

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07931

研究課題名(和文) 硬化性胆管炎に対する腸内フローラを介した治療法の探索

研究課題名(英文) Intestinal microbiota as a therapeutic target of primary sclerosing cholangitis

研究代表者

小林 由佳 (Kobayashi, Yuka)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80724658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：原発性硬化性胆管炎と潰瘍性大腸炎のマウスモデルを用いて、腸内フローラが胆管炎の病態に与える影響を検討した。硬化性胆管炎モデルにメトロニダゾール+ネオマイシンの投与によって糞便中の細菌が減少し、胆管炎の改善がみられた。胆管周囲の炎症細胞浸潤、肝内のサイトカインの減少、また胆管周囲の膠原繊維の減少もみられた。また潰瘍性大腸炎モデルであるIL10ノックアウトマウスにも肝内の炎症を認め、メトロニダゾール+ネオマイシンの投与によって胆管炎、腸炎ともに改善がみられた。腸内フローラの改変によって硬化性胆管炎の病態をコントロールできる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発性硬化性胆管炎は原因不明であり、治療法も確立していない難病である。マウスモデルを用いて胆管炎と腸炎を調節する因子として腸内フローラに着目して検討し、抗生剤による腸内フローラの改変が胆管炎を減弱させることが明らかになった。今後病態に關与する特定の細菌の同定やその制御法を開発することで、原発性硬化性胆管炎の治療が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Primary sclerosing cholangitis (PSC) is a chronic inflammatory disease causing periductal fibrosis and ductal stenosis. PSC is sometimes accompanied with ulcerative colitis, but the pathogenesis is largely unknown and the treatment is not established. In this study, we examined the role of intestinal microbiota on the pathogenesis of PSC as well as gut-liver axis using PSC and colitis mouse model. Administration of antibiotics to different murine cholangitis model ameliorated the phenotype of cholangitis, such as leukocyte infiltration, fibrosis, and cytokine production. Antibiotic treatment reduced total bacterial number in feces and improved colonic inflammation. These results suggest the critical role of intestinal microbiota on the pathogenesis of PSC and ulcerative colitis.

研究分野：消化器病

キーワード：胆管炎 炎症性腸疾患 小腸 腸内細菌叢

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原発性硬化性胆管炎(PSC)は肝内外の胆管に線維性の狭窄をきたす慢性の炎症性疾患である。長期的には肝不全や胆管がんを生じ、肝移植の後に再発することも多く、予後は不良である。患者数は増加傾向にあり、若年者(20~40歳)に好発するため、病態の解明と治療法の開発が社会的にも重要である。PSCはしばしば炎症性腸疾患IBDを合併し、PSC-IBDという一連の病態があると考えられている。近年、腸内フローラの解析(次世代シーケンサーによるメタゲノム解析)により、PSC患者の腸内フローラは健常人とは有意に異なることが明らかにされた。このように、「腸肝相関」がPSCの発症・進展に深くかかわると考えられる。しかしながら、病態の解明はいまだ十分ではなく、治療法も確立されてない。PSCの基礎研究が世界的に進んでいない要因のひとつとして、よい動物モデルがないことが挙げられる。

我々はさまざまな癌で変異が認められる細胞間接着分子「E-cadherin」に着目し、遺伝子改変によって肝内胆管にPSCに類似した組織像をとるマウスを樹立した。また潰瘍性大腸炎モデルマウスでは腸内フローラの病原性を解明し、その制御法を開発してきた。

2. 研究の目的

マウスモデルを用いて硬化性胆管炎の病態における腸内フローラの役割を解明しその制御法を開発する。

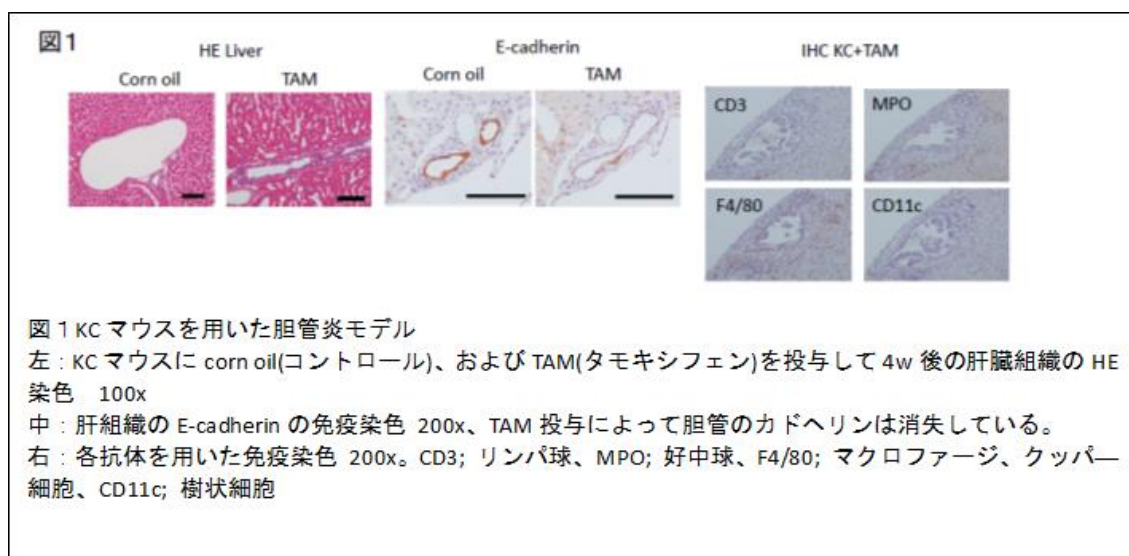
3. 研究の方法

原発性硬化性胆管炎モデルとして既報に従いK19-creERT; CDH1 f/fマウスにタモキシフェンを投与して作成した。抗生剤は飲水中にメトロニダゾール1g/L、ネオマイシン1g/Lの濃度で混入して投与した。潰瘍性大腸炎モデルとしてIL10ノックアウトマウスを用いた。胆管病理像はHE染色で検討し、免疫染色で炎症細胞浸潤をシリウスレッド染色で膠原繊維を判定した。肝組織のホモジネートをコラーゲナーゼで処理し、細胞を分離してフローサイトメーターで解析した。同様に肝組織のホモジネートからRNAを抽出し定量的PCRでサイトカイン発現を検討した。腸内細菌叢は糞便の血液寒天培地での培養、糞便DNAの16SrRNAの定量的PCRで検討した。

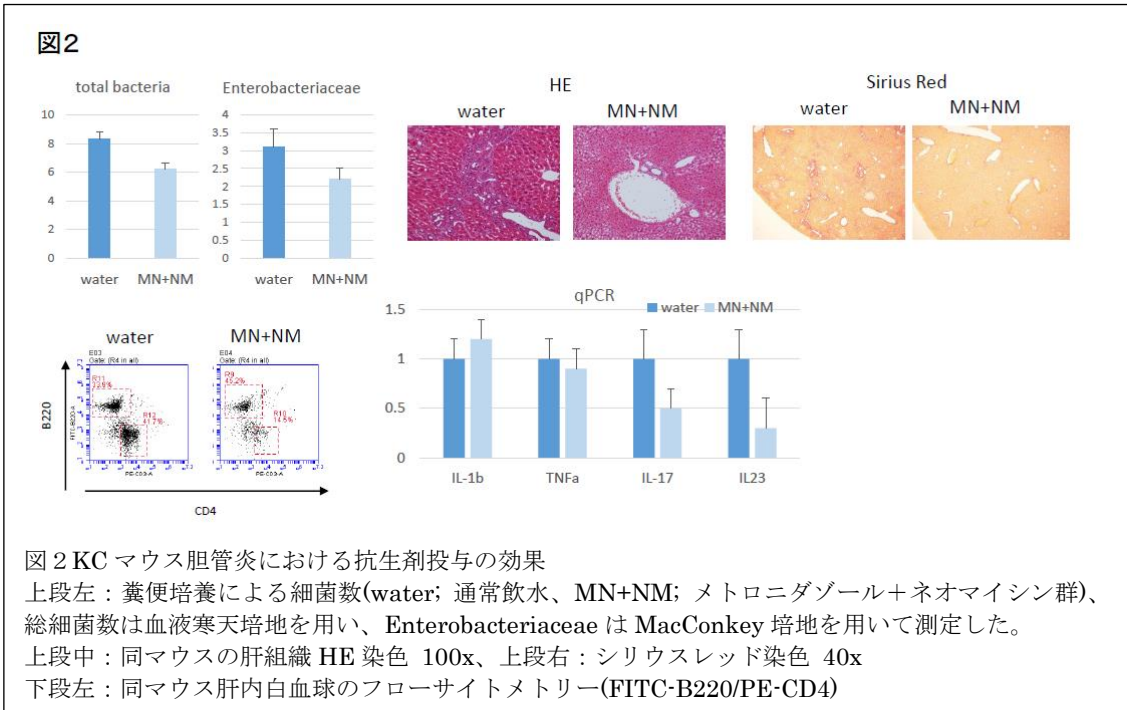
4. 研究成果

1. マウス原発性硬化性胆管炎モデルにおける抗生剤の効果

原発性硬化性胆管炎モデルであるKRT19陽性細胞誘導性CDH1ノックアウトマウスモデルにタモキシフェンの投与によって遺伝子変異を誘導した。通常飲水群ではタモキシフェン投与後4wで胆管上皮のカドヘリンの消失とともに胆管周囲にCD3陽性リンパ球、MPO陽性好中球、F4/80陽性マクロファージなどの炎症細胞浸潤がみられ、またシリウスレッド陽性の膠原繊維の増生を認めた(図1)。

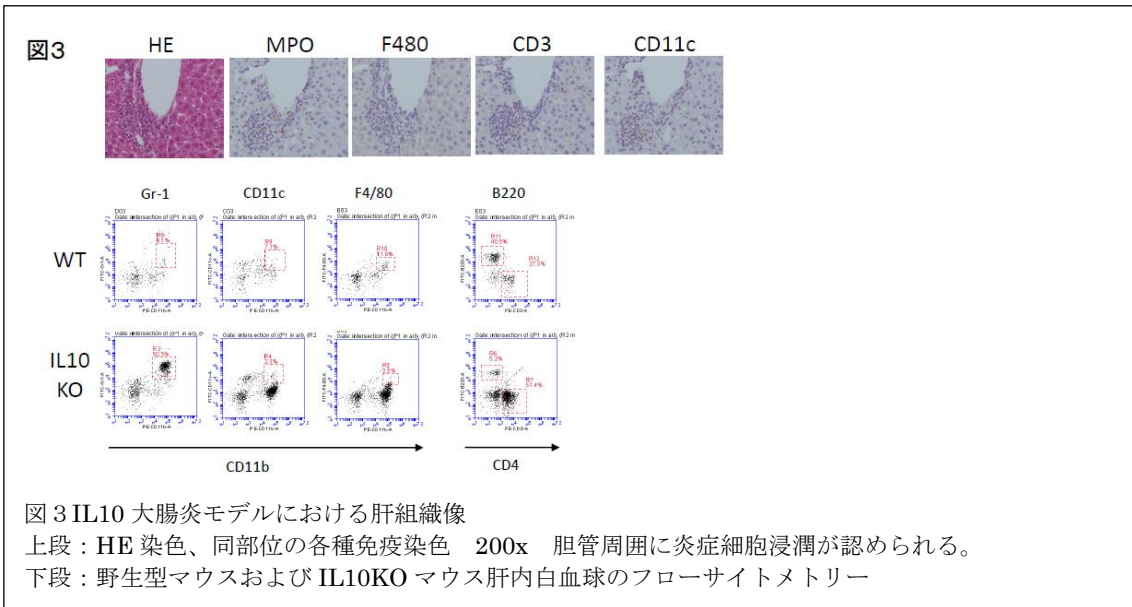


このモデルにメトロニダゾールとネオマイシンを投与したところ、糞便中の総細菌数が約1/100に減少、腸内細菌科細菌数が約1/10に減少し、また4w後の胆管像で炎症細胞浸潤の減弱、シリウスレッド陽性の膠原繊維の減少がみられた。またCD3陽性リンパ球の減少とIL17のmRNA低下も認められた(図2)。これらから胆管上皮細胞遺伝子変異による胆管炎モデルにおいて腸内フローラの改変は炎症性サイトカインやリンパ球を介して胆管炎を減弱する可能性が示唆された。



2. 大腸炎モデルにおける胆管像と腸内フローラの解析

大腸炎モデルである IL10 ノックアウトマウスの胆管病理像を検討した。HE 染色により肝内、そして胆管周囲に炎症細胞浸潤を伴う胆管炎が見られた。KRT19 陽性細胞誘導性 CDH1 ノックアウトマウスモデルに比してシリウスレッド陽性の膠原繊維の沈着、 α SMA 陽性細胞浸潤は目立たなかった。一方浸潤炎症細胞はリンパ球に加え、CD11c 陽性樹状細胞、F480 陽性マクロファージ、MPO 陽性好中球など骨髄球系の細胞がとくに増加していることが分かった。肝組織の mRNA 発現では野生型マウスに比して TNFa、IL-1b、CXCL1 などのサイトカイン、ケモカインの発現増加がみられた (図3)。



IL10 ノックアウトマウスにメトロニダゾール+ネオマイシンを投与したところ、腸炎、胆管炎ともに飲水群に比べ著明に減弱した。肝組織のフローサイトメトリーで、IL10 ノックアウトマウスの肝内には CD3 陽性リンパ球、CD11b 陽性 Gr1 陽性好中球が著明に増加していたが、抗生剤投与によってほぼ野生型マウスレベルまで減少した (図4)。IL10 のノックアウトマウスモデルの胆管炎においても腸内フローラの変化によって病態の制御が可能と考えられた。

図4

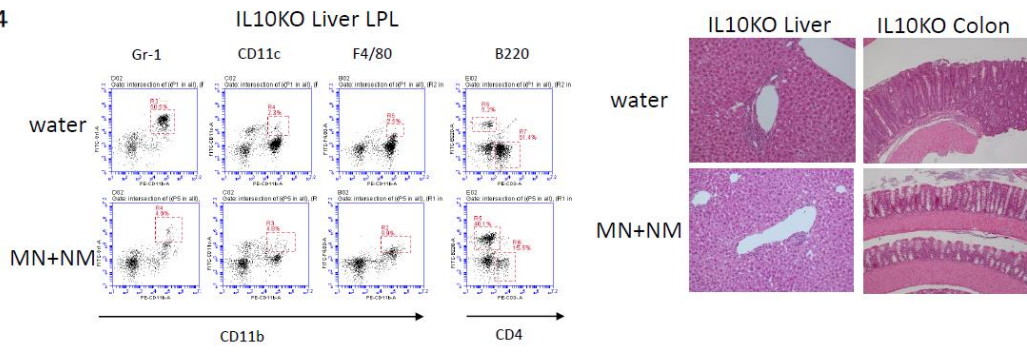


図4 IL10KO マウス胆管炎における抗生剤投与の効果
左：肝組織白血球のフローサイトメトリー 上段；飲水群 下段；抗生剤投与群
右：肝組織および大腸組織の HE 染色 100x

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木下裕人、平田喜裕
2. 発表標題 原発性硬化性胆管炎における腸内細菌叢の役割解明と新規治療法の開発
3. 学会等名 東京大学医科学研究所国際共同研究拠点成果報告会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中川 勇人 (Nakagawa Hayato) (00555609)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	木下 裕人 (Kinoshita Hiroto) (50645322)	公益財団法人朝日生命成人病研究所・その他部局等・教授 (移行) (82654)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------