

201123033A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

抗菌剤治療により寛解する難治性炎症性腸疾患患者の
網羅的細菌叢解析と病因・増悪因子細菌群の解明

平成23年度 研究報告書

平成24年3月

研究代表者

黒田 誠

(国立感染症研究所)

平成23年度厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

抗菌剤治療により寛解する難治性炎症性腸疾患患者の網羅的細菌叢解析と病因・増悪因子細菌群の解明

研究報告書

研究代表者	黒田 誠	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター	センター長
研究協力者	関塚剛史	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター	第三室
研究協力者	大草敏史	東京慈恵会医科大	
研究協力者	寺尾修一	加古川東市民病院	

研究要旨

難治性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎（UC）は、個有の遺伝的背景と腸内細菌叢が密接に関連して発症する事が示唆されている。三種の抗菌剤（アモキシシリン／テトラサイクリン／メトロニダゾール）を二週間投薬するだけで、その疾患が1年以上緩解する治療例が報告されている。しかしながら、その患者腸管内の膨大な細菌叢の中で、どの細菌が最もその疾患と相関するのかは不明である。本研究は、UC発症の環境要因となる細菌叢を抗菌剤治療前後で網羅的且つ定量的に解析を行い、本疾患と密接に関連する細菌の探索を行い、本疾患の発症機序を環境要因の側から理解することを目的とする。

UC患者2名（UC-266875, UC-267223）の発症時およびATM治療後の寛解時の排泄便を得て（研究協力者：寺尾修一先生・加古川東市民病院）、便検体に内在する細菌フローラを16S-rDNA解読法とメタゲノミクス法にて同定・分類し比較検討した。得られた細菌の解読リードを細菌属レベルで分類したところ、寛解維持に伴い腸内環境を改善する *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* の増加が顕著であり、腸内フローラが健常に近づきつつあると示唆された。一方、患者2名の発症時の様子は異なっており、*Escherichia*, *Ruminococcus*, *Leuconostoc*, *Bacteroides* の検出が顕著であった。本研究課題で開発した網羅的細菌種鑑別法は、包括的に細菌および生物種の鑑別を定量的に解析する事ができる。本年度においては、UC患者2名のみを対象にした網羅解析であるが、ATM治療により寛解維持できたUC患者の実態を「腸内細菌フローラ」として示すことができたと考えている。ステロイド治療も無効であるステロイド抵抗性UC患者にはATM治療等、代替医療を必要とする。増悪に関与する細菌種を特定することが本研究課題の最終目標であり、UC患者の症状をより明確に説明する検査法の開発、かつATM治療に代わる適切な抗菌薬処方提案できるものと考えている。

A. 研究目的

難治性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎（UC）は、個有の遺伝的背景と腸内細菌叢が密接に関連して発症する事が示唆されている。*Fusobacterium varium* がUCの増悪因子である可能性が報告されており、三種の抗菌剤ATM（アモキシシリン／テトラサイクリン／メトロニダゾール）を二週間投薬するだけで、その疾患が1年以上緩解することが明らかとなっ

てきた。しかしながら、その患者腸管内の膨大な細菌叢の中で、どの細菌が最もその疾患と相関するのかは不明である。本研究は、UC発症の環境要因となる細菌叢を抗菌剤治療前後で網羅的且つ定量的に解析を行い、本疾患と密接に関連する細菌の探索を行い、本疾患の発症機序を環境要因の側から理解することを目的とする（図1）。

B. 研究方法

平成22年度に腸内細菌叢の網羅解析法を開発し報告した(図2・左)。それに加え今年度、供試DNAを網羅的に配列解読し生物種毎に分類するメタゲノミクス解析法も開発した(図2・右)。2つの方法を併用する理由として、細菌のみを解析対象とする16S-rDNA解読法に加え、メタゲノミクス解析法を追加することで供試検体の現況を包括的に理解できると考えたからである。

UC患者2名(UC266875, UC-267223)の発症時およびATM治療後に寛解維持している時の排泄便を得た(研究協力者:寺尾修一先生・加古川東市民病院)。糞便懸濁液を溶菌酵素(lysozymeとachromopeptidaseの混合)にて溶菌処理を施し、QIAGEN DNA stool kitを用いてDNA精製した。精製DNAを用いて16S-rDNA可変領域V3を対象にイルミナライブラリー用のPCRアンプリコンを得た。平行して、NEXTERA sample prep kitを用いてメタゲノムDNAライブラリーを作製した。それぞれIllumina GAIIxを用いて平均1000万本の配列を解読し、細菌種鑑別に有効な配列対象を検討した。解読リードを相同性検索により細菌種を鑑別した。配列検索に使用したデータベースは、RDP10(Ribosomal Database project release 10)とNCBI non-redundant ntデータベースを用いた。

(倫理面への配慮)

微生物検査として網羅配列解読による病原体検出を行った。患者配列を特定する作業は行わず、個人情報に結びつく配列解析は一切行っていない。国立感染症研究所・医学研究倫理委員会にて承認済み。

C. 研究結果

1) UC患者 UC-266875

発症、ATM治療1ヶ月後、ATM治療7ヶ月後の便検体に内在する細菌フローラを同定・分類し比較検討した。16S-rDNAの解読リードから、発症時は大腸菌が最も優勢菌種であり67.6%を占めていた(図3・上)。解読リード数と主成分分析の結果から、

発症時に多くATM治療後に減少した細菌属として*Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Campylobacter*が候補として挙げられた(図3・上)。その逆のATM治療後に*Blautia*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*が増加しており、健常成人の腸内フローラに類似した細菌プロファイルを示していた。

同じ便検体DNAをメタゲノミクス解析により検討したところ、粘血便が示すように、発症時の解読リードの99%がヒト配列であった(図4・左上)。UC発症による大腸粘膜の炎症が顕著であることを示していると思われる。ATM治療後、ヒト配列の検出%が減少するとともに細菌の検出率が増加し、健常者に近い細菌比率に近づいていることが分かった。

得られた細菌の解読リードを細菌属レベルで分類したところ、寛解維持に伴い腸内環境を改善する*Bifidobacterium*の増加が顕著であり、腸内フローラが健常に近づきつつあるように示唆された。一方、ATM治療により消失する細菌がUC発症の増悪因子と想定される。患者2名の発症時の様子は異なっており、UC-266875の便の細菌の95%が大腸菌であり、16S-rDNA解読と同様の結果を得た(図4・中央上ラインプロット)。血清型の異なる病原性大腸菌の全ゲノム配列が数多く報告・公開されているため、菌株の固有SNPsを利用して株系統に分類した(図4・右)。発症時は腸管外大腸菌ExPECの系統に属するUMN026株と同等の菌株が有意に存在し、ある特定の大腸菌株が腸内で大量に増殖していることが推察された。ATM治療による寛解に伴い、健常フローラと同様の多様な系統の大腸菌の割合に変動していることが分かった。

図4で得られた結果を主成分分析にてプロットした(図5)。発症時(ATM治療前)で多く存在し、治療後に顕著に減少・増加した細菌を抽出し、図4で上述した同様の結果が得られた。

2) UC患者 UC-267223

発症、ATM治療1ヶ月後、ATM治療3ヶ月後の便検体に内在する細菌フローラを同定・分類し比較検

討した。16S-rDNA の解読リードから、発症時は *Coprococcus*, *Bacteroides* が最も優勢菌種であった (図3・下)。解読リード数と主成分分析の結果から、発症時に多く、ATM 治療後に減少した細菌属として *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Campylobacter* が候補として挙げられた (図3・下)。その逆の ATM 治療後に *Blautia*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium* が増加しており、健常成人の腸内フローラに類似した細菌プロファイルを示していた。

同じ便検体 DNA をメタゲノミクス解析により検討したところ、UC-266875 と同様に、粘血便が示す 99% がヒト配列であった (図4・左下)。UC 発症による大腸粘膜の炎症が顕著であることを示していると思われる。

得られた細菌の解読リードを細菌属レベルで分類したところ、寛解維持に伴い腸内環境を改善する *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* の増加が顕著であり、前述の UC-266875 と同様、腸内フローラが健常に近づきつつあるように示唆された。一方、患者2名の発症時の様子は異なっており、UC-267223 の便の細菌の 35% が *Ruminococcus*、20% が *Leuconostoc*, *Bacteroides* であった (図4・中央下ラインプロット)。

図4で得られた結果を主成分分析にてプロットした (図5)。発症時 (ATM 治療前) で多く存在し、治療後に顕著に減少・増加した細菌を抽出し、図4で上述した同様の結果が得られた。UC-266875 便は *Bacteroides*, *Leuconostoc* が顕著であり UC-266875 とは異なるが、*Leuconostoc* の菌数の減少が UC-266875 でも認められることから、共通する候補の可能性が示唆された。

D. 考察

本研究課題で開発した網羅的細菌種鑑別法は、包括的に細菌および生物種の鑑別を定量的に解析する事ができる。従来法では、「氷山の一角」に過ぎない変動を議論せざるを得なかったが、次世代シーケンサーによる deep-sequencing は、より深くまで掘り下げて詳細な解析を可能にしてくれる。本

年度は UC 患者2名のみを対象にした網羅解析であるが、ATM 治療により寛解維持している UC 患者の実態を「腸内細菌フローラ」として示すことができた。

大腸粘膜のびらん炎症像が示すように、UC 発症時は通常の細菌フローラでは無いだろうと感じていたが、想定通り特有の細菌が過剰に増殖した結果、UC の増悪に関連していることが示唆された。患者 UC-266875 の発症時においては尿路病原性大腸菌と思われる固有の大腸菌株が過剰に増殖しており、ある単一の細菌種に固定されてしまって多様性を失っていることが分かった。健常便では *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* 等、様々な細菌種が混在して健常性を維持しているため、その多様性からは程遠い腸内細菌フローラである。UC 発症時の解析結果は、腸内フローラの多様性が健常性を維持する重要なファクターであることを示唆していた。

ステロイド治療も無効な抵抗性 UC 患者には ATM 治療等、代替医療を必要とする。ATM 治療の臨床試験の成績から、全ての UC 患者を ATM 治療で根治させることは難しいと思われる。しかしながら、プラセボ群と比べて明らかに優位にステロイド離脱できている治療法であるため、細菌による増悪は明らかである。具体的に増悪に係る細菌種を特定することが本研究課題の最終目標であり、UC 患者の症状をより明確に説明する検査法開発に貢献し、かつ ATM 治療に代わる適切な抗菌薬処方提案できるものと考えている。

E. 結論

コホの4原則に適合する感染症は、その病原体が培養可能であり、且つ感染実験系が確立している為、その理解がし易い。しかしながら、その原則に当てはまらない培養不可能な病原体、および、病原性は低い数種の要因で疾患を呈するものに関する理解は進んでいない。この様な、新たに提唱可能な新興感染症となりうる病原体の理解は、今後更に重要となる。また、難治性疾患である UC は、上記のような新興感染症の可能性が強く示唆されるため、感染症と難治性疾患との関係をより詳細に理解

する為の研究が必要不可欠となる。本研究課題は近年発症患者数が増加の一途を辿る UC の発症機序を細菌叢側から理解する事が可能であり、本疾患発症に重要な、新たな細菌の特定が可能となる。次年度以降、より多くの UC 患者の糞便を用いた細菌叢網羅鑑別を行う予定である。得られた研究結果は、日本国内のみならず、全世界の本疾の予防、患者の治療、更にはその診断に重要な知見を提供できると考えている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

- ① 関塚剛史, 黒田 誠。次世代シーケンサーを用いた 16S rDNA 配列解読による網羅的且つ定量的な腸内細菌叢解析。第 15 回腸内細菌学会 (2011 年 6 月 東京医科歯科大・湯島キャンパス)
- ② Tsuyoshi Sekizuka and Makoto Kuroda. A comprehensive and quantitative 16S ribosomal DNA deep-sequencing analysis for microbiota using next-generation sequencer. IUMS 2011 Bacteriology 2011/9/6 ~ 10. Sapporo, Japan.
- ③ Tsuyoshi Sekizuka and Makoto Kuroda. A Comprehensive And Quantitative 16S rDNA Deep-sequencing Analysis For Microbial Flora Using Next-generation Sequencer. 111th General Meeting American Society for Microbiology. May 21-24, 2011. New Orleans, Louisiana, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

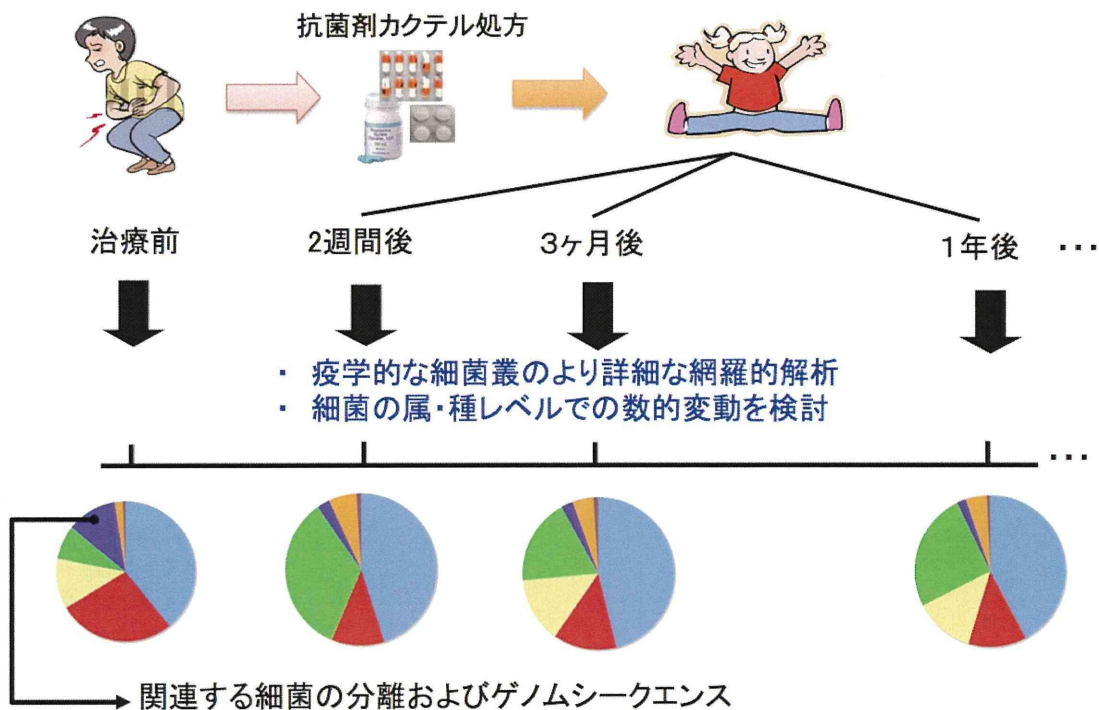
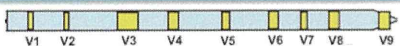


図1 研究計画の流れ図

網羅的配列解読による細菌フローラ解析

細菌 16S-rDNA 配列による同定分類	メタゲノミクス
 <ul style="list-style-type: none"> 細菌のみをターゲットにしている。 	<ul style="list-style-type: none"> 供試検体の状況がよくわかる。 (血便の場合、ヒト配列が多数検出)
<ul style="list-style-type: none"> 登録細菌種が多い。 (7,877菌種。RDP10 database) 	<ul style="list-style-type: none"> 解読済みの細菌種が少ない (2,728菌種。GOLD database)
<ul style="list-style-type: none"> Variable領域の特徴で菌鑑別できる。 	<ul style="list-style-type: none"> 種レベルの明確な分類が難しい。
<ul style="list-style-type: none"> ウイルス、真菌等、他の病原体を検査できない。 	<ul style="list-style-type: none"> ウイルス、真菌等、他の病原体の同定も可能。

- 本計画は、抗菌薬3剤カクテル(ATM)により寛解したUC患者を想定しているため、細菌のみをターゲットにしている。
- しかしながら、患者便の全体像を把握するため、メタゲノミクスも行い、包括的な考察を行う。

図2 本研究で用いた細菌フローラ解析の特徴 (利点と欠点)

細菌 16S-rDNA 配列による同定分類および主成分分析

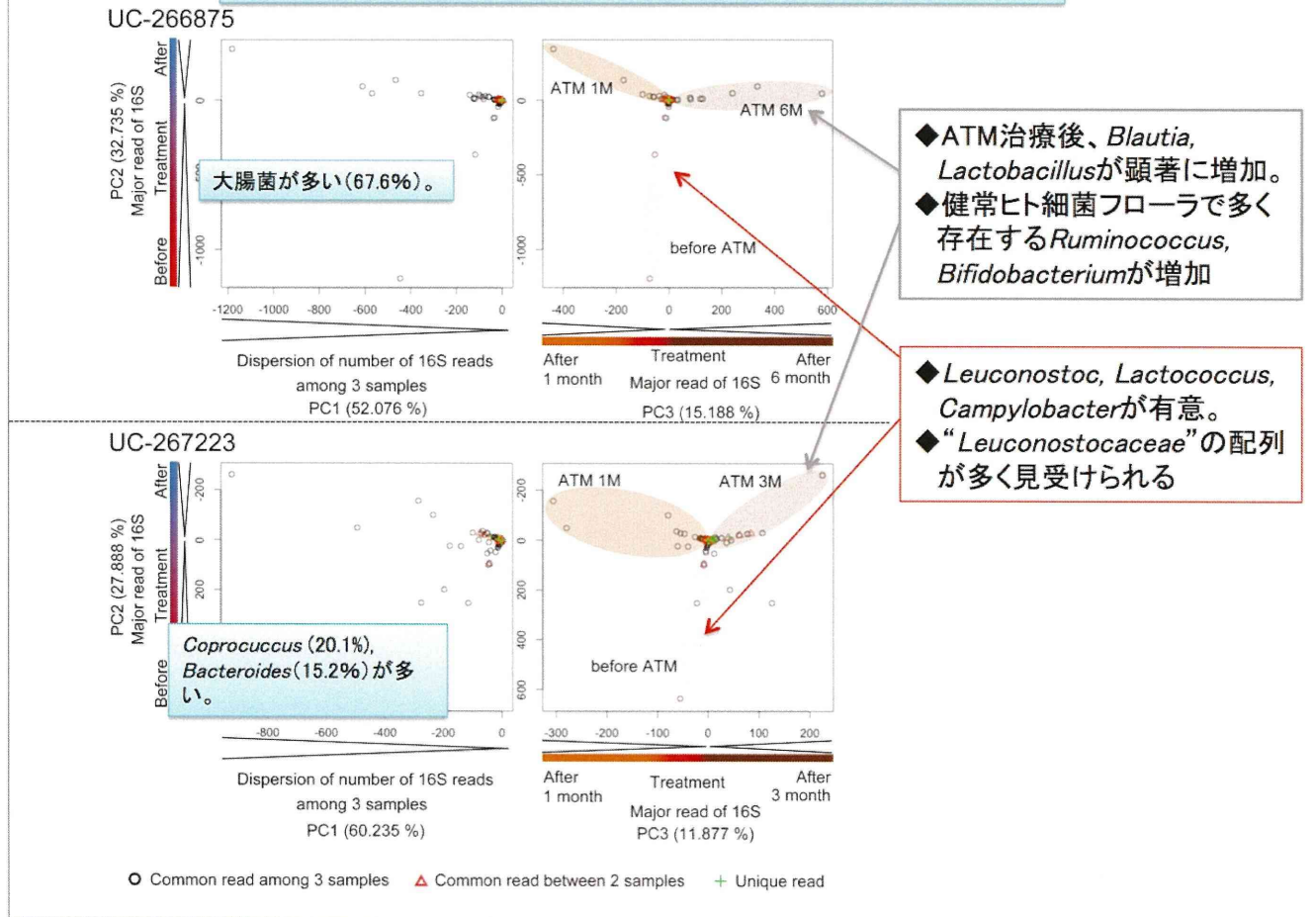
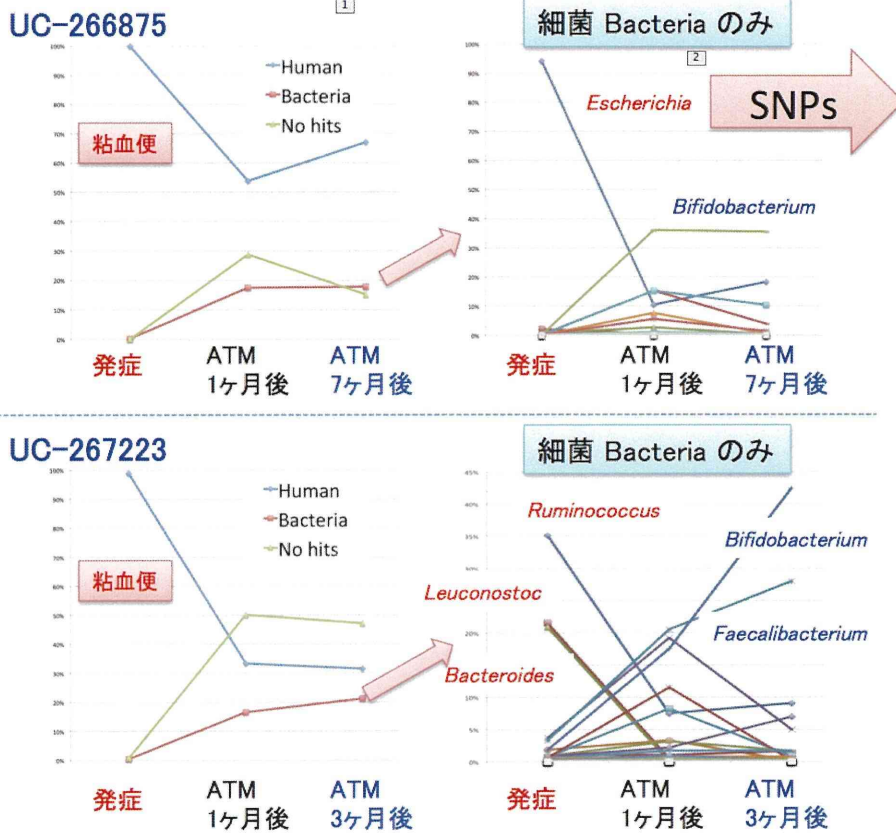


図3 UC患者(2名: UC-266875 と UC-267223)の患者便(発症、ATM治療1ヶ月後、ATM治療3-7ヶ月後)の細菌フローラを16S-rDNA配列の網羅配列解読で解析した。属レベルで同定分類し、その存在比率を主成分分析にてプロットした。ATM治療前(before ATM)で多く存在し、治療後に顕著に減少・増加した細菌を抽出した。

メタゲノクスによる細菌フローラ解析



大腸菌 *Escherichia coli* 発症時に UMN026 と同じ系統の *E. coli* が大多数

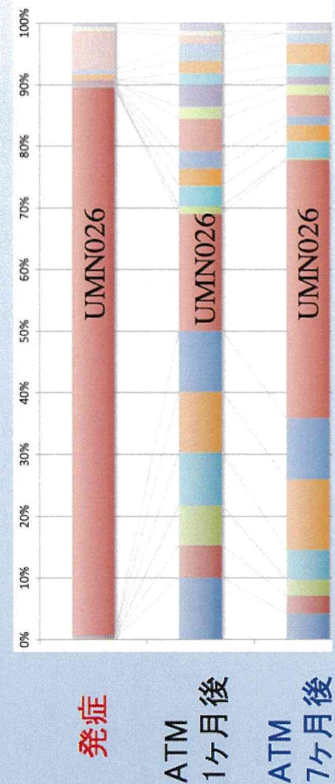


図4 UC患者(2名: UC-266875 と UC-267223)の患者便(発症、ATM治療1ヶ月後、ATM治療3-7ヶ月後)の細菌フローラをメタゲノム解析として網羅配列解読を行った。塩基レベルで相同性解析 (blastn) した結果を属レベルで同定分類した。ATM治療前(before ATM)で多く存在し、治療後に顕著に減少・増加した細菌を抽出した。

発症時は粘血便であり、網羅解読の結果が示すように99%近くの解読リードがヒト配列であった。ATM治療により寛解が維持されていることを示唆するように、便中の細菌DNA量(解読リード数)が20%程度まで増加していた(左図ラインプロット)。寛解維持に伴い、腸内環境を改善する *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* の増加が顕著であり、腸内フローラが健常に近づきつつあるように考えられる。ATM治療により消失する細菌がUC発症の増悪因子と想定される。患者2名の発症時の様子は異なっており、UC-266875の便の細菌の95%が大腸菌であり、UC-267223では *Bacteroides*, *Leuconostoc* が顕著であった(中央図ラインプロット)。UC-266875便の大腸菌は、菌株の固有SNPsを利用して具体的な株系統に分類した(右図縦グラフ)。発症時は腸管外大腸菌 ExPEC の系統に属する UMN026 株と同等の菌株が有意に存在し、ある特定の大腸菌株が腸内で大量に増殖していることが推察された。ATM治療による寛解に伴い、健常フローラと同様の多様な系統の大腸菌の割合に変動していることが分かった。一方、UC-266875便は *Bacteroides*, *Leuconostoc* が顕著であり UC-266875 とは異なるが、*Leuconostoc* の菌数の減少が UC-266875 でも認められることから、共通する候補の可能性はある。

メタゲノムによる細菌フローラ解析・主成分分析

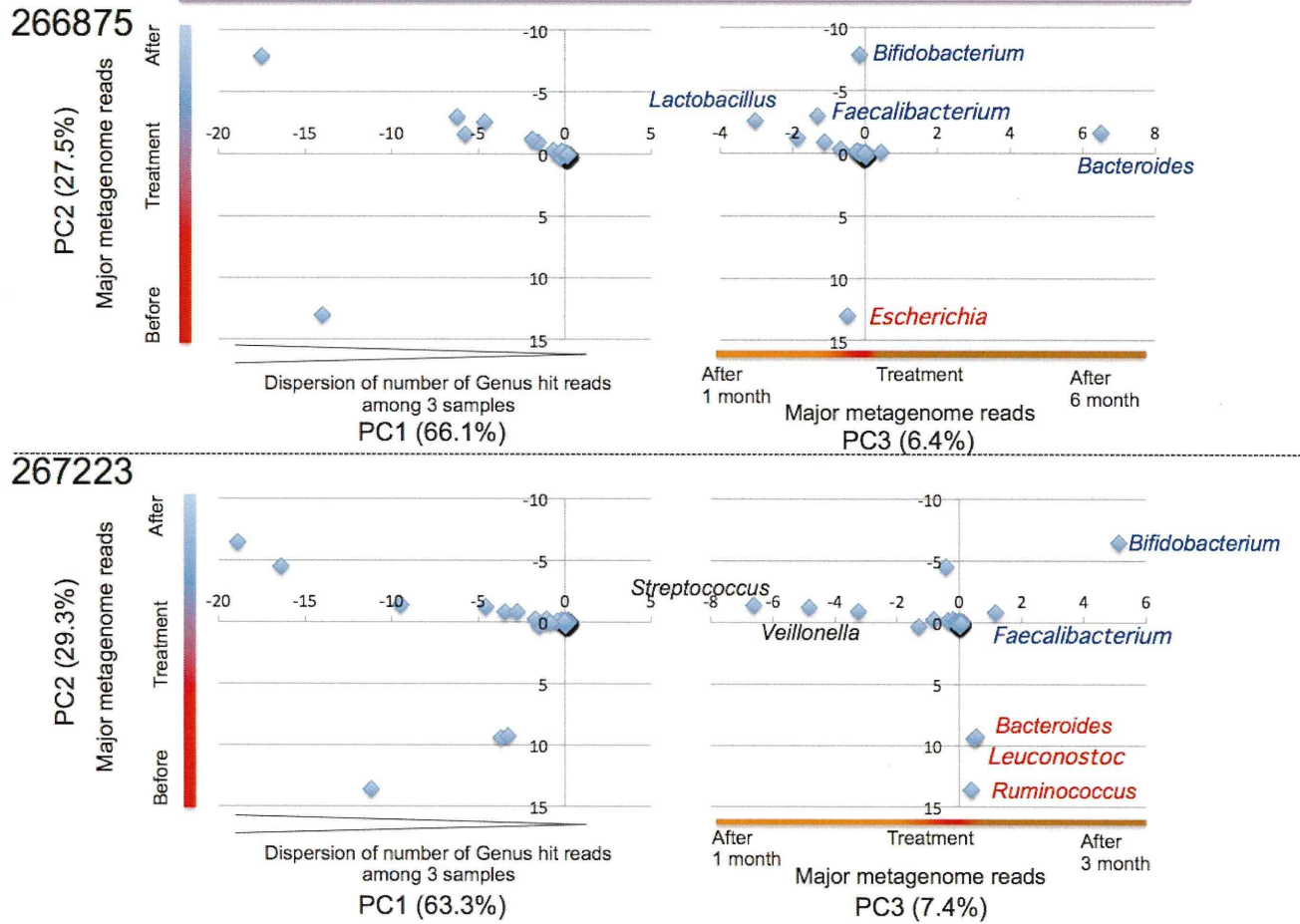


図5 UC患者(2名: UC-266875 と UC-267223)の患者便(発症、ATM治療1ヶ月後、ATM治療3-7ヶ月後)の細菌フローラをメタゲノム解析として網羅配列解読を行った。図4で得られた結果を主成分分析にてプロットした。ATM治療前(before ATM)で多く存在し、治療後に顕著に減少・増加した細菌を抽出した。

