

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15298

研究課題名(和文) プロバイオティクス優位腸内細菌パターン形成ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of new vaccine therapy to promote the symbiotic bacteria in gut.

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患発症に関して特異的な腸内細菌への絞込みを目的とし、健常人(HC)、原発性硬化性胆管炎合併潰瘍性大腸炎(PSC/UC)患者糞便を無菌マウスへ移植したマウス(HCマウス、PSC/UCマウス)を作成し、PSC/UCマウスでは肝臓内Th17細胞の集積を認めた。PSC/UCマウスのみでKlebsiella pneumonia, Proteus mirabilis, Enterococcus gallinarumの同定培養に成功。Q-PCR法にて解析しPSC/UC患者に高頻度にこれらの腸内細菌が検出。ある特定の悪玉菌の腸内細菌が腸管外病変へ関与する事を見出し、発展性が期待できる成果と考える。

研究成果の概要(英文)：Regarding the onset of inflammatory bowel disease, it is important to reduce the diversity of intestinal microbiota. We generated the mice inoculated with healthy human feces (HC mice) or primary sclerosing cholangitis-associated ulcerative colitis (PSC / UC) patient feces (PSC/UC mice) and analysed a week after transplantation. In PSC / UC mice, Th17 cells was accumulated in liver compare to the HC mice. Next, we isolated 3 dominant microbiota in mesenteric lymph node of PSC/UC mice. Klebsiella pneumonia, Proteus mirabilis and Enterococcus gallinarum were isolated. We also analysed fecal microbiota in Healthy controls and PSC/UC patients. Analysis by the Q-PCR method confirmed that these intestinal bacteria were detected more frequently in PSC / UC patients than in HC control. We demonstrated that certain intestinal microbiota are involved in extraintestinal lesions. We will further promote vaccine therapy with the analysis of these bacteria.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：下部消化管 免疫学 炎症性腸疾患 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌は21世紀に発見された新臓器であり、腸内細菌の構成バランスが崩れた不安定化が、近年、我が国を含む先進諸国で増え続ける慢性免疫疾患（炎症性腸疾患、リウマチ疾患、喘息、アレルギー、肥満、糖尿病、自閉症）の原因と考えられている。しかし、これらの疾患の制圧のために、さらなるブレイクスルーが必要である。本研究課題において、学童期の免疫機構成立期前後に、候補悪玉菌死菌をワクチンとして投与し、人工的に免疫記憶を獲得する斬新な方法論を着想し、慢性免疫難病制圧の挑戦に挑む。本発想は、善玉菌を非自己、善玉菌を自己と正確に認識するシステムを免疫機構成立期に完成させるための悪玉菌死菌をワクチンとして利用した介入であり、能動免疫によって悪玉菌の定着を生涯にわたって拒絶するシステムであり、安価で慢性免疫難病疾患の発症を抑制する画期的なストラテジーを樹立する挑戦である。

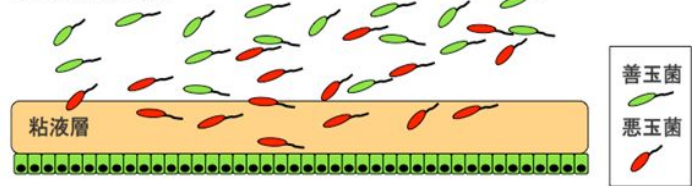
2. 研究の目的

我が国のように、腸チフス、コレラなど致死性感染症を制圧した近代国家では、1960年代から、喘息、アレルギー、アトピー、炎症性腸疾患、リウマチ疾患、膠原病などの、多くは慢性免疫難病が急速に増加し、疾病構造、医療経済の観点からも、ガン・心血管疾患に並んで、大きな社会問題となっている。主因として、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過度な追求、食事の欧米化（高脂肪低繊維食）、抗生物質の過使用などが主因であると考えられるが、疾患の本質は、“腸内細菌”であり、まさに21世紀に新認識された臓器とも言える。また、増え続けるこれらの疾患はヘリコバクター・ピロリ菌のような、ある単一の細菌による病態ではない。近年の次世代シーケンサーの進歩に伴う解析により、ヒト一個体のなかで数百種類からなる腸内細菌の構成パターンの乱れ（Dysbiosis；善玉菌<悪玉菌）が根本的な原因ではないかと考えられている。しかし、これまでの研究では、腸内細菌には短鎖脂肪酸（酪酸、プロピオン酸、酢酸など）の代謝産物を産生する善玉菌（プロバイオティクス菌；Bifidobacteria, Lactobacilli, Clostridium coccoides, Clostridium leptum, Clostridium butyricum, Faecalibacterium prausnitzii）、硫化窒素などを産生する悪玉菌（Ruminococcus gnavus, Enterbacteriaceae, Desulfovibrio）と漠然とした分類がなされているが、疾患の本質に迫り、治療、予防を達成するには至っていないのが現状である。

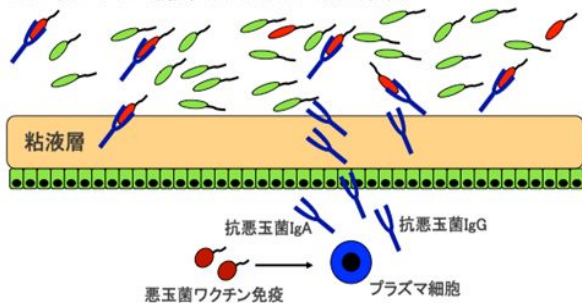
我々は、腸内細菌は免疫未発達な乳児期から学童期に、健常であれば、善玉菌を自己と、悪玉菌を非自己と認識する後天的システムを有するという仮説を立て、自己/非自己の決定プロセス完了以前に、これまで知られて

いる培養可能な悪玉菌成分を能動免疫するワクチンを摂取することで、善玉菌優位な腸内細菌構成を自己と認識するシステムを確立することを目的とする。古い時代の生活環境へ回帰することが困難な現代の背景の中で、ワクチンによる能動免疫を実施することで、常に悪玉菌を排除する生体システムを人工的に作り出す画期的な試みと言える。本研究は、炎症性腸疾患に焦点を絞って実施するものであるが、予想される研究成果は、腸内細菌Dysbiosis（パターンの乱れ）が原因の多くの生活習慣病へ応用可能な成果であり、極めてユニークで意義のある研究課題と言える。

現代人の腸内細菌



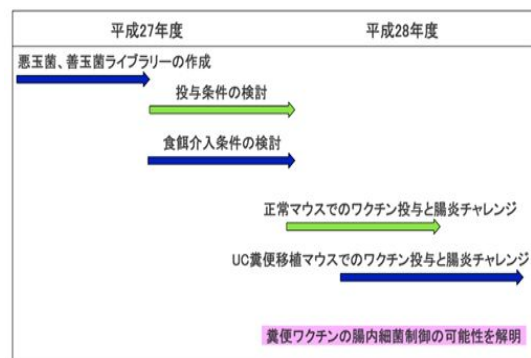
悪玉菌ワクチンを接種した現代人の腸内細菌



3. 研究の方法

(1) 2年間の課題期間で、平成27年度は、これまで知られている培養可能な炎症性腸疾患患者糞便から分離された腸内細菌（悪玉菌）の調整と投与条件を検討する。

(2) 平成28年度は、得られた死菌ワクチンをマウスに投与し、腸炎予防能を確認する。さらに、我々のグループが開発した、潰瘍性大腸炎糞便を無菌マウスへ移植した、ヒト糞便化マウスモデルを用いて、すでに存在するDysbiosis状態を回復する効果があるか否かを明らかとする。



平成 27 年度

善玉菌、悪玉菌培養ライブラリーの作成

善玉菌ライブラリー；健康食品のヨーグルト菌や整腸剤プロバイオティクスはヒト生体においては、そのほとんどが通過菌であるため、今回の課題では使用しない。短鎖脂肪酸代謝産物を産生する善玉菌（プロバイオティクス菌；Bifidobacteria, Lactobacilli, Clostridium coccooides, Clostridium leptum, Clostridium butyricum, Faecalibacterium prausnitzii）をヒト健常人から分離培養した菌を用いる。

悪玉菌ライブラリー；これまで知られている、炎症性腸疾患で増加する硫化窒素などを産生する悪玉菌(Ruminococcus gnavus, Enterbacteriaceae)を分離培養した菌を用いる。

分離培養した腸内細菌を、善玉菌群と悪玉菌群の 2 種類のカクテルを作成し、ホモジェネート後加熱滅菌し善玉菌死菌ワクチン（コントロール）、悪玉菌死菌ワクチン（Dysbiosis 抵抗性獲得ワクチン）として用いる。

死菌ワクチン摂取タイミング、摂取量条件の検討

3, 6, 9 週齢マウスにさまざまな摂取量の上記善玉菌ワクチンと悪玉菌ワクチンの 2 種類のカクテルを腹腔内投与し、12 週齢時の糞便腸内細菌の metagenomics 解析（東京大学新領域創成科学；服部正平教授との連携研究）を実施することによって、腸内細菌構成パターンの変動をもとに、指摘条件を決定する。

高脂肪低繊維食 vs. 低脂肪高繊維食条件の検討

上記で検討した、善玉菌ワクチンと悪玉菌ワクチン投与マウスにおいて、さまざまな組み合わせで作成した高脂肪低繊維食または低脂肪高繊維食を摂取させ、経時的な腸内細菌叢の変化を解析する。

平成 28 年度

本実験前の条件の決定

平成 27 年度の検討に基づき、善玉菌ワクチン、悪玉菌ワクチンの摂取量、摂取タイミング、高脂肪低繊維食、低脂肪高繊維食条件を決定する。

ワクチン投与実験

通常食摂取 SPF 正常 B6 マウス, 3 週齢(仮)に、善玉菌カクテル死菌ワクチン、善玉菌カクテル死菌ワクチン腹腔内投与を実施する。陰性コントロールとして無投与群。

オミックス解析

ワクチン接種後、高脂肪低繊維食、低脂肪高繊維食への切り替え、経時的な(3, 6, 9, 12 週齢時)糞便腸内細菌の metagenomics 解析(連携研究員；東京大学新領域創成科学；服部正平教授) metabolome 解析(連携研究員；慶應義塾大学先端科学研究所)を実施す

る。

腸炎感受性試験

ワクチン投与 9 週後(12 週齢)に、各群マウスに 10 日の 2.5% DSS 飲水を開始し、経時的な腸炎重症度を評価するとともに、糞便腸内細菌の metagenomics 解析、metabolome 解析を実施する。

分泌型免疫グロブリンによる腸内細菌分析

ワクチン投与 9 週後(12 週齢)DSS 投与前の糞便を採取し、IgA 接着性、IgG 接着性細菌を蛍光標識抗 IgA 抗体、抗 IgG 抗体染色後、フローサイトメトリーによって分離する。得られた細菌の metagenomics 解析を実施する。IgA 接着性、IgG 接着性細菌、IgA 非接着性、IgG 非接着性細菌を新たな無菌マウスに移植し、DSS 腸炎感受性重症度を検討する。

ヒト糞便化マウスでの検証

上記、(1)～(5)と同一の系を、3 週齢無菌 B6 マウスに、ヒト潰瘍性大腸炎患者糞便を移植したヒト潰瘍性大腸炎糞便移植マウスを用いて実施する。本ヒト糞便化マウス研究によって、悪玉菌死菌ワクチンによる腸内細菌ディスバイオーシス(dysbiosis)は正効果の有無を検証する

4. 研究成果

炎症性腸疾患の発症に関しては、腸内細菌の乱れ(dysbiosis)と多様性の減少が重要である。特異的な腸内細菌への絞り込みを目的として、健常人(HC)、原発性硬化性胆管炎合併潰瘍性大腸炎(PSC/UC)患者糞便を無菌マウスへ移植したヒト糞便化マウス(HC マウス、PSC/UC マウス)を作成した。PSC/UC マウスでは肝臓内 Th17 細胞の集積を認めた。また、PSC/UC マウスで serum amyloid A の発現亢進も確認した。この現象は HC マウスでは認めなかった。このことは、腸管外合併症としての PSC 免疫現象に腸内細菌が関与する証拠であり、次に、責任腸内細菌を同定する目的で、我々は腸管ではなく腸間膜リンパ節が腸管外免疫反応の責任部位と仮説を立て、同部位の嫌気性培養を実施したところ、PSC/UC マウスのみで Klebsiella pneumonia, Proteus mirabilis, Enterococcus gallinarum の同定培養に成功した。Q-PCR 法にて解析したところ、PSC/UC 患者に高頻度これらの腸内細菌が検出されることを確認した。ある特定の悪玉菌の腸内細菌が腸管外病変へ関与することを見いだしており、発展性が期待できる成果と考えている。今後、これらの悪玉菌細菌によるワクチン開発をさらに推進していきたい。

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 5 件)

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*. doi:10.5217/ir.2017.15.1.68. 15(1)2017.68-74 査読有

Kiyohara H, Mizuno S, Naganuma M, Kanai T. Up-to-date medical treatment for ulcerative colitis. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*, doi:10.11405/nisshoshi.113.413.113(3) 2016, 413-23. 査読有

Nanki K, Mizuno S, Naganuma M, Kanai T. Inflammatory bowel disease and the intestinal microbiota. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. doi:10.5217/ir.2017.15.1.68. 112(11) 2015, 1947-55. 査読有

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*. doi: 10.1371/journal.pone.0140716, 10(10)2015, 査読有

Kanai T, Mikami Y, Hayashi A. A breakthrough in probiotics: *Clostridium butyricum* regulates gut homeostasis and anti-inflammatory response in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*, doi: 10.1007/s00535-015-1084-x. ;50(9):2015, 928-39. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

金井隆典、大腸疾患における糞便微生物移植法の現状と将来、大腸肛門病学会会 2016.11.18, 三重県サンアリーナ(三重県津市)

金井隆典、腸内細菌を標的とした疾患治療、2016.9.9、第44回日本臨床免疫学会総会、京王プラザホテル(東京都新宿区)

水野慎大、南木康作、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、2015.10.23、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

久松理一、細江直樹、金井隆典、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、2015.4.23、仙台国際センター(宮城県仙台市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

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・教授

研究者番号：40245478