

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08401

研究課題名(和文) クローン病における小腸特異的細菌の探索と感受性遺伝子TNFSF15の関連性の解明

研究課題名(英文) analysis of small intestine-specific bacteria in Crohn's disease and an investigation of TNFSF15, a disease-prone gene

研究代表者

山本 博徳 (Yamamoto, Hironori)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10311937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：クローン病27例と対照患者17例から小腸サンプルを収集し、細菌叢解析では2群間に有意差が見られた。菌種レベルでは大腸菌を含む18菌種がクローン病に多く認められ、大腸菌を含む9菌種を分離した。この9菌種を個別にまた混合して無菌マウスに投与し、腸管粘膜の免疫細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、大腸菌において強いinterferon- γ +CD4+T細胞と弱いinterleukin-17+CD4+T細胞の誘導を認めた。無菌化IL-10KOマウスまたは抗IL-10R抗体処理した無菌化野生型マウスに大腸菌株を投与したところ、腸炎の悪化が認められ、クローン病の悪化に大腸菌の関与が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クローン病を含む炎症性腸疾患は難治性の疾患で、しかも若年者に多いことから、その発症は大きな社会的損失となる。近年、様々な治療薬が開発されているが、根本的な治療法は現時点で存在しない。以前から、腸内細菌叢とこれら疾患発症との関連が指摘されていたが、これまでは糞便を用いた研究であったため、そこで分離された細菌が原因菌なのか不明であった。今回我々は、病変の主座のある小腸から腸内細菌を分離し、モデル動物マウス投与において疾患を一部再現できることを明らかにした。よって本研究で得られた知見は今後新規治療法の開発に役立つと考えられ、その点においても社会的意義の大きい研究であったと自負している。

研究成果の概要(英文)：We collected samples from the small intestine in 27 patients with Crohn's disease and 17 control subjects. There was a significant difference in component of gut microbiota between Crohn's disease and control subjects. At the species level, a total of 18 bacteria, including Escherichia coli, were increased in Crohn's disease. We finally succeeded to isolate and culture 9 bacteria, including Escherichia coli. Then, germ-free mice were inoculated each bacterium or the mixture of bacteria. We found that immune cells were induced in the mucosa of small intestine, in which a strong induction of interferon- γ +CD4+T cells and a weak induction of interleukin-17+CD4+T cells. Escherichia coli was then inoculated into germ-free IL-10 KO mice or germ-free mice treated with anti-IL-10 antibody. These mice showed an exacerbation of inflammation of the small intestine. Thus, we concluded that Escherichia coli is associated with the development of Crohn's disease.

研究分野：消化器内科学分野

キーワード：クローン病 腸内細菌 免疫 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

クローン病における腸内細菌叢研究は主に糞便を用いて解析されてきたが、クローン病は小腸が病変の主座であり、小腸細菌叢が病態に大きく関与していることが示唆される。そのため、小腸に定着している細菌をターゲットにして解析を行うことがより妥当であると考えられる。当教室が開発したダブルバルーン小腸内視鏡はこれまで採取が難しかった深部の小腸細菌叢サンプルを得ることができる。また当教室には多くのクローン病患者が通院しているとともに、全国でも有数の小腸内視鏡の集積施設であり、多くのサンプルを収集可能であることから本研究を立案企画した。

2. 研究の目的

本研究はクローン病の病態解明とそれによる新規治療ターゲットの創出を将来的なゴールとし、今回の具体的な目標を以下の3点とする。(1).小腸細菌の解析によりクローン病の病態に関わる細菌を特定する。(2).特定されたクローン病関連菌が実際に腸管免疫系に影響を与え、腸炎を引き起こすか明らかにする。(3).特定されたクローン病関連菌が腸管免疫系にどのようなメカニズムで影響を与えるか明らかにする。

3. 研究の方法

- 1). クローン病患者と対照患者から小腸内視鏡を用いて小腸サンプルを収集し、次世代シーケンサーにて細菌叢解を行うことによりクローン病関連菌を特定する。
- 2). 無菌マウスにクローン病関連菌を投与して腸管の免疫細胞の動態を解析する。
- 3) 腸炎モデルマウスにクローン病関連菌を投与して腸炎が誘導されるか解析する。クローン病関連菌で誘導される炎症性免疫細胞の働きが免疫恒常性維持か組織障害性かどうかを明らかにするために、無菌化した IL-10-knockout (KO) ノックアウトマウス(腸炎モデル)や SAMP1/Yit マウス(クローン病モデルマウス)にクローン病関連菌を投与し、病理学的に腸炎の形成を評価する。
- 4). TNFSF15-KO マウスと TNFSF15-transgenic (Tg)マウスを用いた解析により TNFSF15/DR3 シグナルの関与を検証する。TNFSF15 は樹状細胞などから分泌されるサイトカインの一つで、その受容体である DR3 は主にリンパ球に発現してそのシグナルを伝えるとされる。TNFSF15 は日本人クローン病において最も強い感受性遺伝子であり、クローン病の発症メカニズムに迫る上で重要なターゲットと考えている。クローン病関連菌で活性化された TNFSF15/DR3 シグナルが Th1/Th17 の誘導に関与しているかを明らかにするために、無菌化した TNFSF15-KO マウスにクローン病関連菌を投与し

Th1/Th17 の誘導がキャンセルされるか、逆に TNFSF15-Tg マウスで増強されるか検証する。

4 . 研究成果

クローン病患者 27 例と対照患者 17 例からダブルバルーン小腸内視鏡を用いて小腸サンプル(粘膜生検または粘膜擦過サンプル)を収集した。サンプルから細菌 DNA を抽出し、細菌叢組成を解析したところ、合計 2,260 の operational taxonomic units (OTUs) が得られた。統計学的比較により、2 群間に有意な違いが見られた。Phylum (門) レベルでは Proteobacteria 門と Bacteroidetes 門がクローン病に多く、family (科) レベルでは Enterobacteriaceae 科、Ruminococcaceae 科、Bacteroidaceae 科がクローン病に多く認められた。逆に Firmicutes 門、Streptococcaceae 科はクローン病で少なかった。さらに菌種レベルでは Escherichia coli、Ruminococcus gnavus をはじめとする 18 菌種がクローン病に多く認められた。クローン病患者から得られた小腸サンプルを用いて好気または嫌気環境下に網羅的に細菌単離を行い、Escherichia coli、Ruminococcus gnavus を含む 9 菌種を単離し得た。この 9 菌種を個別に培養し混合した菌液を無菌マウスに経口投与して、3 週間後に腸管粘膜固有層の免疫細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、大腸において強い interferon- γ CD4⁺T 細胞 (1 型ヘルパー T 細胞; TH1 細胞) と弱い interleukin-17⁺CD4⁺T 細胞 (17 型ヘルパー T 細胞; TH17 細胞) の誘導を認めた。また、腸管組織の定量 PCR にて TNFSF15 とその受容体である DR3 の発現を解析したところ、大腸菌投与群においていずれも有意に発現が上昇していることが示された。腸炎モデルマウスを用いた実験については、無菌化 IL-10 ノックアウトマウスまたは抗 IL-10R 抗体を腹腔内投与した無菌化野生型マウスに大腸菌株を投与したところ、腸炎の悪化が認められ、クローン病の悪化に大腸菌の関与が明らかとなった。TNFSF15-KO マウスと TNFSF15-transgenic(Tg) マウスを用いた解析は現在進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagayama M, Yano T, Atarashi K, Tanoue T, Sekiya M, Kobayashi Y, Sakamoto H, Miura K, Sunada K, Kawaguchi T, Morita S, Sugita K, Narushima S, Barnich N, Isayama J, Kiridooshi Y, Shiota A, Suda W, Hattori M, Yamamoto H, Honda K.	4. 巻 12
2. 論文標題 TH1 cell-inducing Escherichia coli strain identified from the small intestinal mucosa of patients with Crohn's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut Microbes	6. 最初と最後の頁 1788898 ~ 1788898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19490976.2020.1788898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔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 永山学、矢野智則、関谷万理子、坂本博次、三浦光一、砂田圭二郎、河口貴昭、森田覚、本田賢也、山本博徳
2. 発表標題 クローン病の小腸細菌叢解析から同定されたクローン病関連大腸菌は腸炎誘導能を有する
3. 学会等名 第58回日本小腸学会総会
4. 発表年 2020年 ~ 2021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	矢野 智則 (Yano Tomonori) (30438634)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	
研究分担者	三浦 光一 (Miura Kouichi) (90375238)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	

6. 研究組織（つづき）

	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	永山 学 (Nagayama Manabu) (80741347)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	

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