

機関番号：32651

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591209

研究課題名（和文）新規抗菌薬療法による潰瘍性大腸炎の粘膜フローラの変化と治療効果：DNA多型解析

研究課題名（英文）Mucosa-associated bacteria in ulcerative colitis before and after new antibiotic combination therapy: DNA polymorphism analysis

研究代表者

大草 敏史（OHKUSA TOSHIFUMI）

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：50160445

研究成果の概要（和文）：

潰瘍性大腸炎患者を抗菌薬投与群と偽薬投与群に分け大腸粘膜の細菌 DNA を採取し Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (T-RFLP) 法にて、治療前後の細菌叢を調べたところ、T-RFLP プロファイルの変動が認められたのは、抗菌薬投与群で 12 例中 10 例（83.3%）で、偽薬群では変動は認められなかった（0%）（ $p=0.0007$ ）。また、*Fusobacterium varium* について、その治療前後の推移を特異的 PCR 法によって解析し、抗菌薬投与群で減少していることを確認した。さらに、粘膜から RNA を採取して、2 例のメタゲノム解析を行った。抗菌薬療法で 3 カ月後、12 ヶ月後と緩解が持続した症例では、*Bacteroidaceae*, *Acidaminococcus*, *Prevotella*, *Parabacteroides* などが著明に減少していることがわかった。それに対して偽薬群では粘膜細菌数の減少・増加は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：We examined the efficacy of three-antibiotics combination therapy against *F. varium*, and investigated the mucosa-associated bacteria before and after the therapy using a molecular approach. Twenty patients with ulcerative colitis were randomly assigned into the antibiotic treatment group (amoxicillin, tetracycline, and metronidazole for 2 weeks) of 12 patients and placebo group of 8 patients. Colonoscopic biopsy was performed at 0, 3 and 12 months after the treatment. DNA from mucosal bacteria was isolated from biopsy specimens. We investigated the mucosa-associated bacterial components by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) with the restriction enzyme HhaI, and quantified the change in the number of *Fusobacterium varium* by real-time PCR. After the treatment, profile changes of T-RFLP were found after treatment in 10 of 12 patients in the antibiotic group and none of 8 patients in the placebo group ($p=0.0007$). Based on the real time PCR study, *F. varium*/actin ratio was reduced after treatment in 8 of 12 patients (67%) in the antibiotic group and 4 of 8 patients (50%) in the placebo group. Mucosal RNA extracts were also analyzed by Nextera RNA sequencing system. The number of *Bacteroides*, *Acidaminococcus*, *Prevotella*, *Parabacteroides* were decreased in the antibiotic group. Some number of mucosa-associated bacteria significantly decreased after the antibiotics combination therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

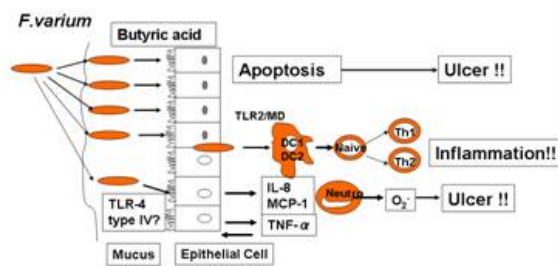
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：潰瘍性大腸炎、粘膜細菌フローラ、細菌 DNA、T-RFLP 法、メタゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

IL-2、IL-10 ノックアウトマウスの自然発生腸炎では腸内細菌が原因と考えられている。また、樹状細胞に発見された Toll-like receptor (TLR)が、腸内細菌に反応して獲得免疫系を活性化することや、CD における疾患関連遺伝子で細菌に対する核内レプターである NOD2 の遺伝子異常が発症に関与していることも報告され、腸内細菌が潰瘍性大腸炎 (UC) の原因または、炎症増悪因子として考えられてきた (Curr Opin Gastroenterol 2003;19:358-65)。

我々は、UC の病変粘膜に細菌が接着し、侵入していることを発見し (J Gastroenterol Hepatol 8:116-118, 1993)、その菌の同定し、腸内細菌である *Fusobacterium varium* が病変粘膜に高率に付着し、同菌に対する血清抗体価が UC 患者で有意に高値であることを見出した (J Gastroenterol Hepatol. 17:849-53, 2002)。さらに、同菌が酪酸を大量産生し、アポトーシスを介して、Vero 細胞毒性を示すことから、*Fvarium* が UC の病原菌の一つであると考えている (Gut 52:79-83, 2003)。さらに最近の研究で同菌が粘膜上皮に侵入して、上皮から IL-8、TNF- α といった炎症性サイトカインを多量に出させていることも発見し (J Med Microbiol. 58(Pt 5):535-45, 2009)、下図のような仮説を構築した。



そして、この *Fvarium* に対して感受性の 3 種類の抗菌薬 (アモキシシリン、テトラサイクリン、メトロニダゾール) による新規抗菌薬多剤併用療法 (ATM 療法) を開発し、無作為化臨床試験 (RCT) を施行し、ATM 投与群で、症状、内視鏡所見、病理所見の有意な改善と粘膜内の *Fvarium* の減少~除菌も確認された。また、12 ヶ月の長期経過で ATM 投与群では再発率が有意に低く、緩解維持効果も認められた (Scand J Gastroenterol 2005;40:1334-1342, Aliment Pharmacol Ther. 2005;21:1017-27)。さらに、同療法の

多施設共同二重盲検試験を施行し、3 ヶ月後、12 ヶ月後と実薬群で有意な改善を得ている (Am J Gastroenterol. 105(8):1820-9, 2010)。

しかし、この新規抗菌薬療法は広域抗生剤を使用しており、上記の *Fvarium* だけでなく、他の腸内細菌にも作用していることも考えられる。多施設共同二重盲検試験で 210 例という多数の症例の検討を行ったが、そこで得られた粘膜生検材料を用いて、本療法の治療効果と粘膜フローラ (マイクロバイオータ) の変化を細菌 DNA 解析により網羅的かつ精密に分析することにより、さらに UC の原因菌群の解明を進めた。

2. 研究の目的

本研究においては、上記二重盲検試験で採取した凍結粘膜標本を用いて、培養法ではなく、細菌 DNA 抽出法により、DNA 多型解析 (T-RFLP 法、メタゲノム解析) を行って、抗菌薬療法の治療効果と粘膜細菌叢の変化を網羅的かつ精密に分析することにより、UC の原因または増悪に特異的に関与する細菌を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 生検粘膜検体は少量であることから、一定の DNA 量を得るために、虫垂孔+盲腸粘膜、上行結腸+横行結腸粘膜、下行結腸+S 状結腸+直腸粘膜と合わせて DNA 抽出を行った。ユニバーサルプライマー (27f, 1492r) で細菌の 16 S rDNA 全長を増幅し、nested-PCR でさらに 16 S rDNA 全長の内側をユニバーサルプライマー (529f, 1492r) で増幅した。その DNA を制限酵素 Hha I で切断して、T-RFLP 法により、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて、粘膜細菌叢のプロファイルを解析した。

2) 生検粘膜検体は少量であることから、一定の DNA 量を得るために、虫垂孔+盲腸粘膜、上行結腸+横行結腸粘膜、下行結腸+S 状結腸+直腸粘膜と合わせて DNA 抽出を行い、ユニバーサルプライマー (27f, 1492r) で細菌の 16 S rDNA 全長を増幅し、*Fusobacterium varium* (Fv) の特異的プライマー (Sequences (5'-3'): CCGTTGCTTATATGGGGTTG CCTCGCAGATTCACACAGAA) を用いて、real-time PCR を行った。また、同時にヒト β -actin を特異的プライマー ((5'-3'): GCCAACCGCGAGAAGATGACC CTTTAGCACGCACTGTAATTCCTC) を用いて real-time PCR を行い、Fv/Actin 値を算

出して、粘膜中の Fv の定量を行った。

3) メタゲノム解析：直腸粘膜から Total RNA を精製し、2本鎖 cDNA に合成したあと、NEXTERA 法でイルミナ解読ライブラリー（インサート 200-500 bp）を作製した。Illumina GAIIX による解読は、(cBot SE v1, cBot SE multi-primer hybrid recipe, SBS 36cycle v5, GA2_125cycle_SR_v8 recipe, RTA 1.83) にて行った。

4. 研究成果

1) 虫垂孔+盲腸粘膜、上行結腸+横行結腸粘膜、下行結腸+S状結腸+直腸粘膜と3部位の T-RFLP プロファイルの変動が認められたのは、抗菌薬多剤併用 ATM 療法群で 12 例中 10 例 (83.3%) であった。これに対してプラセボ群では 3 部位の T-RFLP プロファイルの変動は認められなかった (0%)。すなわち、抗菌薬 ATM 療法により粘膜細菌叢が有意に変化したという結果であった (Fisher の直接確率法による統計解析で、 $p=0.0007$)。

2) Fv/Actin 値の低下が粘膜中の Fv が減少したということになるが、抗菌薬 ATM 療法群で低下したのは 12 例中 8 例 (66.7%) で、プラセボ群では 8 例中 4 例 (50%) という結果であった。抗菌薬 ATM 療法群で減少例が多い傾向であった。この Fv 定量については、nested-PCR を用いていることから、定量性に問題があるのかもしれない。

3) 抗菌薬 ATM 療法、プラセボ群の各 1 例の直腸粘膜を解析した。各検体の解読リード数は 8,985,338~29,075,354 であり、これに含まれるヒトゲノム配列を削除し、残ったリードを blastn にて nt database に対して同源性解析を行った。細菌と思われる解読リードを集め、その総数を検討したところ、直腸粘膜から相当量の配列を検出した。細菌属レベルで ATM 療法で減少したと思われる細菌属をリストアップすると、表 1 のごとくであり、*Bacteroides*, *Acidaminococcus*, *Prevotella*, *Parabacteroides* が顕著に減少していることがわかった。

表 1. ATM 療法で減少した細菌属

Genus	リード数	投与前	3M 後	12M 後
<i>Bacteroides</i>	1200	3	0	
<i>Parabacteroides</i>	123	8	1	
<i>Prevotella</i>	347	18	1	
<i>Sphingobacterium</i>	100	1	0	
<i>Roseburia</i>	39	3	0	
<i>Faecalibacterium</i>	144	5	5	
<i>Ruminococcus</i>	244	161	2	
<i>Acidaminococcus</i>	1043	0	0	
unclassified <i>Erysipelotrichaceae</i>				
	104	24	0	
<i>Methylobacillus</i>	51	20	14	

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 24 件)

1. Terao S, Yamashiro K, Tamura I, Hirano T, **Ohkusa T**, Kato K. Antibiotic combination therapy for steroid withdrawal in steroid-dependent ulcerative colitis. *Digestion*. 2011;83(3):198-203.

2. Aoyagi Y, Nagata S, Kudo T, Fujii T, Wada M, Chiba Y, Ohtsuka Y, Yamashiro Y, Shimizu T, **Ohkusa T**. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 mutation may cause a subset of ulcerative colitis. *Pediatr Int*. 2010;52(5):729-34

3. Uehara T, Kato K, **Ohkusa T**, Sugitani M, Ishii Y, Nemoto N, Moriyama M. Efficacy of antibiotic combination therapy in patients with active ulcerative colitis, including refractory or steroid-dependent cases. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25 Suppl 1:S62-6.

4. Uchiyama K, Nakamura M, **Odahara S**, **Koido S**, Katahira K, Shiraiishi H, **Ohkusa T**, Fujise K, Tajiri H. N-3 polyunsaturated fatty acid diet therapy for patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(10):1696-707

5. Osada T, **Ohkusa T**, Yokoyama T, Shibuya T, Sakamoto N, Beppu K, Nagahara A, Otaka M, Ogihara T, Watanabe S. Comparison of several activity indices for the evaluation of endoscopic activity in UC: inter- and intraobserver consistency. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(2):192-7.

6. **Ohkusa T**, Kato K, Terao S, Chiba T, Mabe K, Murakami K, Mizokami Y, Sugiyama T, Yanaka A, Takeuchi Y, Yamato S, Yokoyama

- T, Okayasu I, Watanabe S, Tajiri H, Sato N. Newly Developed Antibiotic Combination Therapy for Ulcerative Colitis: A Double-Blind Placebo-Controlled Multicenter Trial. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(8):1820-9.
7. Sato K, Chiba T, **Ohkusa T**. Serial changes of cytokines in active ulcerative colitis: effects of antibiotic combination therapy. *Hepatogastroenterology*. 2009;56(93):1016-21.
8. **Ohkusa T**, Yoshida T, Sato N, Watanabe S, Tajiri H, Okayasu I. Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 5):535-45.
9. Osada T, **Ohkusa T**, Okayasu I, Yoshida T, Hirai S, Beppu K, Shibuya T, Sakamoto N, Kobayashi O, Nagahara A, Terai T, Watanabe S. Correlations among total colonoscopic findings, clinical symptoms, and laboratory markers in ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23 Suppl 2:S262-7
10. Harada A, **Ohkusa T**, Kushima K, Sakamoto M, Benno Y, Beppu K, Shibuya T, Sakamoto N, Watanabe S. Identification of Bacteria from Blood in Febrile Patients with Ulcerative Colitis by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profile Analysis of 16S rRNA Gene. *Scand J Gastroenterol*, 2008;43:423-30.
11. **大草敏史** : 潰瘍性大腸炎の新知見、日本薬剤師会雑誌 2011;63(4):401-405
12. **大草敏史** : 炎症性腸疾患・大腸癌の病態と肥満の影響、*BIO Clinica* 2011;26(2):130-134.
13. **大草敏史** : *Fusobacterium varium*と潰瘍性大腸炎、臨床と微生物 2011;38(1):33-38
14. **大草敏史** : 根治を目指した潰瘍性大腸炎に対する抗菌薬多剤併用療法、*日本医事新報* 2010;4509:45-50
15. **大草敏史**、内山幹、渋谷智義、長田太郎。潰瘍性大腸炎の内視鏡スコア、*IBD Research* 2010;4(3):160-166
16. **大草敏史**、月永真太郎、**小田原俊一**、松平浩、内山幹、古谷徹、荒川廣志、**小井戸薫雄** : 腸内細菌をターゲットとした潰瘍性大腸炎に対する新規抗菌薬多剤併用療法、*消化器内科* 2010;51(4):318-324
17. **大草敏史** : 抗菌薬の組み合わせ、特集・潰瘍性大腸炎の最新の治療、*消化器の臨床* 2010;13(1):45-51
18. **大草敏史** : 潰瘍性大腸炎と抗菌薬療法、感染症 2009;39(4):19-23
19. **大草敏史** : 潰瘍性大腸炎における腸内細菌の役割、*日本臨床腸内微生物学会誌* 2009;11: 12-14
20. **大草敏史** : 炎症性腸疾患と腸内細菌、*無菌生物* 2009; 39: 19-24
21. **大草敏史**、内山幹、**小田原俊一**、光永真人、**小井戸薫雄**、山根建樹：嫌気性菌と炎症性腸疾患。臨床と微生物 2008; 35(4) : 321-7.
22. 内山幹、**小田原俊一**、亀岡佳彦、渋谷智義、長田太郎、**大草敏史** : 潰瘍性大腸炎の内視鏡（病理組織）指標の相互比較、*IBD Research* 2008;2:222-230.
23. 長田太郎、**大草敏史**、渡辺純夫 : 症候からみた腸疾患へのアプローチ、炎症性腸疾患と機能性腸疾患—病態の理解と求められる対応、腸疾患の診断と鑑別のポイント、*Medicina* 2008;45:791-795
24. **大草敏史**、渡辺純夫 : 潰瘍性大腸炎の抗菌薬多剤併用療法の有用性、*Medical Practice* 2008;25:671-672.
- [学会発表] (計12件)
- ① Saito H, **Ohkusa T**, Yokoyama T, Harada A, Naoe K, Beppu K, Shibuya T, Sakamoto N, Osada T, Nagahara A, Watanabe S. Seasonal variations in onset and relapse of ulcerative colitis in Japan. The 13th Taishotoyama International Symposium on Gastroenterology. 2009. 4.17-18
- ② Naoe K, **Ohkusa T**, Yokoyama T, Harada A, Saitou H, Beppu K, Shibuya T, Sakamoto N, Osada T, Nagahara A, Watanabe S. Factors associated with incomplete total colonoscopy in a university hospital in Japan. The 13th Taishotoyama International Symposium on Gastroenterology. 2009. 4.17-18

③ **Ohkusa T**, Kato K, Terao S, Chiba T, Mabe K, Murakami K, Mizokami Y, Sugiyama T, Kudo T, Yanaka A, Takeuchi Y, Yamato S, Yokoyama T, Okayasu I, Sato N, Watanabe S, Tajiri H. ANTIBIOTIC-INDUCED ULCERATIVE COLITIS REMISSIONS: A DOUBLE-BLIND PLACEBO-CONTROLLED MULTICENTRE TRIAL. 16th United European Gastroenterology Week (UEGW) Vienna 2008, 2008. 10. 21, Vienna, Austria

④ Osada T, **Ohkusa T**, Yokoyama T, Shibuya T, Sakamoto N, Beppu K, Shimada Y, Takada M, Tamaki K, Nagahara A, Ogihara T, Watanabe S. Interobserver and Intra-observer consistency in the endoscopic agreement of ulcerative colitis activities using various classification. Digestive Disease Week 2008, San Diego, USA

⑤ 月永真太郎、**大草敏史**、及川紘太郎、湯川豊一、**小田原俊一**、永妻啓介、**込田英夫**、内山幹、佐藤憲一、天野克之、古谷徹、**小井戸薫雄**、田尻久雄:潰瘍性大腸炎に対する新規抗菌薬多剤併用AFM療法。第96回日本消化器病学会総会、新潟、2010. 4

⑥ **大草敏史**:潰瘍性大腸炎は腸内細菌感染症か一明らかになってきた発症のメカニズム、スポンサードシンポジウム「感染症としての潰瘍学」第37回日本潰瘍学会、東京、2009/11/6

⑦ **大草敏史**:教育講演II 潰瘍性大腸炎における腸内細菌の役割、第11回日本臨床腸内微生物学会総会、東京、2009/09/27

⑧ **大草敏史**:教育講演9、潰瘍性大腸炎における腸内細菌の役割と抗菌薬多剤併用ATM療法、第57回日本化学療法学会総会、東京、2009/06/5

⑨ **大草敏史**、加藤公敏、田尻久雄:潰瘍性大腸炎に対する新規抗菌薬多剤併用療法—A Double-Blind Placebo-Controlled Multicenter Trial—, シンポジウム6「潰瘍性大腸炎の治療の進歩—ガイドラインを超えて」, 第77回日本消化器内視鏡学会総会、名古屋、2009/05/22

⑩ **大草敏史**:特別講演II 炎症性腸疾患と腸内細菌、第42回日本無菌生物ノートパイオロジー学会総会、大阪、2009/01/24

⑪ 長田太郎、**大草敏史**、澁谷智義、坂本直人、玉城久美子、笠原桂子、森広樹、斉藤紘昭、大高道郎、永原章仁、荻原達雄、渡辺純夫:潰瘍性大腸炎(UC)の臨床症状およびinter-observer agreementからみた新たな内視鏡診断スコアの試み、第76回日本消化器内視鏡学会総会、東京、2008/10/1-4

⑫ 中江弘三郎、**大草敏史**、原田章、斉藤紘昭、高橋泰治、森広樹、松本健史、別府加寿子、渋谷智義、坂本直人、長田太郎、永原章仁、大高道郎、荻原達雄、渡辺純夫:全大腸内視鏡検査における全大腸到達阻害要因の分析、第75回日本消化器内視鏡学会総会、横浜、2008/05/24-26

〔図書〕(計3件)

① **大草敏史**。潰瘍性大腸炎、消化器内科学(渡辺純夫編)、pp178-180、シュプリンガー・ジャパン、東京、2010年2月

② **大草敏史**、齋藤紘昭、渡辺純夫:潰瘍性大腸炎、専門医のための薬物療法Q&A 消化器(渡辺純夫、三輪洋人編)、pp116-130、中外医学社、東京、2008

③ **大草敏史**:A2 潰瘍性大腸炎、消化器内科レジデントハンドブック(渡辺純夫、北條麻理子編)、pp311-316、中外医学社、東京、2008

〔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

大草 敏史(OHKUSA TOSHIFUMI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号:50160445

(2)連携研究者

小井戸 薫雄(KOIDO SHIGEO)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号:70266617

小田原 俊一(ODAHARA SHUNICHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号:50445673

込田 英夫(KOMITA HIDEO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号:90534561