

令和元年5月29日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15966

研究課題名(和文) 難治性消化管疾患に対する糞便微生物移植法の最適化を目指した腸内細菌叢解析

研究課題名(英文) Intestinal microbiota analysis aiming at optimization of fecal microbiota transplantation for intractable digestive tract diseases

研究代表者

水野 慎大 (Mizuno, Shinta)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：70528695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎患者の再燃リスクや5-ASA製剤不耐症の発症に腸内細菌が関わっていることが示唆され、皮膚炎が腸管内のラクトバチルス属細菌を介して腸炎悪化に寄与することも明らかにした。さらに、糞便微生物移植が抑うつ症状の改善につながる可能性があることを明らかにした。本研究を通じて、5-ASA製剤不耐症や精神疾患、皮膚炎が糞便微生物移植法の新たな対象疾患となり得ることが明らかになるとともに、腸内細菌を介した新たな臓器相関の存在も示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化器疾患との関連が多く検討されてきた腸内細菌叢について、様々な臓器と深い関連があることが明らかにされつつあるが、具体的な治療介入とその有効性については不明な点が多かった。本研究を通じて、皮膚、精神科的疾患、薬剤不耐症など、多くの疾患に対して腸内細菌改変を目指した糞便微生物移植法が適応となる可能性が示された。今後の研究によってより適切な投与法の確立につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：This study suggested that intestinal microbiota was involved in the risk of relapse in patients with ulcerative colitis and development of 5-ASA intolerance and dermatitis contributed to exacerbation of colitis via Lactobacillus bacteria in the intestinal tract. Furthermore, we clarified that fecal microbial transplantation may lead to amelioration of depressive symptoms. Through this study, it becomes clear that 5-ASA drug intolerance, psychiatric disorder and dermatitis may be new target diseases of fecal microbiota transplantation, and also indicate the existence of new organ correlation via intestinal microbiota.

研究分野：炎症性腸疾患

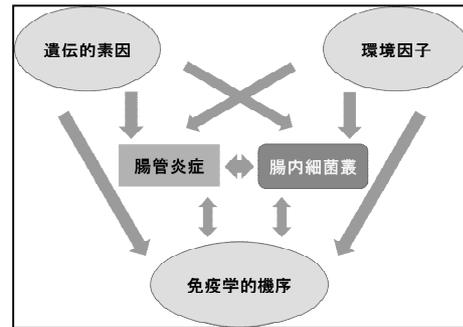
キーワード：腸内細菌 糞便微生物移植法 臓器相関

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎(UC)は、遺伝的素因・環境因子・免疫学的機序が相互に影響する多因子疾患と考えられてきたが、根本的な病因は不明である。現行治療は免疫学的機序に働きかける治療だが、環境因子の一つである腸内細菌叢への介入も注目を浴びている。ヒトの腸管には人体の構成細胞総数(約60兆個)以上の腸内細菌が生息し、総体として一臓器並みの存在感を誇っている。次世代シーケンサーなどの技術革新により、腸内細菌の数や構成菌種のバランスが崩れる(dysbiosis)と、腸管の器質的・機能的障害につながる事が明らかになった。炎症性腸疾患(IBD)患者の腸内細菌叢の解析で、健常者より Clostridium 属 cluster 1a が減少していることや、活動期 UC 患者の大腸で *Fusobacterium varium* が増加していることも報告された(Ohkusa T. *Gut*. 2003)。研究代表者らのグループでも、*Clostridium butyricum* が IL-10 産生性マクロファージを誘導して腸炎を抑制すること(Hayashi A. *Cell Host Microbe*. 2013)や、同菌が樹状細胞から TGF- β の産生を促し、炎症を抑制していること(Kashiwagi I. *Immunity*. 2015)、Clostridium 属細菌が UC 患者で減少していることを明らかにしてきた(Takeshita K, Mizuno S. *Inflamm Bowel Dis*. 2016)。

これまでの知見をまとめると、右図のように腸内細菌叢は独立して IBD の病態に影響を与える因子と考えられる。



腸管外臓器と相関を有することも明らかになりつつあり、その代表例として「脳-腸相関」があげられる。感染性腸炎の治癒後に過敏性腸症候群(IBS)様の症状を生じる post-infectious IBS 患者の腸内細菌叢で健常人より *Bacteroidetes* が増加し *Clostridia* は減少している(Jalanka-Tuovinen J. *Gut*. 2014)。感染性腸炎が dysbiosis を惹起し、代謝産物を介して中枢神経系に影響を及ぼす、という機序が想定される(Cryan JF. *Nat Rev Neurosci*. 2012)。

dysbiosis は腸管粘膜の接着分子の発現を低下させ、腸管粘膜バリア機構を破綻させて腸管蠕動に影響を及ぼしていると考えられる。IBS 患者の腸内細菌叢では *Bifidobacterium* と *Lactobacillus* が減少し(Mayer EA. *Gastroenterology*. 2014)、無菌ラットに IBS 患者と健常人の便を移植すると、IBS 群で大腸の痛覚過敏性が亢進した(Crouzet L. *Neurogastroenterol Motil*. 2013)。これらから、「脳-腸-腸内細菌」という臓器相関が示唆される。このように、器質的・機能的疾患の双方に腸内細菌叢が影響を与えていることが明らかになっているが、現状の腸内細菌叢への介入は整腸剤で行っている程度である。**腸内細菌叢の大幅な再構成で病態改善を図る試みの代表が糞便微生物移植法(FMT)である。**本法は難治性 *Clostridium difficile* 感染性腸炎(CDI)に対して既存治療の抗生剤投与と比して著しい治療効果・再発抑制効果を示して注目された(van Nood E. *N Engl J Med*. 2013)。UC に対しても 1980 年代後半から FMT の臨床応用が試みられているが有効性について一致した結果が得られていない。研究代表者は、2013 年より**本邦初の FMT に関する臨床研究を開始**した。活動期 UC 患者 10 名を対象として検討したが、改善した症例は 1 例のみだった(Mizuno S. *Intest Res*. 2017)。UC に対する FMT の有効性の評価が研究ごとに異なる主因は、患者背景・投与方法が統一されていないため、と考えられる。機能的疾患に対する検討は、70%の患者で症状が改善した、という case series(Pinn DM. *Am J Gastroenterol*. 2014)のみであり、研究代表者らは 2014 年から **IBS・機能的便秘症・機能的下痢症を対象とした本邦初の臨床研究を開始**した。IBS11 例、機能的便秘 1 例、機能的下痢 4 例に FMT を施行し、現時点で経過観察を終了している 13 例につき、 Bristol スケール(3~5 が通常便)で便性状を評価したところ、**8 例で症状の改善を認め、6 例(IBS3 例、機能的便秘症 1 例、機能的下痢症 2 例)で 12 週時点の便スケールの正常化を認めた。**これらの先行研究の結果を踏まえて、適切な患者群に、より効率的に腸内細菌叢を再構成することを目指して、研究代表者は腸内細菌叢再構成の最適化に関する研究を開始することとした。

2. 研究の目的

メタゲノム解析技術の発達により、腸内細菌叢が様々な疾患の病態に関わっていることが明らかになり、腸内細菌叢の再構成が病態改善に寄与することが期待されている。糞便微生物移植法は整腸剤投与に比して、質・量ともに圧倒的に細菌叢改変の可能性の高い手法として注目されている。しかし適応疾患・投与方法などについて、現状では十分に最適化されているとは言えず、潜在的なリスクも含む治療法である。本研究では、機能的疾患・器質的疾患の両面において先行研究にさらなる工夫を加えることによって、より洗練された効率的な手法を構築することを目指す。本研究を通じて、生物学的製剤や各種新規薬剤に比して、非常に安価で効率的な治療法開発につなげることを目指している。

(1) FMT 治療対象疾患の選別：研究代表者の先行研究では、既存治療抵抗性の活動期 UC 患者に施行して期待した成果を得ることはできなかった。しかし既報を比較検討すると、反復投与した研究や、特定の菌叢を保有するドナー便を優先して利用するなどの工夫を行った研究の方が有効性が高い。そのため、活動期の患者に投与することが適切か、単回投与ではなく反復投与を行うことで有効性が改善するか、新鮮便を利用することが最適か、という課題を解決したい。(2) 病態改善に有用な菌叢・代謝産物の絞り込み：器質的疾患と比較して、機能的疾患で

は腸管上皮の損傷が目立たない分、腸内細菌および代謝産物が病態に与える影響が大きいと推察される。機能性疾患を中心として、FMT 後の腸内細菌叢の変化を解析することによって、効率的に病態改善に寄与する菌叢や代謝産物を拾い上げることが可能になると期待される。上記の2点を明らかにすることによって、効率的に腸内細菌叢の再構成を行うことができる細菌カクテルやプレバイオティクスの開発につなげることが可能になる。これによって、未知の感染症の伝播、糞便調整の煩雑さ、投与の際の患者への内視鏡検査や前処置などの負担、といった現行のFMTの課題を全て解決しうると期待される。

3. 研究の方法

(1) 機能性消化管疾患の症例集積及び腸内細菌叢解析

本研究は、Rome 分類に基づいて診断された過敏性腸症候群・機能性便秘症・機能性下痢症の患者のうち、1年以上の既存の内科治療に抵抗する難治症例を対象としており、IBS・機能性便秘・機能性下痢の各疾患15例ずつを予定症例数として集積を行う計画としている。

ドナーは2親等以内の親族として、問診によって悪性疾患、慢性便秘・慢性下痢、重篤な他臓器障害、アトピー性皮膚炎などの既往を有する者を除外し、便潜血・便培養・採血で各種感染症や器質的疾患が否定された者をドナーとして選定する。スクリーニング検査前にドナー・患者双方に書面で説明・同意を行う。FMT当日は、ドナーから回収した糞便を当科実験室内の嫌気チャンパー内で生理食塩水を用いて懸濁する。粗大な残渣を除去した後、通常通りの前処置を行った患者に下部消化管内視鏡を施行する。内視鏡の鉗子孔から散布チューブを用いて盲腸に全量散布した後、速やかに内視鏡を抜去して終了する。

また、精神的ストレスがdysbiosisを誘導しうることや、うつ病の発症に腸内細菌叢が関与していることも明らかになりつつあるため、外来受診時(FMT後2・4・8・12週)に精神科医師との面談も行う計画としている。これによって腸内細菌叢の変化と精神症状の相関についても明らかにして、脳-腸相関の解明につなげたいと考えている。さらに、FMTによる腸内細菌叢の変化を追跡するために、FMT前後の外来受診時に12週に渡って患者より糞便の提供を受ける。ドナーからFMT時に糞便の提供を受けて、それぞれ16S rRNAを用いた細菌叢の解析を行う。当研究室で糞便からDNA抽出を行ったうえで、研究協力者である早稲田大学大学院の服部正平教授の研究室に送付し、次世代シーケンサーを用いて解析を行う。研究期間内に症例を蓄積し、臨床的な有効性の検証と並行して、有用な腸内細菌の絞り込みを行いたい。

(2) 潰瘍性大腸炎患者に対するFMTの改良

前述のように、活動期UC患者に対するFMTは期待された有効性は示されなかった。また、16S rRNAによる10例の腸内細菌叢解析結果から、FMT後に有意な多様性の回復も認められなかった。この主因として、活動期UC患者を対象としたため、腸管粘膜の損傷が著しく、移植したドナーの腸内細菌叢が患者の腸管内に生着し難い環境が作られていた可能性が考えられる。この観点から考えると、寛解期UCのように腸管粘膜が比較的保たれた状態で移植を行い、再燃予防を期待した方が理に適っているように考えられる。ただし、腸内細菌叢は個体差が大きいというのに安定性が高いことが知られているため、単回投与では効果が限定的と考えられる。そのため、先行研究と同様にスクリーニングを行った上で、ドナー便から投与用の便汁を調整する。調整した便汁を分割して凍結保存した上で、臨床的に寛解期のUC患者50名に対して、1回/月の間隔で3回の注腸投与を反復し、その後1年間に渡って臨床的に再燃の有無を観察すると同時に、定期的に患者の糞便を回収して、16S rRNAで腸内細菌叢解析を行う臨床計画を立案・施行する。

(3) 潰瘍性大腸炎患者の再燃に関わる腸内細菌の探索

FMTのUC再燃予防効果を評価する臨床研究では、再燃率が20%/年程度であることから、再燃の有無の比較検討に必要な症例数を2年間で集積できない可能性も考慮される。その際にも検討を行えるようにするために、寛解期UC患者の糞便を採取して、その後の1年間の再燃の有無と腸内細菌叢の関係を検討する研究を並行して行うこととする。

当院通院中のUC患者のうち、臨床的に寛解期と判断された100名より便検体の提出を受け、1年間の臨床経過の観察を行う。便検体提出日から1年以内に再燃した患者群と寛解群で腸内細菌叢の構成を比較検討する。再燃は部分 Mayo 3 または治療薬変更と定義する。これらの検討から再燃予測因子となる腸内細菌群を同定し、(2)の研究で回収した便における増減を確認する。これによって、(2)の研究の有効性について長期間の臨床経過を追わずとも良好な菌叢への変化の有無については評価できると期待される。

(4) 機能性消化管疾患の腸内細菌叢・代謝産物解析とモデルマウスを用いた検討

患者から回収した糞便は、腸内細菌叢の解析だけでなく代謝産物の解析も行うために、メタゲノム解析を行うことを予定している。FMTによる腸内細菌叢の変化のみならず、細菌叢の再構成に伴う短鎖脂肪酸に代表される代謝産物の変化と治療反応性の相関についても検討を行うことができる。機能性疾患についてさらに症例数を蓄積すると共に、今回注目しているBifidobacterium属細菌を含む菌叢の変化と治療反応性の相関関係について検討する。これらを通じて、機能性疾患とdysbiosisの関連についても明らかにしたい。さらに、現在着目している菌の有用性を確認するため、本研究室の無菌マウス飼育室を用いて作用機序を検討することを予定している。まず、B6マウスよりストレス耐性が低いとされるBALB/c無菌マウスにIBS患者から採取した糞便を投与し、強制水泳試験を反復することでモデルマウスを作製す

る。その上で、強制水泳試験を含めたストレス耐性の評価を行うことに加えて、糞便のメタボローム解析や、腸管周囲の神経叢の変化について免疫染色を用いた評価を検討する。これらを通じて、dysbiosis の改善に伴う腸管周囲の neural network の変化および脳-腸相関という臓器間 network の解明につなげたい。

4 . 研究成果

機能的消化管疾患に対して糞便微生物移植を施行し、精神科学的評価と 16S rRNA による腸内細菌叢解析によって、糞便微生物移植が抑うつ症状の改善につながる可能性があることを明らかにした(Kurokawa S. *J Affect Disord.* 2018)。また、臨床的寛解の潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢解析と並行して、1年間の再燃の有無を前向きに観察することで、再燃群と寛解維持群で一部の口腔内細菌や腸内細菌が再燃リスクと関わっている可能性が示唆された。また、潰瘍性大腸炎患者の 5-ASA 製剤不耐症は疾患予後を悪化させ、不耐症発症には腸内細菌叢の変化が関与していることを明らかにした(Mizuno S. *PLOS One.* under review)。さらに、Toll-like receptor 7 アゴニストによって誘発された皮膚炎が腸炎悪化に寄与することと、その発症機序に腸管内のラクトバチルス属細菌が深く関与していることを示し、腸内細菌を基軸とした皮膚・腸管相関が存在することを明らかにした(Kiyohara H. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2018)。

本研究期間内には、最適な投与法を示すことにはできなかったが、本研究を通じて、5-ASA 製剤不耐症や精神疾患、さらには皮膚炎が糞便微生物移植法の新たな対象疾患となり得ることが明らかになり、本研究が糞便微生物移植法の適応疾患の拡大や、腸内細菌が橋渡しをする新たな臓器相関の存在を明らかにしたことで、糞便微生物移植法の適応拡大のみならず、腸内細菌学的な解明を進めるべき新たな領域の存在を示したことで大きな意義があると考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

- (1) Hagihara Y, Yoshimatsu Y, Mikami Y, Takada Y, Mizuno S, Kanai T. Epigenetic regulation of T helper cells and intestinal pathogenicity. *Semin Immunopathol.* 査読有 in press (10.1007/s00281-019-00732-9)
- (2) Kurokawa S, Kishimoto T, Mizuno S, Masaoka T, Naganuma M, Liang KC, Kitazawa M, Nakashima M, Shindo C, Suda W, Hattori M, Kanai T, Mimura M. The effect of fecal microbiota transplantation on psychiatric symptoms among patients with irritable bowel syndrome, functional diarrhea and functional constipation: An open-label observational study. *J Affect Disord.* 査読有 235:506-512,2018. (DOI; 10.1016/j.jad.2018.04.038)
- (3) Kiyohara H, Sujino T, Teratani T, Miyamoto K, Mochizuki M, Nomura E, Harada Y, Aoki R, Koda Y, Mikami Y, Mizuno S, Naganuma M, Hisamatsu T, Kanai T. Dermatitis Induced by Toll Like Receptor 7 Agonist Causes Severe Dextran Sulfate Sodium Colitis via Altering Gut Microbiome and Immune Cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 査読有 7:135-156,2018. (DOI; 10.1016/j.jcmgh.2018.09.010)

[学会発表](計4件)

- (1) 大野 恵子, 水野 慎大, 長沼 誠, 金井 隆典. 寛解期潰瘍性大腸炎における腸内・口腔内細菌叢と予後の関連の前向き研究. 日本消化管学会総会 2018年
- (2) 正岡 建洋, 水野 慎大, 長沼 誠, 岸本 泰士郎, 黒川 駿哉, 中嶋 萌子, 竹下 梢, 須田 互, 三村 将, 服部 正平, 金井 隆典. 過敏性腸症候群患者に対する糞便移植の安全性、有効性についての検討. 日本消化管学会総会 2018年
- (3) 水野 慎大. 腸内細菌叢との共生を目指した治療戦略 up to date 第40回日本生物学的精神医学会/第61回日本神経化学会大会合同年会(招待講演)2018年
- (4) 水野 慎大. 潰瘍性大腸炎患者の5-ASA製剤不耐は入院の危険因子となる 第9回日本炎症性腸疾患学会 学術集会 2018年

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：服部 正平

ローマ字氏名：HATTORI, Masahira

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。