対してポリミキシンB投与を行ない、さらに、腸内細菌による生合成系を有するビタミンB7(ビオチン)欠乏食または通常食にて飼育し、体重変化、消化器症状を経時的に観察する。

4. 研究成果

1)

プロバイオティクス候補として *Clostridium butyricum* (CB)を詳細に検討した。これまで、*Clostridium coccooides* (Cluster IV), *leptum* (Cluster IVXa)の46種類のカクテルの報告はあったが、Cluster Iに属するCB単菌での効果は不明であった。1) CBには健常時は、*coccooides*, *leptum* カクテル同様、強力に

免疫抑制性の Foxp3+制御性 T 細胞をノトバイオートシステムで誘導すること明らかとした。2)CB は急性 DSS 腸炎を抑制することを明らかとしたが、制御性 T 細胞は炎症時には減少し、逆に IL-10 産生性のマクロファージが増加していることがわかった。3)制御性 T 細胞が存在しない Rag-2 欠損マウス DSS 腸炎モデルにおいても CB は腸炎抑制効果を認めた。4)しかし、マクロファージ特異的 IL-10 欠損マウスでは CB の腸炎抑制効果が認められなかった。5)さらに、CB を幼児期無菌マウスに接種すると DSS 腸炎を抑制することも明らかとした。以上、すでに、プロバイオティクスとして用いられている安全性が確認されている CB において、プロバイオティクスのユニークな作用機序;すなわち、CB は健常時は制御性 T 細胞、炎症時には抑制性マクロファージと二相性に in vivo で作用することを初めて明らかとした (Cell Host & Microbe 2013)

2)

腸内細菌 dysbiosis を人工的に誘導する目的で、ポリミキシン B またはバンコマイシン投与かつ、ビタミン B7 (ビオチン)欠乏食という特殊環境を SPF マウスに行なったところ、バンコマイシン投与かつビオチン欠乏によってのみ、マウス背部に広範な脱毛減少が出現することを見出した。本脱毛には炎症は伴わず、hair cycle 異常が予想された。本マウスにはその他、腸管、肝臓、肺臓などに異常を認めなかった。本マウスの極めて特徴的な dysbiosis として、lactobacillus 属菌が 60%を示す優位菌として存在し、その中である種の細菌単菌が異常増殖することを突き止めた。現在、その単離培養に成功したところである。

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)

1. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. Modelling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. Nature Medicine. 21(3):256-62. 2015 Mar. 査読有
2. Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. Semin Immunopathol. 37(1):47-55. 2015 Jan. 査読有
3. Hisamatsu T, Naganuma M, Matsuoka K, Kanai T. Diagnosis and management of intestinal Behcet's disease. Clin J Gastroenterol. 7:205-212. 2014. 査読有
4. Matsuoka K, Mizuno S, Hayashi A, Hisamatsu T, Naganuma M, Kanai T Fecal microbiota transplantation for gastrointestinal diseases. Keio J Med. 63(4):69-74. 2014 Dec 25. 査読有
5. Kanai T, Matsuoka K, Naganuma M, Hayashi

A, Hisamatsu T. Diet, microbiota, and inflammatory bowel disease: lessons from Japanese foods. Korean J Intern Med. 29(4):409-15. 2014 Jul. 査読有

6. Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, Oshima S, Nakamura T, Okamoto R, Tsuchiya K, Wanabe M. Bone marrow-mesenchymal stem cells are a major source of interleukin-7 and sustain colitis by forming the niche for colitogenic CD4 memory T cells. Gut. 62(8):1142-52. 2013 Aug. 査読有

7. Ono Y, Kanai T, Sujino T, Nemoto Y, Kanai Y, Mikami Y, Hayashi A, Matsumoto A, Takaishi H, Ogata H, Matsuoka K, Hisamatsu T, Watanabe M, Hibi T. T-helper 17 and interleukin-17-producing lymphoid tissue inducer-like cells make different contributions to colitis in mice. Gastroenterology. 143(5):1288-97. 2012 Nov. 査読有

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. 久松理一, 林 篤史, 松岡克善, 金井隆典 特集: 消化器領域の自己免疫性疾患 炎症性腸疾患研究の進歩 - 腸内細菌と IBD - 月刊「Medical Sciens Digest」2014 年 8 月号 P21~24 ニューサイエンス社 査読有
2. 小野祐一, 金井隆典, 筋野智久, 三上洋平, 林 篤史, 松本淳宏, 半田一己, 松岡克善, 久松理一, 根本泰宏, 渡辺 守, 日比紀文 粘膜免疫からみた炎症性腸疾患の病態と制御 Naturally-occurring Th17 細胞と Colitogenic Th17 細胞の分化発達におけるリンパ装置の必須性 消化器と免疫 49 号 p26-29, 2013. 査読有
3. 岩男 泰, 松岡克善, 井上 詠, 吉田諭史, 杉野吉則, 長沼 誠, 緒方晴彦, 小林 拓, 矢島知治, 久松理一, 金井隆典, 三上修治 【炎症性腸疾患 2013】 炎症性腸疾患の経過 炎症性腸疾患に合併する腸管腫瘍 潰瘍性大腸炎関連大腸癌の検討 胃と腸 48 巻 5 号 p737-747, 2013 査読有

〔学会発表〕(計 21 件)

1. Hisamatsu T, Matsuoka K, Naganuma M, Miyoshi J, Inoue N, Yajima T, Mizuno S, Saigusa K, Nakazato Y, Mori K, Takeshita K, Nanki K, Kiyohara H, Iwao Y, Ogata H, Kanai T. Early Intervention With Adalimumab May Contribute To Favorable Clinical Efficacy In Patients With Crohn 'S Disease. Asian Pacific Digestive Week Bali, Indonesia. November 23-25, 2014
2. Naganuma M, Okuda S, Hisamatsu T, Matsuoka K, Hosoe N, Kashiwagi K, Kanai T, Ogata H. MR enterography is useful for assessment of CD lesions and strictures in patients with secondary loss of responsiveness for biologics.

The 2nd Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis. Seoul, Korea, June 19-21, 2014

3. Saigusa K, Hisamatsu T, Handa T, Sujino T, Mikami Y, Hayashi A, Mizuno S, Takeshita K, Sato T, Matsuoka K, Kanai T. ROR γ t-independent classical Th1 cells have the potential to be colitogenic in the presence of ROR γ t-expressing T cells
The 2nd Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis. Seoul, Korea, June 19-21, 2014

4. Saigusa K, Kanai T, Sujino T, Handa T, Hayashi A, Mikami Y, Mizuno S, Matsumoto A, Matsuoka Y, Sato T, Hisamatsu T, Hibi T. Colitogenic Th17 Cells may Help the Generation of Colitogenic ROR γ t-Independent Classical Th1 Cells.
16th International Congress of Mucosal Immunology. Vancouver, Canada, July 17-20 2013

5. Kanai T, Hayashi A, Sato T, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T, Yoshimura A, Kamada N, Yagita H, Hibi T. Clostridium butyricum induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute colitis.
The 1st Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis. Tokyo, Japan, June 13-14 2013

〔図書〕(計 1 件)

1. 金井隆典 長沼誠 Crohn病 菅野健太郎、上西紀夫、小池和彦編 消化器疾患最新の治療 2015-2016 p206-210 東京南江堂 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 隆典 (Takanori Kanai)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：40245478