

平成 30 年 8 月 24 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02534

研究課題名(和文) ヒト疾患糞便移植マウスモデルを用いた炎症性腸疾患ディスバイオーシスの解明

研究課題名(英文) To identify the mechanism of inflammatory bowel disease by using human microbe mono-associated mouse

研究代表者

金井 隆典 (KANAI, TAKANORI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：40245478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：無菌マウスに潰瘍性大腸炎(UC)と原発性硬化性胆管炎(PSC)合併患者便を移植した。PSC/UC患者便移植マウスで肝臓Th17細胞が増加した。PSC/UC患者便にKlebsiella pneumonia(Kp)を始め3菌が高い頻度で検出された。3菌を無菌マウスに移植する(PSCマウス)と肝臓にTh17細胞の誘導を認めた。PSCマウスは胆管炎モデルで肝機能が増悪することが判明した。Kpとヒト大腸上皮細胞との共培養系において、Kpが上皮細胞のアポトーシスを誘導した。PSCの病態に、Kpが腸管上皮細胞を破壊し、“leaky gut”を誘導するという新規メカニズムを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We transplanted feces of ulcerative colitis (UC) and primary sclerosing cholangitis (PSC) patients to germ-free (GF) mice (UC mice or PSC/UC mice). The ratio of Th17 cells was significantly increased in the liver of the PSC/UC mice compared to the UC mice. Klebsiella pneumonia (Kp), Proteus mirabilis, Enterococcus gallinellus were frequently detected in feces of PSC+UC patient. We inoculated these three bacteria to GF mice (3 microbe mix mice; 3 mix mice). Th17 cells were accumulated in the liver. We also confirmed 3mix mice induce severe liver damage after DDC treatment compare to UC mice. Kp is found in the lamina propria of Kp mono associated mice. Kp induced epithelial cell apoptosis by using co-culture of Kp and human colon epithelial cells. As above, we revealed Kp destroys intestinal epithelial cells and induces "leaky gut" in the pathological condition of PSC.

研究分野：下部消化管

キーワード：腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

アジア諸国のなかでも、自国初のオリンピック開催時期と一致して、日本(1960年代)、韓国(1980年代)、中国(2000年代)の順で、急速に炎症性腸疾患患者数が増加している。我が国でも、1960年代から、感染症(結核、A型肝炎)が減少する一方、炎症性腸疾患だけでなく、喘息、アレルギー、アトピー性疾患、リウマチ疾患、肥満、糖尿病も急速に増加し、ガン、心血管疾患と並ぶ、生活習慣病の一部として、我が国の疾病構造、医療経済の観点からも大きな社会問題となっている。日本民族の中で、最近50年という短期間に100倍まで罹患率が増加した原因は、遺伝素因だけではの説明は不可能であり、環境因子;インフラ整備による衛生環境の改善、多忙を極める近代社会における効率性の追求、抗生物質の過使用、食事の欧米化(逆日本食;高脂肪低繊維食)こそが主因であることが推定されている。しかし、ヒトというヘテロな集団における疫学的な調査は極めて困難で、例えば、地中海食が心血管疾患の予防効果があるとするスペインでの大規模な前向き介入試験に50億円の費用を要したのも事実である。また、従来、慢性免疫疾患として認識されることがなかった、肥満、糖尿病、動脈硬化、パーキンソン病、自閉症など、近代国家で増加を続ける疾患群も、環境因子の変化に伴った腸内細菌の変化(Dysbiosis)がもたらす慢性微小炎症を背景に増加していると推定され、腸内細菌を一つの重要臓器として捉え、包括的に理解することは極めて重要な課題と言える。本研究課題では、炎症性腸疾患の臨床領域の代表的な研究者グループとしての利点を最大限に生かし、日常臨床で遭遇する増加し続ける炎症性腸疾患患者のフレッシュな糞便を無菌マウスに摂取して“ヒト糞便化モデル”を確立し、ヒト臨床研究では不可能であった、以下の4つの課題に挑戦する。

- (1)ヒト腸内細菌構成の乱れ(Dysbiosis)が疾患発症に影響することを直接的に証明する。
- (2)食事介入によるヒト腸内細菌Dysbiosisは正の可否を直接的に証明する。
- (3)プロバイオティクによるヒト腸内細菌Dysbiosisは正の可否を直接的に証明する。
- (4)ヒト健康人糞便微生物移植法によるヒト腸内細菌Dysbiosisは正を直接的に証明する。

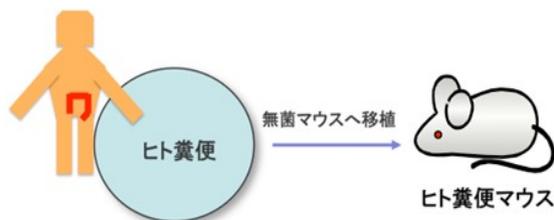
2. 研究の目的

ヒト共生生命体である腸内細菌が、健康長寿や慢性免疫疾患の病態にとって極めて重要な「臓器」として注目を集め、健康人の糞便を移植する治療まで行なわれるようになってきた。また、世界一の長寿国家である日本が誇る“日本食”が、日本人独自の腸内細菌叢を構築していることも知られており、研究代表者のグループは日本人に適合した最初

の糞便微生物移植開発の臨床試験を開始している。本研究課題では、我が国で急増する免疫難病・炎症性腸疾患における腸内細菌叢の役割を、ヒト疾患糞便を無菌マウスに移植する“ヒト糞便化マウス”というユニークな手法により解明する。日本人初の糞便微生物移植を実施したグループとして、本“ヒト糞便化マウス”モデルを用いて、腸内細菌叢形成、既存腸内細菌によるcolonization resistanceのメカニズムを明らかにし、より効率の優れたヒト糞便微生物移植法の確立を目指す。

3. 研究の方法

ヒト腸内細菌をin vivoで追跡する方法として、無菌動物施設を設置し、ヒト糞便を無菌マウスに移植し、ヒト糞便化マウスモデルの確立を目指す。さらに、先住腸内細菌がドナー細菌を排除する‘定着抵抗;colonization resistance’のメカニズムを解明し、それを克服することで糞便微生物移植(FMT)への道を開く。本研究は近年注目されているFMTへの基礎的データを蓄積し、最終的には臨床へのトランスレーション研究を期間内に実施することを目的とする。



4. 研究成果

潰瘍性大腸炎(UC)に原発性硬化性胆管炎(PSC)を合併した患者に焦点を当てた。まず、無菌マウスの腸管内へUC+PSC合併患者糞便を移植した。結果、UC+PSC糞便移植マウスでは肝臓内にIL-17陽性のTh17細胞が著明に増加することを見出した。UCの日常臨床において治療難治の患者に対して、メトロニダゾールをしばしば用いるが、メトロニダゾール投与後の糞便を移植したマウスでは肝臓内Th17細胞が著明に健常人糞便移植マウスレベルまで減少することを見出した。したがって、メトロニダゾール投与前後の糞便を詳細に検討することで、ヒト疾患に直接関与する悪玉菌の同定に格好のモデルを確立した。もう一つの仮説として、肝臓内Th17細胞誘導悪玉菌は腸管外の肝臓へ移行するという仮説を立て、UC+PSC糞便移植マウスの肝臓を無菌的に採取し嫌気性培養を試みている。最終的に、(1)原発性硬化性胆管炎(PSC)患者糞便中にKlebsiella pneumoniae菌が極めて高い頻度で検出された。同様に、Proteus mirabilis, Enterococcus gallineumも高い頻度で検出された。(2)これら三菌を無菌マウスに移植すると(PSマウス)、大腸、小腸のみならず、肝臓にTh7細胞の誘導を認めた。

(3) PSC マウスは PSC 様の胆管炎を自然発症することはなかったが、DDC 胆管炎モデルの誘導をかけると、コントロールに比し増悪することが判明した。(4) PSC マウスの大腸局所での FISH での検討では、三菌の粘膜内への侵入、大腸粘膜内への侵入を観察した。

(5) *Klebsiella pneumoniae* 菌のみの無菌マウス移植でも *Klebsiella pneumoniae* 菌は大腸内へ侵入することを確認した。(6) PSC マウスの全身臓器での細菌検出を実施したところ、脾臓、肝臓ではなく、腸間膜リンパ節のみで三菌が検出された。(7) *Klebsiella pneumoniae* 菌と二次元オルガノイドヒト大腸上皮細胞との共培養系において、*Klebsiella pneumoniae* 菌が上皮細胞にアポトーシスの誘導を確認した。(8) *Klebsiella pneumoniae* 菌のみの無菌マウス移植によって腸管透過性の亢進が認められた。

以上、免疫難病とこれまで考えられていた PSC の病態に、Proteobacteria 属の *Klebsiella pneumoniae* 菌が腸管上皮細胞を破壊し、“leaky gut”を誘導するという新規のメカニズムを明らかとした。また、PSC の病的な *Klebsiella pneumoniae* 菌は腸管から腸管膜リンパ節へ移動し、全身の免疫反応に関与することを明らかとした。今後は、腸間膜リンパ節という司令塔がいかに肝臓免疫を惹起するのかを明らかとする必要がある。このように、本研究は、副腎皮質ホルモンが無効という矛盾した免疫難病である PSC が自己免疫疾患ではなく、細菌による慢性感染症という新たな概念につながる発見と位置づけている。

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 24 件)

(1) Sugimoto S, Ohta Y, Fujii M, Matano M, Shimokawa M, Nanki K, Date S, Nishikori S, Nakazato Y, Nakamura T, Kanai T, Sato T, Reconstruction of the Human Colon Epithelium In Vivo, *Cell Stem Cell*, 査読有、2 巻、2018、171-176

DOI: 10.1016/j.stem.2017.11.012.

(2) Teratani T, Tomita K, Suzuki T, Furuhashi H, Irie R, Hida S, Okada Y, Kurihara C, Ebinuma H, Nakamoto N, Saito H, Hibi T, Miura S, Hokari R, Kanai T. Free cholesterol accumulation in liver sinusoidal endothelial cells exacerbates acetaminophen hepatotoxicity via TLR9 signaling, *J Hepatol*, 査読有、4 巻、2017、780-790

DOI: 10.1016/j.jhep.2017.05.020.

(3) Hayashi A, Mikami Y, Miyamoto K, Kamada N, Sato T, Mizuno S, Naganuma M, Teratani T, Aoki R, Fukuda S, Suda W, Hattori M, Amagai M, Ohyama M, Kanai T, Intestinal Dysbiosis and Biotin

Deprivation Induce Alopecia through Overgrowth of *Lactobacillus murinus* in Mice, *Cell Rep*, 査読有、7 巻、2017、1513-1524
DOI: 10.1016/j.celrep.2017.07.057.

(4) Nakamoto N, Amiya T, Aoki R, Taniki N, Koda Y, Miyamoto K, Teratani T, Suzuki T, Chiba S, ChuPS, Hayashi A, Yamaguchi A, Shiba S, Miyake R, Katayama T, Suda W, Mikami Y, Kamada N, Ebinuma H, Saito H, Hattori M, Kanai T, Commensal *Lactobacillus* controls immune tolerance during acute liver injury in mice, *Cell Reports*, 査読有、5 巻、2017、1215-1226
DOI: 10.1016/j.celrep.2017.10.022.

(5) Naganuma M, Sugimoto S, Mitsuyama K, Kobayashi T, Yoshimura N, Ohi H, Tanaka S, Andoh A, Ohmiya N, Saigusa K, Yamamoto T, Morohoshi Y, Ichikawa H, Matsuoka K, Hisamatsu T, Watanabe K, Mizuno S, Suda W, Hattori M, Fukuda S, Hirayama A, Abe T, Watanabe M, Hibi T, Suzuki Y, Kanai T, Efficacy of *Indigo naturalis* in a Multicenter Randomized Controlled Trial of Patients with Ulcerative Colitis, *Gastroenterology*, 査読有、4 巻、2017、935-947、

DOI: 10.1053/j.gastro.2017.11.024.

(6) Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, Matano M, Takano A, Fujii M, Date S, Sugimoto S, Kanai T, Sato T, Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells, *Nature*, 査読有、544 巻、2017、13-14

DOI: 10.1038/nature22081. [Epub ahead of print]

(7) Mizuno S, Nanki K, Matsuoka K, Saigusa K, Ono K, Arai M, Sugimoto S, Kiyohara H, Nakashima M, Takeshita K, Naganuma M, Suda W, Hattori M, Kanai T, Single fecal microbiota transplantation failed to change intestinal microbiota and had limited effectiveness against ulcerative colitis in Japanese patients, *Intest Res*, 査読有、15 (1) 巻、2016、68-74

DOI: 10.5217/ir.2017.15.1.68.

(8) Sugimoto S, Naganuma M, Iwao Y, Matsuoka K, Shimoda M, Mikami S, Mizuno S, Nakazato Y, Nanki K, Inoue N, Ogata H, Kanai T, Endoscopic morphologic features of ulcerative colitis-associated dysplasia classified according to the SCENIC consensus statement, *Gastrointest Endosc*, 査読有、85 (3) 巻、2016、639-646
DOI: 10.1016/j.gie.2016.11.013.

(9) Matsumoto T, Motoya S, Watanabe K, Hisamatsu T, Nakase H, Yoshimura N, Ishida T, Kato S, Nakagawa T, Esaki M, Nagahori M, Matsui T, Naito Y, Kanai T, Suzuki Y, Nojima M, Watanabe M, Hibi T, Adalimumab Monotherapy and a Combination with

- Azathioprine for Crohn's Disease: A Prospective, Randomized Trial. J Crohns Colitis、査読無、10 (11) 巻、2016、1259-1266
DOI: 10.193/ecco-jcc-jjw152
- (10) Naganuma M, Okuda S, Hisamatsu T, Matsuoka K, Mori K, Hosoe N, Nakazato Y, Ogata H, Kanai T, Findings of ulceration and severe stricture on MRE can predict prognosis of Crohn's disease in patients treated with anti-TNF treatment、Abdom Radiol (NY)、査読有、42(1)巻、2016、141-151、DOI:10.1007/s00261-016-0878-5.
- (11) Naganuma M, Hisamatsu T, Matsuoka K, Kiyohara H, Arai M, Sugimoto S, Mori K, Nanki K, Ohno K, Mutaguchi M, Mizuno S, Bessho R, Nakazato Y, Hosoe N, Inoue N, Iwao Y, Ogata H, Kanai T, Endoscopic Severity Predicts Long-Term Prognosis in Crohn's Disease Patients with Clinical Remission, Digestion、査読有、93 (1) 巻、2016、66-71.
DOI: 10.1007/s00261-016-0878-5.
- (12) Sugimoto S, Naganuma M, Kiyohara H, Arai M, Ono K, Mori K, Saigusa K, Nanki K, Takeshita K, Takeshita T, Mutaguchi M, Mizuno S, Bessho R, Nakazato Y, Hisamatsu T, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Kanai T, Clinical Efficacy and Safety of Oral Qing-Dai in Patients with Ulcerative Colitis: A Single-Center Open-Label Prospective Study, Digestion、査読有、93 (3) 巻、2016、193-201
DOI: 10.1159/000444217
- (13) Sugimoto S, Naganuma M, Kanai T, Indole compounds may be promising medicines for ulcerative colitis、J Gastroenterol、査読有、51 (9) 巻、2016、853-61
DOI: 10.1007/s00535-016-1220-2
- (14) Arai M, Naganuma M, Sugimoto S, Kiyohara H, Ono K, Mori K, Saigusa K, Nanki K, Mutaguchi M, Mizuno S, Bessho R, Nakazato Y, Hosoe N, Matsuoka K, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Kanai T, The Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS) is useful to predict medium to long-term prognosis in ulcerative colitis patients with clinical remission, J Crohns Colitis、査読有、10 (11) 巻、2016、1303-1309
DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjw104
- (15) Fujii M, Shimokawa M, Date S, Takano A, Matano M, Nanki K, Ohta Y, Toshimitsu K, Nakazato Y, Kawasaki K, Uraoka T, Watanabe T, Kanai T, Sato T, A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis, Cell Stem Cell、査読無、18 (6) 巻、2016、827-38
DOI: 10.1016/j.stem.2016.04.003.
- (16) Kiyohara H, Mizuno S, Naganuma M, Kanai T, Up-to-date medical treatment for ulcerative colitis, Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi、査読有、113 (3) 巻、2015、413-23
DOI: 10.11405/nisshoshi.113.413
- (17) Naganuma M, Hisamatsu T, Matsuoka K, Kiyohara H, Arai M, Sugimoto S, Mori K, Nanki K, Ohno K, Mutaguchi M, Mizuno S, Bessho R, Nakazato Y, Hosoe N, Inoue N, Iwao Y, Ogata H, Kanai T, Endoscopic Severity Predicts Long-Term Prognosis in Crohn's Disease Patients with Clinical Remission, Digestion、査読有、93(1)、2015、66-71
DOI: 10.1159/000441767. Epub
- (18) Nanki K, Mizuno S, Naganuma M, Kanai T, Inflammatory bowel disease and the intestinal microbiota Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi、査読有 112(11)、2015、1947-55
DOI: 10.11405/nisshoshi.112.1947
- (19) Hisamatsu T, Wada Y, Kanai T, Inflammatory bowel disease and bone decreased bone mineral density, Clin Calcium、査読有、25(11)、2015、1639-44
DOI: CliCa151116391644. Japanese
- (20) Hisamatsu T, Ono N, Imaizumi A, Mori M, Suzuki H, Uo M, Hashimoto M, Naganuma M, Matsuoka K, Mizuno S, Kitazume MT, Yajima T, Ogata H, Iwao Y, Hibi T, Kanai T, Decreased Plasma Histidine Level Predicts Risk of Relapse in Patients with Ulcerative Colitis in Remission, PLoS One、査読有、10(10)、2015、e0140716
DOI: 10.1371/journal.pone.0140716.
eCollection 2015
- (21) Kiyohara H, Hisamatsu T, Matsuoka K, Naganuma M, Kameda H, Seta N, Takeuchi T, Kanai T, Crohn's Disease in which the Patient Developed Aortitis during Treatment with Adalimumab、査読有、Intern Med、54(14)、2015、1725-32
DOI: 10.2169/internalmedicine.54.3853
- (22) Takayama T, Okamoto S, Hisamatsu T, Naganuma M, Matsuoka K, Mizuno S, Bessho R, Hibi T, Kanai T, Computer-Aided Prediction of Long-Term Prognosis of Patients with Ulcerative Colitis after Cytoapheresis Therapy, PLoS One、査読有、10(6)、2015、e0131197
DOI: 10.1371/journal.pone.0131197
- (23) Naganuma M, Hosoe N, Kanai T, Ogata H, Recent trends in diagnostic techniques for inflammatory bowel disease, Korean J Intern Med、査読有、30(3)、2015、271-8
DOI: 10.3904/kjim.2015.30.3.271
- (24) Kanai T, Mikami Y, Hayashi A, A breakthrough in probiotics: Clostridium butyricum regulates gut homeostasis and

anti-inflammatory response in inflammatory bowel disease, *Journal of Gastroenterology*, 査読有、50(9)、2015、928-39
DOI: 10.1007/s00535-015-1084-x

[学会発表] (計 19 件)

(1) 中本 伸宏, 谷木 信仁, 金井 隆典, 腸内細菌, 腸管粘膜バリアの修飾を介した肝臓内免疫応答・免疫寛容誘導機序、第 103 回日本消化器病学会総会、2017 年

(2) 中本伸宏, 谷木信仁, 金井隆典, 原発性硬化性胆管炎の病態における腸内細菌の関与、第 59 回日本消化器病学会大会、2017 年

(3) 金井隆典, 腸疾患における糞便微生物移植法の現状と将来、日本大腸肛門病学会(招待講演) 2016 年

(4) 福田知広, 長沼 誠, 金井隆典, 治療抵抗性・難治性潰瘍性大腸炎に対する青黛の有用性、第 58 回日本消化器病学会、2016 年

(5) 大野恵子, 長沼 誠, 金井隆典, 内視鏡的活動期の潰瘍性大腸炎に対する治療介入が臨床経過と粘膜治癒に与える影響、第 58 回日本消化器病学会、2016 年

(6) 杉本真也, 金井隆典, 佐藤俊朗, 腸管上皮オルガノイドを用いた幹細胞移植技術の確立、第 58 回日本消化器病学会、2016 年

(7) 金井 隆典, 腸内細菌を標的にした疾患治療、44 回日本臨床免疫学会総会(招待講演)、2016 年

(8) 寺谷 俊昭, 中本 伸宏, 千葉 明子, 鈴木 貴博, 水野 慎大, 長沼誠, 金井 隆典, gut-liver-brain axis によるマウス大腸炎抑制制御メカニズム、第 53 回日本消化器免疫学会総会、2016 年

(9) 水野 慎大, 正岡 建洋, 金井 隆典, 治性消化管疾患に対する糞便微生物移植法の経過報告、第 102 回日本消化器病学会総会、2016 年

(10) 中里 圭宏, 長沼 誠, 金井 隆典, エンドサイトを用いた潰瘍性大腸炎内視鏡的寛解例における組織学的活動度評価の意義、第 102 回日本消化器病学会総会、2016 年

(11) 牟田口 真, 長沼 誠, 金井 隆典, 炎症性腸疾患に対する外来ステロイド療法の有用性、第 102 回日本消化器病学会総会、2016 年

(12) 杉本 真也, 長沼 誠, 金井 隆典, カプセル化した青黛の潰瘍性大腸炎の寛解導入における有用性、第 102 回日本消化器病学会総会、2016 年

(13) 水野慎大, 南木康作, 長沼誠, 金井隆典, 炎症性腸疾患における腸内細菌の関与、第 43 回日本臨床免疫学会総会、2015 年

(14) 久松理一, 細江直樹, 金井隆典 非特異性多発性小腸潰瘍症の診断における内視鏡下生検の意味、第 89 回日本消化器内視鏡学会、2015 年

(15) Katsuyoshi Matsuoka, Makoto Naganuma,

Takanori Kanai, New drug development for inflammatory bowel disease in Japan: an example of collaboration among academia, industry, and government.、第 101 回日本消化器病学会、2015

(16) 南木康作, 武内悠里子, 金井隆典, 潰瘍性大腸炎患者におけるサイトメガロウイルス活性化に対しての抗ウイルス療法の必要性の検討、第 101 回日本消化器病学会、2015 年

(17) 金井隆典, 長沼誠, 岩男泰, 潰瘍性大腸炎合併大腸癌・dysplasia の内視鏡的危険因子の検討、第 101 回日本消化器病学会、2015 年

(18) 久松理一, 細江直樹, 金井隆典, ワークショップ 4「小腸疾患：病態解明への新たな知見」、第 101 回日本消化器病学会、2015 年

(19) 中里圭宏, 長沼誠, 金井隆典, クロウン病生物学的製剤 2 次無効例に対する画像評価の有用性、第 101 回日本消化器病学会、2015 年

[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]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 隆典 (KANAI, Takanori)
慶應義塾大学・医学部 (消化器内科)・教授
研究者番号：40245478

(2) 研究分担者

長沼 誠 (NAGANUMA, Makoto)

慶應義塾大学・医学部（消化器内科）・准
教授
研究者番号：00265810

(3) 研究分担者

久松 理一 (HISAMATDU, Tadakazu)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：60255437

平成 27 年度のみ

(3) 連携研究者 無

()

研究者番号：

(4) 研究協力者 無