

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17401

研究課題名（和文）血液悪性疾患における腸内細菌叢メタゲノム解析と疾患リスク・予後予測モデルの構築

研究課題名（英文）Metagenomic analysis of intestinal microbiota in hematologic malignancies and development of disease risk and prognostic models.

研究代表者

草壁 信輔 (Shinsuke, Kusakabe)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50747186

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：腸内細菌叢の異常は、造血幹細胞移植領域で様々な合併症や移植予後との関連が報告されている。我々は経時的に同種造血幹細胞移植患者の便検体を採取し、移植後の腸内細菌叢の異常と合併症との関連を解析した。2020年に我々は、同種移植患者では1年以上の経過で腸内細菌叢の異常が持続していること、移植後1か月目の腸球菌の相対割合が移植後生存率に関連していることを報告した。2021年には東京都立駒込病院血液内科と共同で、腸内細菌叢異常と慢性GVHDの関連を報告した。2022年に、移植後長期生存者における腸内細菌叢の持続的な異常と合併症の関連を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2020年の論文では腸球菌の増加が移植後生存の予測因子になりうることを示した。2021年の論文では移植後の腸内細菌叢の多様性が慢性GVHDの発症予測因子になりうることを示した。これらの成果は、移植後の生存、合併症の予測モデルを構築するうえで重要な情報となる。また、2022年の論文では移植後長期生存者における腸内細菌叢の異常を報告した。移植後の晩期合併症はこれまでほとんど研究データがなく、発症予測、予防や治療に難渋することが多かったが、本研究の知見をもとに病態解明のための新たな道筋が開けるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Abnormalities in the intestinal microbiota have been reported to be associated with various complications and transplantation outcomes in the field of HSCT. We collected fecal samples from allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients over time and analyzed the correlation between abnormalities in the intestinal microbiota and complications after transplantation. In 2020 we reported that gut microbiota abnormalities persisted over 1 year after the transplantation in allogeneic transplantation recipients and that the relative abundance of Enterococcus at 1 month after the transplantation was associated with post-transplant survival. In 2021, in collaboration with the Department of Hematology, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital, we reported the association between abnormalities of gut microbiota and chronic GVHD. In 2022, we reported the association between the gut persistent abnormalities of gut microbiota and complications in long-term post-transplant survivors.

研究分野：血液学

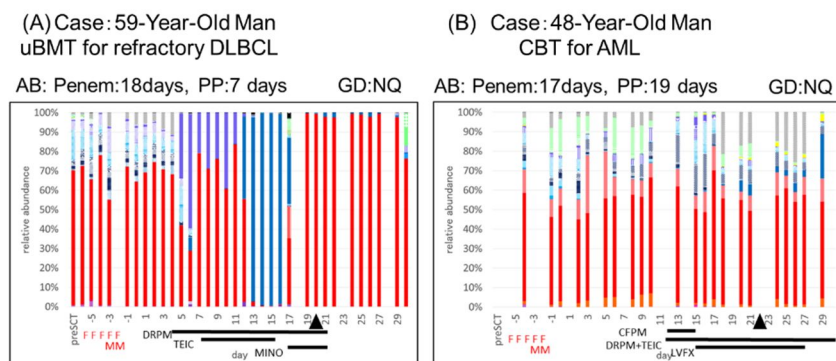
キーワード：腸内細菌叢 同種造血幹細胞移植 腸球菌 慢性GVHD 晩期合併症

1. 研究開始当初の背景

再発・難治性造血器腫瘍の治療において、同種造血幹細胞移植は根治が期待できる唯一の治療であり、移植前疾患制御の改善、前処置の工夫、新規免疫抑制剤や抗菌薬、抗真菌薬の臨床応用などによりその成績は向上している。その一方で、感染症、移植片対宿主病(Graft versus host disease : 以下 GVHD と記載する)、抗癌剤などの薬剤による臓器障害などの合併症により、治療関連死亡は 20-40%に及ぶ。移植後急性期を過ぎても、慢性 GVHD のために QOL の低下や、社会復帰の障害が問題となっている。慢性 GVHD の治療のために免疫抑制剤やステロイドの長期投与を要するために、免疫能の回復遅延、それに伴う感染症の増加、薬剤の副作用の問題が持続する。最近では移植後長期生存者の増加とともに、二次発癌や性腺機能低下などの晩期合併症が問題となっている。これら諸問題を解決し、造血幹細胞移植成績のさらなる向上のためには新たな治療戦略が必要である。

NGS を用いた腸内細菌叢の解析により、炎症性腸疾患や関節リウマチなど疾患において、腸内細菌叢と免疫機能の関連性が示唆されてきた。2010 年代より造血幹細胞移植の領域においても、腸内細菌叢の異常と移植後予後との関連、GVHD や感染症などの合併症との関連が報告されてきた。腸内細菌叢と血流感染 (Taur et al, 2012; Montassier et al, 2016; Mancini et al, 2017)、GVHD (Holler et al, 2014; Jenq et al, 2015; Shono et al, 2016; Doki et al, 2017; Mancini et al, 2017; Han et al, 2018)、肺合併症 (Harris et al, 2016)、原疾患の再発 (Peled et al, 2017)、移植後死亡 (Taur et al, 2014; Mancini et al, 2017)との関連性が報告された。これらの知見をもとに、近年では同種造血幹細胞移植予後の改善のための新たな治療ターゲットとして、腸内細菌叢が着目されており、ステロイド抵抗性 GVHD に対する腸内細菌叢移植の可能性も報告された(Kakihana et al. 2016)。

しかし、これら既存研究の問題点としては、腸内細菌叢の評価が移植後の短期間の数点での解析をもとにしたデータであるため、長期間にわたる腸内細菌叢の経時的変化と移植後合併症の関連性については詳細が明らかとなっていなかった。また、腸内細菌叢の多様性についての評価が中心であり、腸内細菌叢を構成する菌の成分に着目したデータは乏しい状況であった。そこで、菌叢成分をはじめとする腸内細菌叢の変化がどのように起こり、移植後予後とどのように関連するのかを明らかとするため、我々は経時的に長期間検体採取を行った。この結果我々は、抗菌薬の投与により連日腸内細菌叢の構成成分が入れ替わる菌叢が不安定な患者(図 A)と抗菌薬の投与によってもほとんど菌叢が変動しない患者(図 B)の 2 群に分かれること、腸内細菌叢が不安定な患者は有意に移植後生存率が低いことを見出し報告した(Kusakabe et al, 2019)。



2. 研究の目的

同種造血幹細胞移植後患者の腸内細菌叢を経時的に評価し、腸内細菌叢の変動が移植後予後や各種合併症とどのように関連しているのかを検討する。特に、移植後長期生存者の腸内細菌叢を解析することで、慢性 GVHD、晩期再発、二次発癌などの晩期合併症との関連について評価することを第一の目的とした。また、抗菌薬の使用状況と腸内細菌叢の変動との関連を評価し、腸内細菌叢への影響の少ない適正な抗菌薬の使用法を検討すること、16SrRNA 解析よりも簡便な腸内細菌叢の評価としてより簡便な指標(尿中の indoxyl sulfate など)の有用性の評価を行うこと、を企図した。

3．研究の方法

本研究は「造血幹細胞移植患者における合併症と腸内細菌叢の影響に関するメタゲノム解析を用いた研究」として大阪大学医学部附属病院倫理委員会から承認を得ている(承認番号 16198)。対象患者は当院で造血幹細胞移植を受ける患者のうち、文書による研究協力の同意が得られた者とし、目標症例数を 150 例と設定して便検体の採取を継続した。便の検体は移植開始前検体として、入院時～移植前処置開始前までの任意の時点で採取し、移植前処置開始から移植後 1 か月目までは週 1 回採取、その後 1 年目までは 1 か月おきに採取、1 年目以降は年に 1 回、最大 20 年目まで採取を行うこととした。また、移植後長期生存者の腸内細菌叢評価のため、移植前の検体採取を行っていない場合も、研究協力の同意が得られた患者については外来にて便検体の採取を行った。検体採取は検体採取キットを用いて排便後速やかに行い、-30℃ で凍結保存を行った。Power Soil DNA extraction kit (Qiagen)を用いて便検体から DNA を抽出し、MiSeq sequencer(Illumina)を用いて 16S rRNA deep sequencing を行った。解析結果は QIIME pipeline により解析した(Nat Methods, 2010)。

臨床データは該当する患者の電子カルテを参照、抽出、および一般社団法人日本造血細胞移植データセンターの移植登録一元管理プログラム(TRUMP)へ登録された当院の移植患者のデータを抽出することにより利用した。

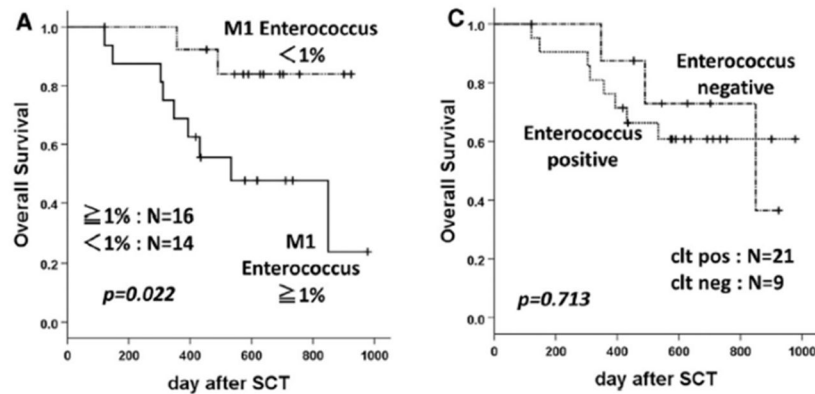
4．研究成果

当該期間中における本研究に関連した成果として下記 3 報の論文報告を行った。

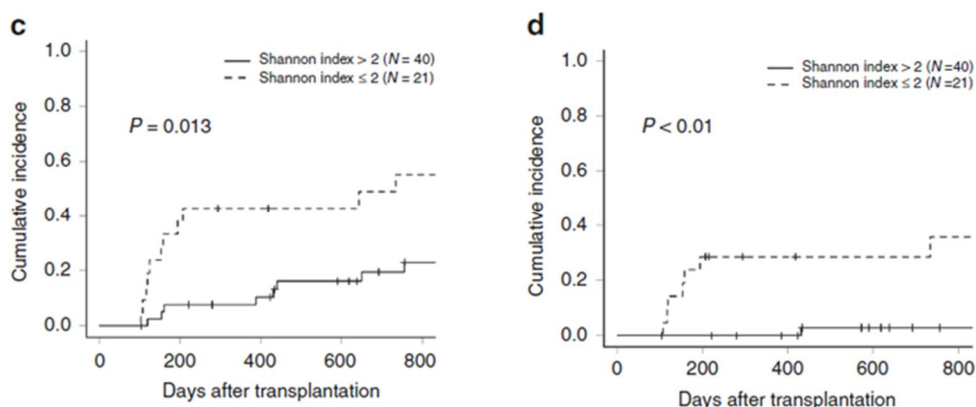
- (1) Enterococcus: A Predictor of Ravaged Microbiota and Poor Prognosis after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (Biol Blood Marrow Transplant 2020)
- (2) Low diversity of gut microbiota in the early phase of post-bone marrow transplantation increases the risk of chronic graft-versus host disease (Bone Marrow Transplant 2021)
- (3) Prolonged gut microbial alterations in post-transplant survivors of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (British Journal of Haematology 2022)

(1)は研究開始当初の背景の項目で述べた我々の先行研究である、腸内細菌叢の経時的な変動と移植後予後についての研究(British Journal of Haematology 2019)で用いた既存データおよび新たに採取した検体の解析データを利用した。大阪大学医学部附属病院で同種移植を実施した患者 38 名、経時的に採取した 121 サンプルについて解析を行った。その結果、同種移植患者では健常者コントロールと比較して腸内細菌叢の構成に変化を生じており、酪酸酸性菌の減少と腸球菌の増加を見出した。この腸内細菌叢の異常は同種移植後少なくとも 1 年間は持続していることを明らかにした。さらに、同種移植後 1 か月目に 16SrRNA 解析で検出された Enterococcus 属の相対存在量の増加は、同種移植後の生存率低下と関連していることが分かった(造血幹細胞移植後 2 年の全生存率は、Enterococcus 属の相対存在量が 1%未満の患者で 83.9%、1%未満の患

者で 47.6% : 下図 A, M1 Enterococcus: 1 か月目の Enterococcus 属の相対存在量)。その一方で、従来の便培養法で Enterococcus 属菌が検出された患者と検出されなかった患者に分けて生存率を解析したが、Enterococcus 属菌の存在と生存率の間に相関は見出されなかった(下図 C)。以上の結果から、16SrRNA 解析による Enterococcus 属菌の相対存在量の増加検出は腸内細菌叢の荒廃を反映しており、移植後予後の指標となる可能性が示唆された。



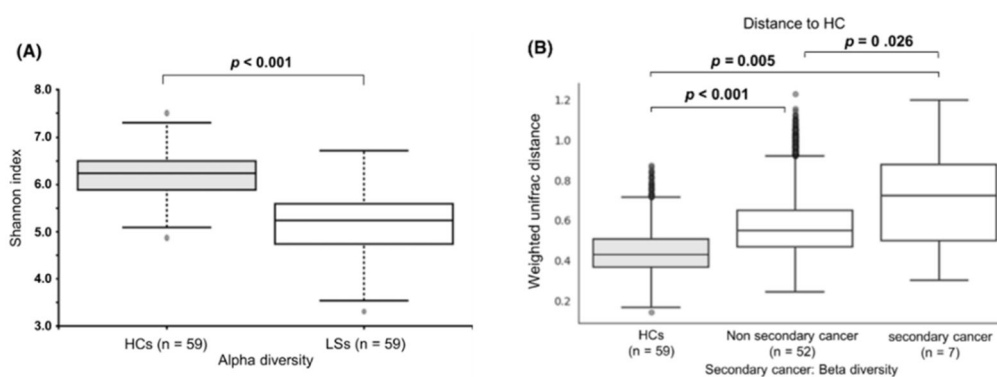
(2)は当院の既存データを共同研究機関の東京都立病院機構 がん・感染症センター 都立駒込病院血液内科のデータと合わせ解析した研究である。都立駒込病院 42 名、大阪大学医学部附属病院 19 名の患者に関して移植後 28 日目の腸内細菌叢と慢性 GVHD の関連に関して後方視的に解析した。腸内細菌叢の多様性指標として Shannon-Index(SI)を用いて解析すると、cGVHD の累積発症率は高 SI(SI>2.0)群が低 SI(≤ 2.0)群より有意に低値であり(1 年累積発症率 8% vs 43%、 $P=0.013$ 、下図 c)、moderate-severe の cGVHD の累積発症率も高 SI 群が低 SI 群より有意に低値であった(1 年累積発症率 0% vs 29%、 $P<0.01$ 、下図 d)。多変量解析の結果、day28 の低 SI 値(SI<2.0)が cGVHD の発症に関して独立したリスク因子として見出した。本研究により、移植後 1 か月目の腸内細菌叢の多様性がその後の cGVHD の発症率と関連していることが示唆され、移植後 1 か月目の腸内細菌叢異常が cGVHD の発症の予測因子となるとともに、cGVHD の予防のための新たな治療ターゲットとなる可能性を示した。



(3)は新たに採取した移植後長期生存患者の検体、解析データを用いた研究である。当院で過去に同種造血幹細胞移植を実施し、1 年以上生存している患者(移植後 1 年~21.7 年、中央値 6.4 年)

59 名の腸内細菌叢を解析した。この結果、同種移植後の長期生存者では、年齢や性別をマッチさせた健常対照者と比較して腸内細菌の多様性が低く(下図 A)、酪酸酸性菌の相対存在量が低下

していることが明らかとなった。grade3の重度の急性GVHD既往がある患者では、grade1-2の比較的軽症の急性GVHDの既往のある患者、急性GVHDの合併既往がない患者に比べて *Veillonella* 属の存在量が多く、移植後急性期におけるGVHDの影響が長期間続いていることを見出した。さらに、二次発癌を生じた患者群の腸内細菌叢の構成は、二次発癌を生じていない患者群の腸内細菌叢と有意に異なっていることが分かった(下図B)。本研究の結果、同種造血幹細胞移植を実施後、退院して健常者と同様の日常生活に復帰しても10年以上の長期間にわたって腸内細菌叢の異常が遷延していることが示され、これらの長期間の腸内細菌叢の異常が移植後長期生存者における二次発癌などの晩期合併症の発症や増悪と関連していることを示した。当院では同種移植後患者の晩期合併症のフォローのために移植後10年以上の長期間の外來経過観察をおこなっている。国外施設などにおいてはもう少し短期間でフォローを終了していることが一般的であるため、同種移植後長期生存者の腸内細菌叢に関する報告はなく、本研究が明らかにした知見の重要性は高いと考えている。



以上のように、当初の研究の目的のうち、第一の目標である腸内細菌叢の変動と移植後予後、合併症の関連、特に移植後長期生存者における影響に関しては新たな知見を見出すことができた。1)および2)の成果は移植後1か月目の時点の腸内細菌叢が予後予測やcGVHDの発症予測へ利用できる可能性、予防的治療の対象となる可能性を示唆している。また、3)は同種移植患者の長期的な腸内細菌叢の異常を初めて明らかにした研究であり、本研究の成果は同種移植長期生存者の晩期の合併症の予防、治療に大いに寄与しうると考えている。

近年、広域抗菌薬使用による腸内細菌叢の攪乱により、GVHDの増加など移植後予後への影響についての知見が、複数報告されるようになってきており、我々のこれまでのデータと合わせても、長期間の広域抗菌薬の使用は耐性菌の誘導などの感染管理上の問題だけではなく、同種移植の合併症の増加、予後の悪化など直接的な移植後への影響が示唆されるようになった。これに対して、腸内細菌叢への比較的影響の少ないと考えられる抗菌薬を使用すること(カルバペネムよりは第4世代セフェムが望ましい、など)、必要最小限の投与使用期間にするなど、適正な抗菌薬使用法に関して、現在検討中である。

その一方で、尿中の indoxyl sulfate といった 16SrRNA 解析よりも簡便な腸内細菌叢の評価方法の評価については残念ながら当該研究期間内では行うことができなかった。16SrRNA 解析は詳細な腸内細菌叢の評価ができる一方で、結果が判明するまでに一定の時間を要する方法である。簡便な腸内細菌叢の評価方法が利用できれば、検温や血液検査などのようにリアルタイムに近い状態で患者状態を把握することが可能となるため、即応性が高く臨床におけるニーズは高いと考えられる。当研究は現在も進行中であり、今後の検討目標としたいと考えている。

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 0件）

1. 著者名 Kusakabe Shinsuke, Fukushima Kentaro, Yokota Takafumi, Hino Akihisa, Fujita Jiro, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Shibayama Hirohiko, Kanakura Yuzuru	4. 巻 26
2. 論文標題 Enterococcus: A Predictor of Ravaged Microbiota and Poor Prognosis after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Blood and Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 1028 ~ 1033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbmt.2020.01.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Konishi Tatsuya, Kusakabe Shinsuke, Hino Akihisa, Inamoto Kyoko, et al.	4. 巻 56
2. 論文標題 Low diversity of gut microbiota in the early phase of post-bone marrow transplantation increases the risk of chronic graft-versus-host disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 1728 ~ 1731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41409-021-01249-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hino Akihisa, Fukushima Kentaro, Kusakabe Shinsuke, Ueda Tomoaki, Sudo Takao, Fujita Jiro, Motooka Daisuke, Takeda Aya K., Shinozaki Natsuko O., Watanabe Satoshi, Yokota Takafumi, Shibayama Hirohiko, Nakamura Shota, Hosen Naoki	4. 巻 -
2. 論文標題 Prolonged gut microbial alterations in post transplant survivors of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.18574	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------