様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５年　４月２７日現在

機関番号：１７１０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ０８３８９

研究課題名（和文）直腸環境の特殊性からみる潰瘍性大腸炎の再燃機序

研究課題名（英文）Mechanisms of Ulcerative Colitis Relapse Based on the Particularities of the Rectal Environment

研究代表者
荻野　治栄（Ogino, Haruei）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：８０６２１７０５

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（以下UC)は、再燃・寛解を繰り返す難治性疾患であるが、明らかな原因は不明である。直腸から炎症が生じ結腸全体に広がっていく特徴を有しているが、なぜ直腸から炎症が伸展していくか、何が発症のトリガーになっているかも分かっていない。今回、我々は寛解時UC患者を多角的に検討し再燃に係わる因子を解析した。今回の解析から、粘膜治癒が得られている寛解期UC患者では、結腸と直腸において細菌叢に差はなかったが、粘膜バリア機能は直腸のみにおいて低下していることが分かった。さらに粘膜のバリア機能低下はIL-1β、IL-6やClaudin 2の発現亢進と関与があることを見出した

研究成果の学術的意義や社会的意義
動物実験腸炎モデルでは直腸のみに炎症を再現できるモデルが存在しないため、UCの病態を解明するためにはヒトにおける直腸の環境を評価するしかない。そこで、我々は寛解導入療法後に粘膜治癒が得られた状態に着目し、その病態を詳細に解析することで再燃の機序を解明出来るのではないかと考えた。直腸という特殊環境における免疫学的因子、腸内細菌叢、腸管上皮による粘膜バリア機能の相互関係を解析した研究は他になく我々の独自性があると考える。今回の研究によって、寛解中に再燃を来しにくい患者群を抽出することが出来れば、高額な寛解維持療法を中止する事が可能になり、医療経済における多大なメリットが得られると確信している。

研究成果の概要（英文）：Ulcerative colitis (UC) is an intractable disease that repeatedly relapses and remits, but its cause remains unknown. UC is characterized by inflammation that begins from the rectum and spreads to the entire colon, but it is not well known why the inflammation extends from the rectum or what triggers the onset of the disease. In this study, we analyzed factors related to relapse in patients with UC in remission from various angles. We found no difference in the bacterial flora between the colon and rectum of patients with UC in remission who had achieved mucosal healing, but the mucosal barrier function was decreased only in the rectum. Furthermore, we found that the decreased mucosal barrier function was associated with increased expression of IL-1β, IL-6, and Claudin 2.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：潰瘍性大腸炎　再燃機序　直腸環境

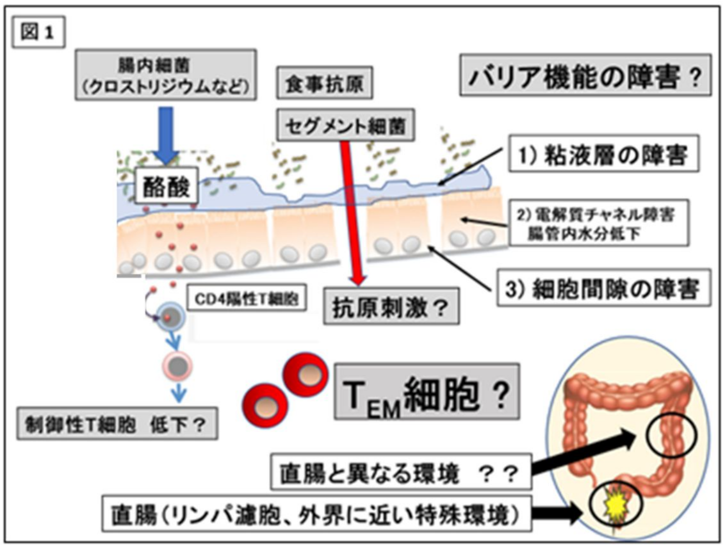
※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

炎症性腸疾患（IBD）は遺伝因子・環境因子・防御因子・免疫学的因子が複雑に絡み合い発症し、再燃・寛解を繰り返す難治性疾患である。潰瘍性大腸炎（UC）とクローン病（CD）の二つの疾患がある。30 年前と比べると 10 倍以上に患者数が増えており、特に UC においては、本邦の患者数は世界で 2 番目に多い患者数となっている。

UC は、直腸から連続性して炎症が全大腸に波及していく原因不明の疾患であるが、なぜ直腸から炎症が伸展していくか、何が発症のトリガーになっているか不明である。多くの基礎研究によって発症要因が検討されており、短鎖脂肪酸の一つである酪酸が制御性 T 細胞 (以下 Treg) を誘導する事[1]やセグメント細菌が Th17 細胞を誘導する事 [2]、短鎖脂肪酸不足にて粘膜バリア機能が障害される事などが指摘されている。これに加え、直腸はリンパ濾胞が発達していることや外界に近い点が他の大腸とは異なっており、この環境が病態に影響している可能性が高いと考えられる。

再燃においては、さらにメモリーT 細胞の関与も指摘されている。エフェクターT 細胞は抗原の刺激がなければ約 2 週間後には 90%の細胞が死滅するが、残存した T 細胞は炎症改善後セントラルメモリーT 細胞（T_{CM} 細胞）とエフェクターメモリーT 細胞（T_{EM} 細胞）に分かれ、特に T_{EM} 細胞は二次リンパ組織ではなく主に腸管に存在すると考えられており、再燃時に速やかにエフェクター細胞が増殖すると考えられている[3]。しかし、粘膜治癒が得られた環境でなぜ T_{EM} 細胞が再活性化するのか、粘膜バリア機能を含めた宿主環境の異常が続いているのか、さらになぜ UC が直腸から発症・再燃し連続性に広がるのか現在でも不明である。



発症前の病態を評価することは困難であるが、治療後の炎症改善時（寛解時）の病態を詳細に評価することは可能である。再燃時にも直腸における炎症が重要と考えられており、寛解時の直腸を多角的に検討することで再燃に係わる因子や発症機序を解明することが出来る。UC は直腸に発症のトリガーとなる因子がある可能性があり、今回寛解期 UC における評価を行い、UC 患者における直腸環境の特殊性を解析した。

２．研究の目的

本研究の目的は、UC 患者における直腸環境の特殊性を環境因子や宿主機能の観点から解析し、再燃機序を解明すること。

３．研究の方法

(1) 寛解期 UC における直腸と結腸の腸内細菌叢の比較および再燃との関連性を検討

本臨床研究の開始に際し、九州大学病院臨床試験倫理審査委員会の承認を得た。文章を用いて同意取得後、寛解期 UC 患者に対して、経過観察の下部消化管内視鏡検査を行った際に、結腸と直腸の 2 箇所から生検を行い、16S rRNA 遺伝子(V1-V2 領域)を次世代シークエンサー (MiSeq) にて解析した。その後の経過で、再燃を来した群と寛解を維持した群に分け、各群の腸内細菌叢の比較を行った。UC の診断は臨床的、内視鏡的、及び組織学的基準に基づいて行われた。UC 寛解期粘膜治癒患者は、臨床活動指数（CAI）=0 および Rachmilewitz 内視鏡指数（REI）=0 で、大腸内視鏡検査時に MES=0 と定義された。UC 活動期患者は CAI＞4 および Rachmilewitz 内視鏡指数＞4 で、大腸内視鏡検査時に MES 2 以上と定義した。

(2) 寛解期 UC における直腸と結腸のバリア機能の比較および再燃との関連性を検討

本臨床研究の開始に際し、九州大学病院臨床試験倫理審査委員会の承認を得た。文章を用いて同意取得後、寛解期 UC 患者に対して、経過観察の下部消化管内視鏡検査を行った際に、粘膜のバリア機能評価および同部位から粘膜生検を行った。粘膜バリア機能は内視鏡下に鉗子口から TISSUE CONDUCTANCE METER を挿入し、インピーダンスを測定することで評価した。生検組織から病理学的評価及びサイトカイン、Claudin-1,2, Occlusin-1, ZO-1 を real time PCR にて測定した。対照群として、同意が得られた大腸ポリープ患者に対して、同様に粘膜バリア機能

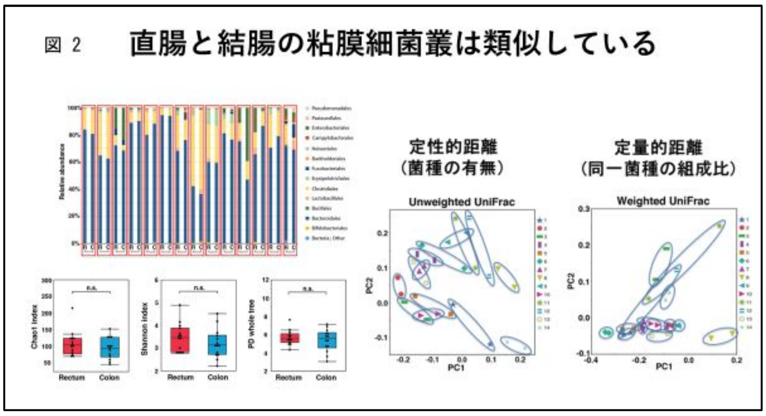
の測定及び粘膜生検を行った。

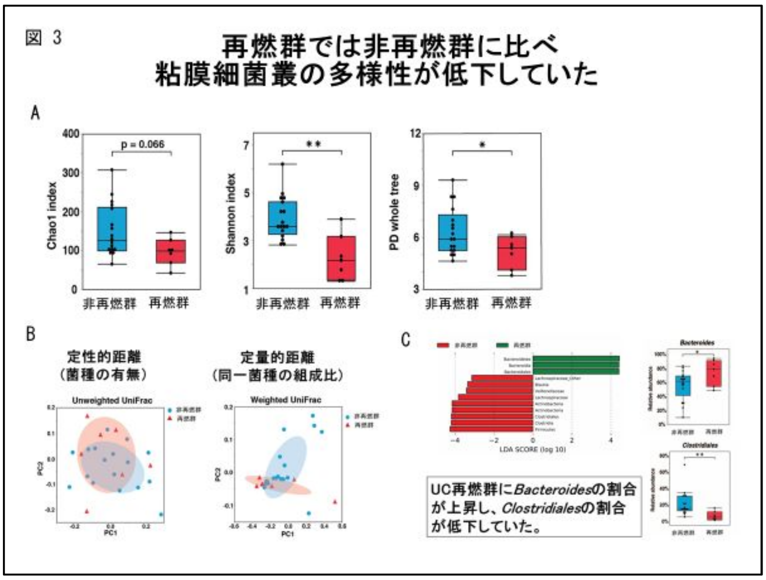
４．研究成果

(1) 寛解期 UC における直腸と結腸の腸内細菌叢の比較および再燃との関連性を検討

2012 年 6 月から 2017 年 12 月の間に登録された寛解期 UC 患者 24 名のうち、直腸と結腸の 2 か所からの生検が可能であった 14 名をまず解析した。個人内において直腸と結腸では似た細菌叢の構成であり、菌種の種類の豊富さを評価した Chao1、多様性・割合も加味して評価をしている Shannon, PD whole tree いずれも α 多様性に差は認めなかった。UniFrac 解析にても、直腸と結腸の粘膜細菌叢は個体間よりも個体内での距離が近い結果であった。以上より、大腸における腸内細菌叢は、個体内では直腸や結腸の部位に関わらず、類似しているという結果であった（図 2）。

次に腸内細菌叢が再燃に関与しているかを評価するために、まず 24 名の臨床経過を確認した。登録患者の臨床的背景は、男性/女性：13/11、平均年齢：43.5(37-56.8)歳、罹病期間：8（3-16）年、直腸炎型/左側結腸炎型/全大腸炎型/右側結腸炎型:：3/7/12/2、治療歴：5-ASA；25(93%)、PSL ； 0% 、 AZA/6MP ； 6(22%)、抗 TNF α 抗体；4(15%)であった。24 名中 7 名に再燃を認めたが、両群間の臨床学的特徴に有意差は認めなかった。再燃までの期間は 18(15-26)ヶ月であった。再燃群と非再燃群にて、α 多様性を比較したところ、菌種の豊富さ、多様性に関して再燃群の方が非再燃群と比べて有意に低下していた（図 3-A）。細菌叢の構成に関して、Unweighted では有意な差は見られなかったが、構成をみる Weighted Unifrac 解析では細菌叢の構成で有意な違いを認め（図 3-B）、LeEfSe 解析にて、再燃群で Bacteroides の割合が上昇していたのに対して、Lachinospiraceae をはじめとする Clostridiales や Actinobacteria の低下を認めた（図 3-C）。





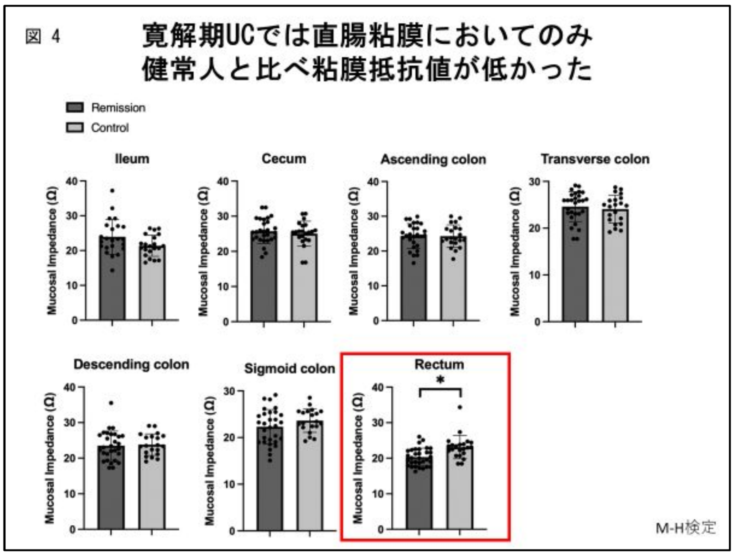
腸内細菌叢の多様性低下や Bacterodes の比率上昇が UC 再燃に関与している可能性が示唆されたが、腸内細菌叢は結腸と直腸で同じであり、大腸内の環境に大きな差はないと考えられた。発症と同様に再燃も直腸から炎症が波及していくことから、宿主側の要因として直腸における機能が結腸と異なっている可能性が考えられた。そこで、次に我々は、腸管における粘膜バリア機能に着目した。

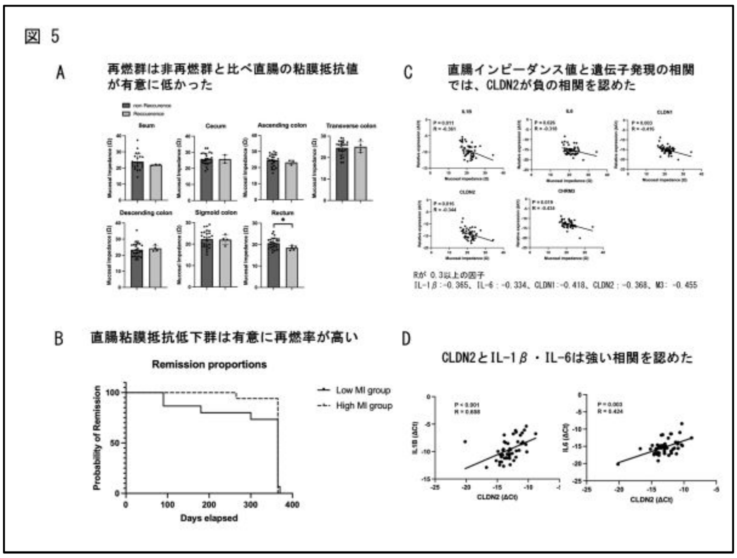
(2) 寛解期 UC における直腸と結腸のバリア機能の比較および再燃との関連性を検討

直腸・結腸の粘膜バリア機能を、内視鏡下のインピーダンス測定にて評価した。インピーダンス値と粘膜バリア機能評価のゴールドスタンダードであるウッシング・チャンバーによる測定値に正の相関があることから、インピーダンスを用いることで粘膜バリア機能の評価が可能であることが示唆されている。まず、直腸と結腸間による粘膜バリア機能の違いを評価するために、盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸、S 状結腸、直腸のインピーダンス値を寛解期 UC 群とコントロール群で比較した。2019 年 10 月から 2020 年 6 月までの連続する UC 患者 32 名（UC 群)、健常者 22 名を登録した。寛解期 UC 登録患者の臨床的背景は、男性/女性：16/16、平均年齢：41(34-57.5)歳、罹病期間：11（7-15）年、直腸炎型/左側結腸炎型/全大腸炎型：3/8/21、

治療歴：5-ASA；29、PSL；1、AZA/6MP；11、抗 TNFα抗体；6、インテグリン阻害薬；1 例、JAK 阻害薬；1 例であり、コントロール群は男性/女性：6/16、平均年齢：37(28-49)歳であった。

インピーダンス値は盲腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸、S 状結腸では両群間に差がなかったが、UC 寛解期の直腸においてのみコントロール群と比較して有意にインピーダンス値が低下しており、直腸環境の特殊性が示唆された(図 4)。その後経過観察したところ、12 か月以内に 32 例中 5 例に再燃を認めた。両群間の臨床学的特徴に有意差は認めなかった。再燃群と非再燃群で各部位のインピーダンス値を比較したところ、直腸において再燃群で有意に低い値を示した(図 5-A)。そこで、再燃群と非再燃群で分けた際に最も高い AUC が得られる値を cut off 値として、カプランマイヤー曲線を引くと低インピーダンス群で 1 年以内の再燃率は有意に高かった(図 5-B)。





各群の直腸と盲腸から組織を採取し、病理学的評価および炎症性サイトカインや tight junction, ムスカリン受容体に関連する遺伝子発現を real time q PCR にて評価した。組織的評価ではいずれも炎症スコアにおいて有意差はなかったが、炎症性サイトカンでは IL-1βと IL-6 が寛解期 UC の直腸で有意に上昇していた。その他のサイトカインでは差がなかった。また、Tight junction 関連分子の遺伝子発現は、ZO-1. Occludin (OCLN), Claudin1 では差はなかったが、Claudin 2 で寛解期 UC 直腸にて有意に上昇していた。一方、遺伝子発現レベルとインピーダンス値の相関を見たところ、IL-1β、IL-6、Claudin2 と有意な逆相関を認めた(図 5-C,D)。

以上の結果から、粘膜治癒が得られている寛解期 UC 患者では直腸においてのみ粘膜バリア機能が低下していること、さらに粘膜のバリア機能低下は IL-1β、IL-6 や Claudin 2 の発現亢進と関与があることが分かった。Claudin 2 は tight junction に pore を形成・腸管内への腸液分泌に関与することが報告されている。粘膜バリア機能が低下している直腸において、腸内細菌叢の dysbiosis が抗原刺激となり、粘膜に存在するメモリーT 細胞が刺激され、再燃に関与している可能性が示唆された。

引用文献

1. Yukihiro Furusawa, Yuuki Obata, Shinji Fukuda et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. Nature 2013; 504: 446-450
2. Yoshiyuki Goto, Casandra Panea, Gau Nakato et al. Segmented filamentous bacteria antigens presented by intestinal dendritic cells drive mucosal Th17 cell differentiation. Immunity 2014; 40: 594-607
3. John T Chang, E John Wherr, Ananda W Goldrath. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. Nat Immunol 2014; 15: 1104-1115

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　3件）

１．著者名 Okuno Hiroaki、Ogino Haruei、Ihara Eikichi、Nishioka Kei、Tanaka Yoshimasa、Chinen Takatoshi、Kohjima Motoyuki、Oono Takamasa、Tanaka Masatake、Goya Takeshi、Fujimori Nao、Iboshi Yoichiro、Gotoda Takuji、Ogawa Yoshihiro	４．巻 21
２．論文標題 Discriminant equation using mucosally expressed cytokines and transcription factor for making definite diagnosis of inflammatory bowel disease unclassified	５．発行年 2021年
３．雑誌名 BMC Gastroenterology	６．最初と最後の頁 73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12876-021-01656-1	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 －

１．著者名 Nishihara Yuichiro、Ogino Haruei、Tanaka Masaru、Ihara Eikichi、Fukaura Keita、Nishioka Kei、Chinen Takatoshi、Tanaka Yoshimasa、Nakayama Jiro、Kang Dongchon、Ogawa Yoshihiro	４．巻 11
２．論文標題 Mucosa-associated gut microbiota reflects clinical course of ulcerative colitis	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Scientific Reports	６．最初と最後の頁 13743
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-92870-0	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 －

１．著者名 Nishioka Kei、Ogino Haruei、Chinen Takatoshi、Ihara Eikichi、Tanaka Yoshimasa、Nakamura Kazuhiko、Ogawa Yoshihiro	４．巻 56
２．論文標題 Mucosal IL23A expression predicts the response to Ustekinumab in inflammatory bowel disease	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Journal of Gastroenterology	６．最初と最後の頁 976～987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-021-01819-7	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 －

〔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 荻野治栄
２．発表標題 潰瘍性大腸患者の粘膜治癒時における腸管粘膜バリアの検討
３．学会等名 第12回　日本炎症性腸疾患学会
４．発表年 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

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