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　７ 年　 ５ 月 ２３ 日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2022～2024
課題番号：２２Ｋ０８７７２

研究課題名（和文）炎症性腸疾患における腸内細菌叢に対する腸管上皮機能異常の研究

研究課題名（英文）Elucidation of Epithelial Dysfunction in Response to Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases

研究代表者

水島　恒和（Mizushima, Tsunekazu）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教授

研究者番号：００５２７７０７

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）：炎症性腸疾患は腸内細菌叢に対する免疫異常が関与する慢性炎症性疾患である。本研究では一時的人工肛門造設症例の腸管を比較対象とし、腸内細菌叢の影響を制御した状態でCD患者の腸管上皮細胞の遺伝子発現変化を解析したが、遺伝子発現に大きな個体差が認められた。胆汁酸関連遺伝子ENPP7に注目したが、CD患者の臨床因子との相関は見られなかった。腸管上皮の解析に限界があると判断し、腸間膜リンパ節に着目、BACH2発現の免疫染色を行った結果、一部のCD患者でBACH2発現の低下と高CRP・低Albとの関連が認められ、BACH2がCDの病態に関与し得る可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
炎症性腸疾患の患者数増加は著しいが，その病因は未だ明らかではない。新規治療の開発により，病態のコントロールは向上しているが、一方でコントロール不良、狭窄や瘻孔などの腸管合併症例，癌合併などにより手術が必要となる患者は依然として多い。本研究では多数の外的因子の影響を受ける腸管上皮においてCD患者では発現に個体差を認め共通した遺伝子を検索する上で大規模な症例数が必要である可能性が示された。一方で腸間膜リンパ節においてBACH2発現の変化が病態との関連を認めることが示され、新たな治療標的としての可能性が示された。本研究は今後のヒトサンプルを用いたIBD研究において貢献できる結果であったと考える。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic inflammatory condition associated with abnormal immune responses to the intestinal microbiota. In this study, we analyzed intestinal epithelial cells from Crohn's disease (CD) patients using RNA sequencing, comparing them to samples from temporary diverting stoma cases in which the influence of the intestinal microbiota was surgically controlled. However, we observed substantial interindividual variability in gene expression. Although we focused on the bile acid related gene ENPP7, no significant correlation with clinical factors in CD patients was found. Due to the limitations of epithelial analysis, we shifted our focus to the mesenteric lymph nodes, a key site of immune response. Immunohistochemical analysis revealed decreased BACH2 expression in a subset of CD patients, which was associated with elevated CRP and reduced albumin levels, suggesting that BACH2 may be involved in the pathogenesis of CD.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：炎症性腸疾患　クローン病　腸管上皮細胞　腸間膜リンパ節

※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。

様　式　C－１９、F－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

炎症性腸疾患（Inflammatory Bowel Diseases：IBD）は消化管に原因不明の炎症をおこす慢性疾患の総称で，潰瘍性大腸炎（Ulcerative Colitis：UC），クローン病（Crohn’s Disease：CD）の 2 疾患からなる。本邦の患者数増加は著しく，UC219,685 人（183,968-255,403 人），CD 70,700 人（56,702-84,699 人）と推計されている（Murakami Y, et al., J Gastroenterol, 2019）。UC，CD ともに若年者に発症することが多く長期にわたっての治療が必要となる。TNF-αや IL-12/23p40 などの炎症性サイトカインやα4β7 インテグリンや JAK などの免疫関連分子を標的とした薬物療法の開発により，以前と比較して腸管炎症のコントロールは向上している。しかし，内科治療による炎症のコントロールが困難な重症例，繰り返す炎症の結果生じる狭窄や瘻孔などの腸管合併症，癌合併などにより手術が必要となる患者は依然として多い（Sato Y,et al., Clin Gastroenterol Hepatol, 2015，Uchino M, Mizushima T, et al., Surg Today,2019, ）。CD では術後の再発，再手術率も高く初回手術後 10 年で約 5 割の患者で再手術が必要となる（Shinagawa T, Mizushima T, et al, Clin Gastroenterol Hepatol,2019）。

IBD の病態には遺伝的素因と環境的要因が関与していると考えられているが，その病因は未だ明らかではない。近年の研究では，消化管における腸内細菌叢に対する免疫応答の異常が，IBD の病因に重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。腸内細菌叢が腸管上皮や（腸管）免疫細胞の形成や維持に重要な役割を果たしていることは，マウスを用いた研究を通じて古くから知られており，無菌マウスでは腸管絨毛の萎縮など腸管上皮構造の異常をきたす（Thompson GR, Trexler PC, Gut, 1971）。また，炎症性腸疾患を自然発症する IL-10 遺伝子欠損（IL-10 KO）マウスを無菌環境下で飼育すると腸炎を発症しないことも知られている（Sellon RK, et al. InfectImmun, 1998）。

腸管内では 1 層の腸管上皮細胞が腸内細菌叢と（腸管）免疫細胞を隔てており，バリアとして重要な役割を担っている。腸管上皮のバリア機能は（腸管）免疫細胞が産生する炎症性サイトカインなどにより影響を受けることがわかっているが（Mahapatro M,et al. Cell, 2021），腸管上皮の透過性亢進が腸炎の発症に先立って生じていることが報告されている（Irvine EJ, et al. Gastroenterology, 2000）。

IBD の病因において腸管上皮が腸内細菌叢と（腸管）免疫細胞の関係にどの様な影響を及ぼしているかは，明らかではない。IBD 患者の腸管上皮にどの様な変化が起こっているかを明らかにし，バリア機能を制御することが可能となれば（腸管）免疫細胞の異常な免疫応答の抑制が期待できる。本研究では IBD の病態における腸管上皮の役割を明らかにし，バリア機能制御による新規治療法開発の可能性を探索したい。

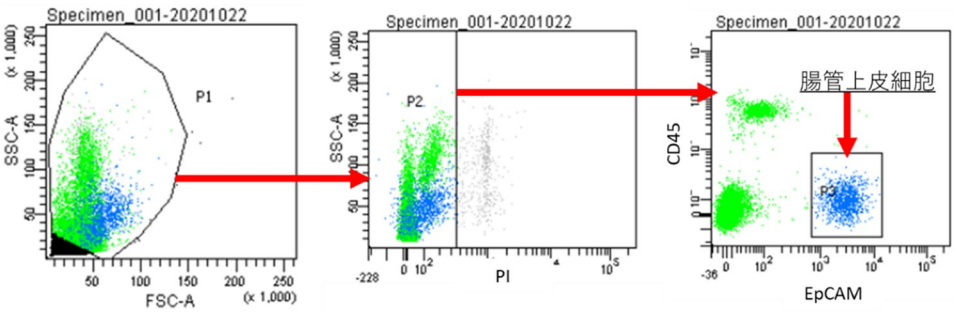
２．研究の目的

本研究では、一時的人工肛門造設状態という外科的に腸内細菌叢の影響がコントロールされた特殊な状態の手術検体を解析することにより、IBD における腸内細菌叢を含む外的因子に対する腸管上皮の変化やバリア機能への影響を明らかにし、バリア機能制御による新規治療法開発の可能性を探索することを目的とした。

また、途中より腸管とは別の免疫応答の場である腸間膜リンパ節(Mesenteric lymph nodes：MLN)を構成する免疫細胞に発現する遺伝子に着目し、IBD の病態への影響を解析し新規の治療法開発の可能性を探索することを同様に目的とした。

３．研究の方法

2021 年～2024 年の期間に回盲部切除術を受けた CD 患者 12 例の回腸炎症部および直腸癌 3 例の手術後の人工肛門閉鎖術時に採取した回腸双孔式人工肛門の口側腸管および肛門側腸管を対象とし、採取した腸管粘膜を剥離・細断し EDTA を添加して振盪し細胞分散後、遠心し細胞を回収した。フローサイトメトリーにて CD45+EpCAM+細胞を収集し RNA を抽出、RNA seq 解析を実施した。



また、腸間膜リンパ節に関しては腸管切除およびリンパ節郭清を受けた CD 患者 38 名を対象とし、MLN を構成する免疫細胞に発現する遺伝子として CD 疾患感受性遺伝子の一つであり、リン

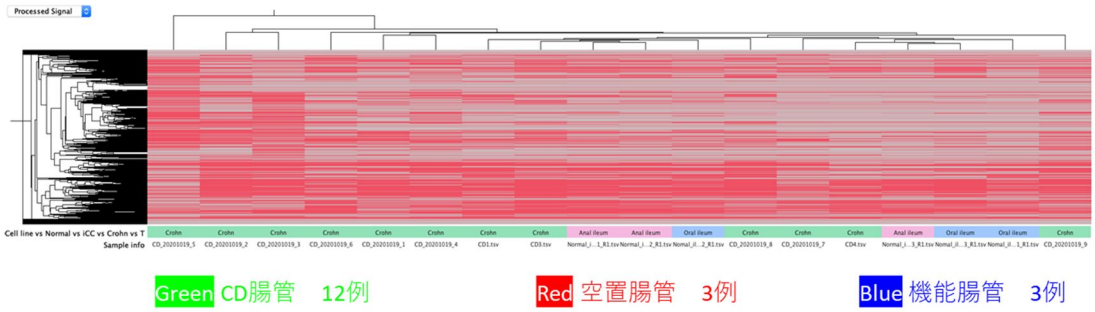
パ球の分化・成熟に関わるとされる BACH2 に着目し、免疫組織化学（Immunohistochemistry：IHC）を実施した。IHC には抗 BACH2 抗体（LifeSpan Biosciences 社、LS-B3533、1:200 希釈）を用いて組織学的特徴を比較し、BACH2 発現と周術期因子との関連を解析した。

４．研究成果

(1)腸管上皮における遺伝子発現と腸内細菌による影響の解析

・RNA sequence 解析

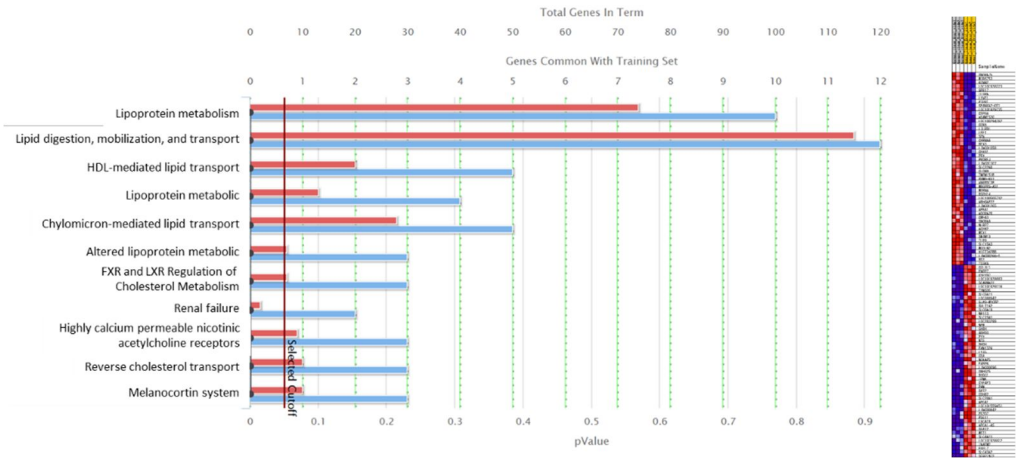
発現量が極めて小さい遺伝子を除外して分析を実施した所、対象別にクラスタリングされず研究の対象となるような遺伝子の特定には至らなかった。



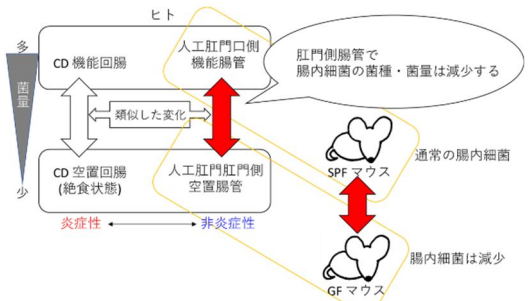
Green CD腸管　12例　　Red 空置腸管　3例　　Blue 機能腸管　3例

・機能腸管および空置腸管の Pathway 解析

機能腸管，空置腸管サンプルで Pathway 解析を実施し．脂肪酸代謝に関した Pathway に含まれる遺伝子で発現の変化を認めた。



一方で、腸内細菌の菌量がヒトの腸管上皮の遺伝子発現に与える影響を調べるため，過去の研究で実施した SPF マウスと GF マウスの腸管の RNA シークエンス解析のデータを参照して、ヒトサンプルと共通する遺伝子を検索した所、空置腸管に対応していると考えられた GF マウスで脂肪代謝に関する Pathway が上昇しており、ヒトの Pathway 解析と反対の結果となり、マウスと比較してヒトサンプルの個体差が大きいこと、食事や胆汁酸への暴露の有無が影響していることが考えられた。

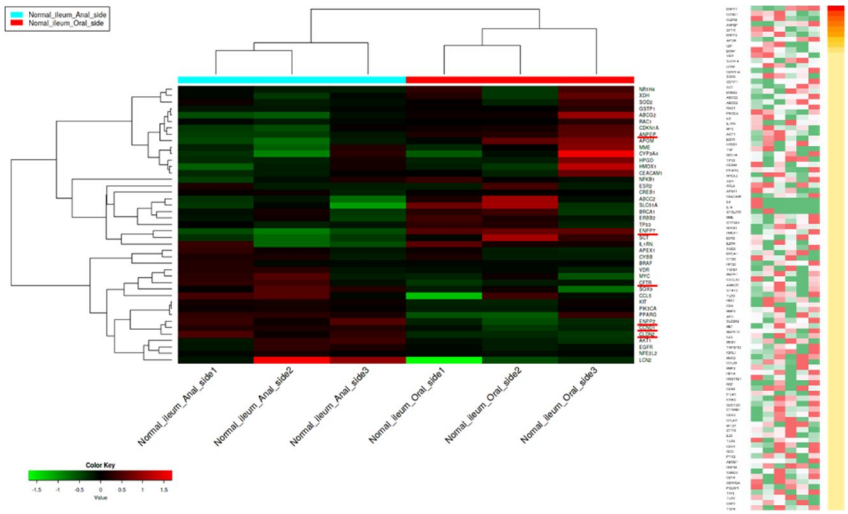


GFマウス	size
LIPID METABOLIC PROCESS	166
STEROID METABOLIC PROCESS	40
DRUG METABOLIC PROCESS	15
STEROL METABOLIC PROCESS	19
ORGANIC HYDROXY COMPOUND METABOLIC PROCESS	79
MONOOXYGENASE ACTIVITY	16
CELLULAR LIPID METABOLIC PROCESS	141
FLAVIN ADENINE DINUCLEOTIDE BINDING	15
ANION TRANSPORT	68
CELLULAR LIPID CATABOLIC PROCESS	32

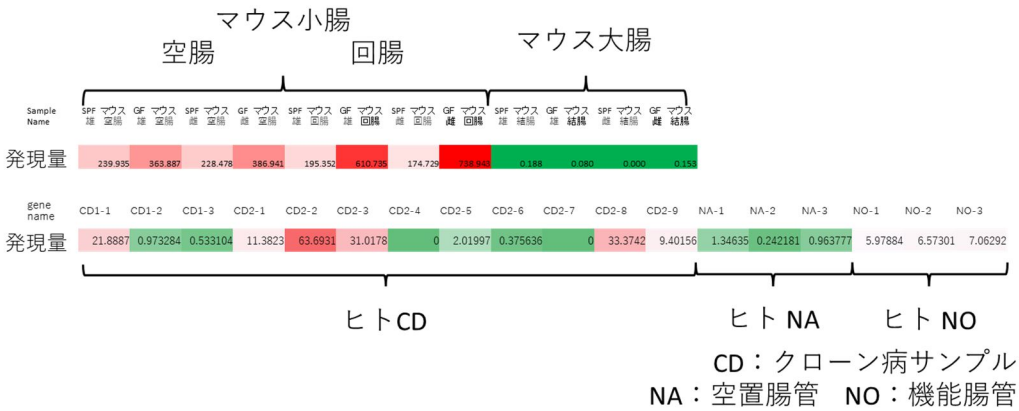
SPFマウス	size
IMMUNE RESPONSE	109
POSITIVE REGULATION OF IMMUNE RESPONSE	58
REGULATION OF IMMUNE RESPONSE	94
ACTIVATION OF IMMUNE RESPONSE	43
POSITIVE REGULATION OF IMMUNE SYSTEM PROCESS	102
INNATE IMMUNE RESPONSE	59
IMMUNE SYSTEM PROCESS	197
MITOTIC CELL CYCLE	102
REGULATION OF IMMUNE SYSTEM PROCESS	151
REGULATION OF CELL ACTIVATION	68

・胆汁と腸管上皮に関連した遺伝子の検索

脂肪酸代謝と関係する胆汁酸に着目し既報において胆汁と腸管上皮との関連性が示唆されている遺伝子を検索し 86 遺伝子を選出し機能腸管と空置腸管での発現を解析した所、発現に有意差を認める遺伝子として ENPP7、CCND1、CLDN2、ANPEP、CFTR、ENPP2 の 6 つを認めたが、十分な発現量を認める遺伝子は ENPP7 のみであった。



・マウスにおける ENPP7 の発現との比較
ENPP7 はマウスの小腸に高発現しており、特に GF マウスの回腸で高発現を認めた。
一方で、ヒトサンプルでは空置腸管より機能腸管において発現を認めたが CD 患者の腸管では発現量にばらつきが認められた。



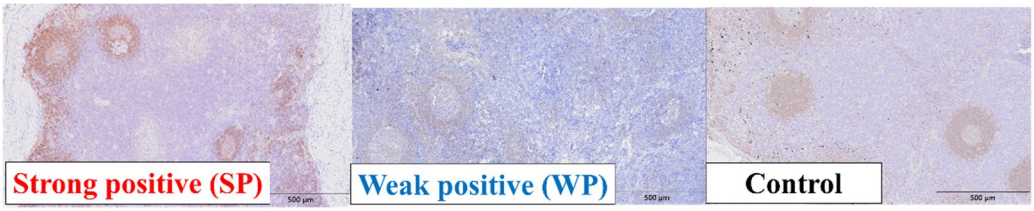
・CD 腸管における ENPP7 の発現と臨床病理学的因子の相関
CD 腸管での ENPP7 の発現と臨床病理学的因子の間に相関があるかを解析した所、明らかな相関を認める因子を認めなかった。

	CD1-1	CD1-2	CD1-3	CD2-1	CD2-2	CD2-3	CD2-4	CD2-5	CD2-6	CD2-7	CD2-8	CD2-9
M/F	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
手術時年齢	49	51	43	23	51	40	41	51	21	25	19	28
発症年齢	21	51	27	15	45	31	23	29	16	18	19	20
罹患期間	28	0	16	8	6	9	18	22	5	7	0	8
lacation	ileum	ileum	ileum	ileum	cecum	ileum	cecum	cecum	cecum	cecum	cecum	ileum
behavior	狭窄	瘻孔	瘻孔	狭窄	狭窄	狭窄	膿瘍	狭窄	穿孔	狭窄	狭窄	狭窄
肛門病変	-	-	-	fistula	-	fistula	-	-	skip tag	-	-	fistula
ED	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
5ASA	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
AZA/MP	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
anti-TNFα	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
腸管切除歴	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
WBC				4020	8480	3510	10120	5530	6540	4770	3390	4050
CRP				0.03	1.37	0.03	3.53	0.16	0.98	0.07	0.04	0.04
ENPP7	21.889	0.973	0.533	11.382	63.693	31.018	0	2.02	0.376	0	33.374	9.402

(2)CD 患者の腸間膜リンパ節における BACH2 発現の影響

・CD 患者の腸間膜リンパ節における BACH2 発現の変化

腸管におけるもう一つの獲得免疫の場である腸間膜リンパ節において、BACH2 染色を実施した所、対照群(健常群)と比較し一部 CD 患者の腸間膜リンパ節において BACH2 発現の低下を認めた。



・CD 腸間膜リンパ節における BACH2 発現と臨床病理学的因子の関連

続いて、BACH2 発現において対照群と同等かそれ以上の発現レベルを持つ MLN は強陽性(SP)25 例に、発現が低いものは弱陽性(WP)13 例に分類し臨床病理学的因子に関して比較した所高 CRP(p=0.010)かつ、低 Alb(p=0.018)傾向を認め、術前における炎症の遷延を反映している可能性が示唆された。

以上の結果から、CD 患者の腸管上皮細胞における遺伝子発現はマウスと異なる変化を示し、機能腸管および空置腸管の比較では脂肪酸代謝に関連した Pathway の発現に変化を認め、胆汁酸関連遺伝子に着目した場合は ENPP7 に発現の変化を認めたものの CD 腸管においては発現量にばらつきを認め、臨床病理学的因子と相関しないことが示された。これらはヒトサンプル特有の個体差や CD において多様化する治療歴などの臨床因子を反映している可能性が示唆された。

一方で、一部、CD 患者の MLN における BACH2 発現の低下と炎症が関連していることから、BACH2 が CD の病態に関連しており、新たな治療標的となる可能性が示唆された。

本研究結果からは多数の外的因子の影響を受ける腸管上皮において CD 患者では発現に個体差を認め共通した遺伝子を検索することが困難である可能性が示された。対策としてはより多数の症例数を集める、サンプル採取の対象を治療歴がないものに統一するなどが考えられ、本研究は今後のヒトサンプルを用いた IBD 研究において貢献できる結果であったと考える。

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　1件）

１．発表者名 Hasegawa M, Ogino T, Sekido Y, Takeda M, Hata T, Hamabe A, Miyoshi N, Uemura M, Mizushima T, Doki Y, Eguchi H.
２．発表標題 The Significance of BACH2 Expression in Mesenteric Lymph Nodes of Crohn’s Disease
３．学会等名 20th Congress of ECCO（国際学会）
４．発表年 2025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	関戸　悠紀 (Sekido Yuki) (00781709)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤） (14401)	
研究分担者	荻野　崇之 (Ogino Takayuki) (50597458)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	吉原　輝一 (Yoshihara Terukazu) (70850311)	大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員 (14401)	
研究分担者	長谷川　誠 (Hasegawa Makoto) (10966534)	大阪大学・医学部附属病院・医員 (14401)	

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