

201225022.9-5
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24年度 研究報告書
及び
平成22～24年度総合研究報告書

平成25年3月

研究代表者

黒田 誠

(国立感染症研究所)

平成24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 (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。

平成23年度はUC患者2名の発症時および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。本年度はATM治療に代わりAFM (アモキシシリン/フォスфоマイシン/メトロニダゾール) 治療を受けたUC患者6名の治療前後の腸内フローラ解析を行った。メタゲノム解析とLEfSe法による統計解析にてAFM治療前後で大腸菌が有意に検出され、昨年度のATM治療患者と類似した結果が得られた。大腸菌の中でも具体的な病原性を示す大腸菌系統であるかどうか、ゲノムワイド塩基多型にて系統分類した結果、食中毒で頻繁に検出される大腸菌とは異なり、ある特有の偏った大腸菌系統株が増殖しやすい環境であることが示唆された。AFM治療によって健常時のような多様な系統の大腸菌群が検出されていることから、菌叢の多様性がUC寛解に貢献しているものと推察された。

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。また、テトラサイクリンに代えてフォスфоマイシンのほうが副作用が少ないという観点か

らAFM治療 (アモキシシリン/フォスфоマイシン/メトロニダゾール) においても治験が行われ、ステロイド離脱が見られることから有効な治療法の一つと考えられている。しかしながら、その患者腸管内の膨大な細菌叢の中で、どの細菌が抗菌薬により減少して疾患増悪をおさえているのかは未だ不明である。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23年度に引き続き、AFM治療を施したUC患者6名の治療前後における自然排泄便を得た（研究協力者：大草敏史：東京慈恵会医科大・柏病院）。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。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 megablast 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 NCBI non-redundant nt データベースを用いた。MEGAN ver4.7 を用いて細菌種の分類を行い、該当する細菌の解読リード本数から検出率を算出した。統計的に UC 発症に関連する細菌群を抽出するために、LEfSe 統計処理 (Segata. et al, Genome Biol. 12, R60, 2011) を用いた（図3）。

（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) AFM 治療前後で有意に検出される腸内細菌の同定

AFM 治療を受けた UC 患者 6 名の自然排泄便（-, 発症時；2w, AFM 治療 2 週後；1m, AFM 治療 1 ヶ月後）のメタゲノム解析を行った。サンプルあたり、300 万本～3000 万本の解読リードを得た。塩基レベルで相同性解析した結果を細菌属レベルで分類した（図2）。一見して AFM 治療前の発症時には大腸菌 *Escherichia coli* の検出率が高く、UC 患者 6 名のうち患者 B 以外の 5 名から検出された。AFM 治療

により患者 D 以外の 4 名で検出率が大幅に減少し、AFM 治療効果と UC 寛解との関係性が示唆された。

統計的に有意に UC 発症に関連する細菌群を抽出するために、LEfSe 統計処理 (Segata. et al, Genome Biol. 12, R60, 2011) を用いた（図3）。Non-parametric 検定と Linear discriminant analysis による統計解析法であり、群間で共通して変動する因子を特定する統計手法である。今回、AFM 治療前後の 2 群比較において、症状に起因する腸内細菌群を同定するために使用した。LEfSe 法により、6 名の抗菌薬 AFM 治療の前後で、大腸菌 *Escherichia coli* が有意に検出された（図4）。

LEfSe 解析結果から大腸菌 *E. coli* のみを抽出して表示した。6 名中 4 名で大腸菌 *E. coli* は治療前において有意な存在量を示し、潰瘍性大腸炎に何らかの要因となっている可能性が示唆された（図5）。

2) UC 患者から検出された大腸菌のゲノムワイド系統分類

大腸菌にも 0157 を代表とする腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli*: EHEC) や、病原性大腸菌 (enteropathogenic *E. coli*: EPEC) などに分類され、病原性が異なる大腸菌の系統が複数知られている。そこで、同じ大腸菌の中でも具体的な病原性を示す大腸菌系統であるかどうか、ゲノムワイド塩基多型にて検討し分類を試みた。

株毎にゲノム上に異なる塩基 (SNVs, single nucleotide variations) を有し、個人特定のように細かく系統分類することが可能である。そこで、メタゲノム解読により得られた解読リードを各種大腸菌株 (計 21 株, 図6) のゲノム配列にリードマッピングし、どの系統群に類する大腸菌株が便中に含まれていたのか検討した。

大腸菌 EHEC および EPEC 食中毒では食中毒に直接関連した大腸菌系統のみ顕著な量として検出された（図6： EHEC は赤バー、EPEC はピンク・バー）。AFM 治療後や他ケースコントロールと比較して、治療前ではある特有の偏った大腸菌系統株が増殖しやすい環境であることが示唆された。治療によって多様な系統の大腸菌群が検出されていることから

も健常フローラに近づきつつある、つまり、菌叢の多様性が UC 寛解に貢献しているものと推察された。

D. 考 察

昨年度 (H23 年度) の成果で、ATM 治療前の急性期便から大量に大腸菌が検出される患者がおり、ATM 治療において健常な腸内細菌フローラに近づきつつ有ることを示した。本年度は 6 名の UC 患者の自然排泄便を検体にして AFM 治療前後の腸内細菌フローラを解析し、昨年度と同様に大腸菌が有意に検出率され、UC 発症になんらかの因果関係を示唆するデータを得た。

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、あ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。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。

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、UC 患者はその多様性をなくした腸内細菌フローラであると考えられる。

ステロイド治療も無効な抵抗性 UC 患者には ATM および AFM 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

コッホの 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。このよう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 の発症機序を腸内細菌叢側から理解することを目的としている。本年度は 6 名の UC 患者の AFM 治療前後の排泄便から UC 発症に関連する細菌の同定を試みた。UC 発症時は大腸菌などが優勢に検出され、*dysbiosis* といわれる健常バランスが乱れた腸内細菌フローラになっていることを明らかにした。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

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

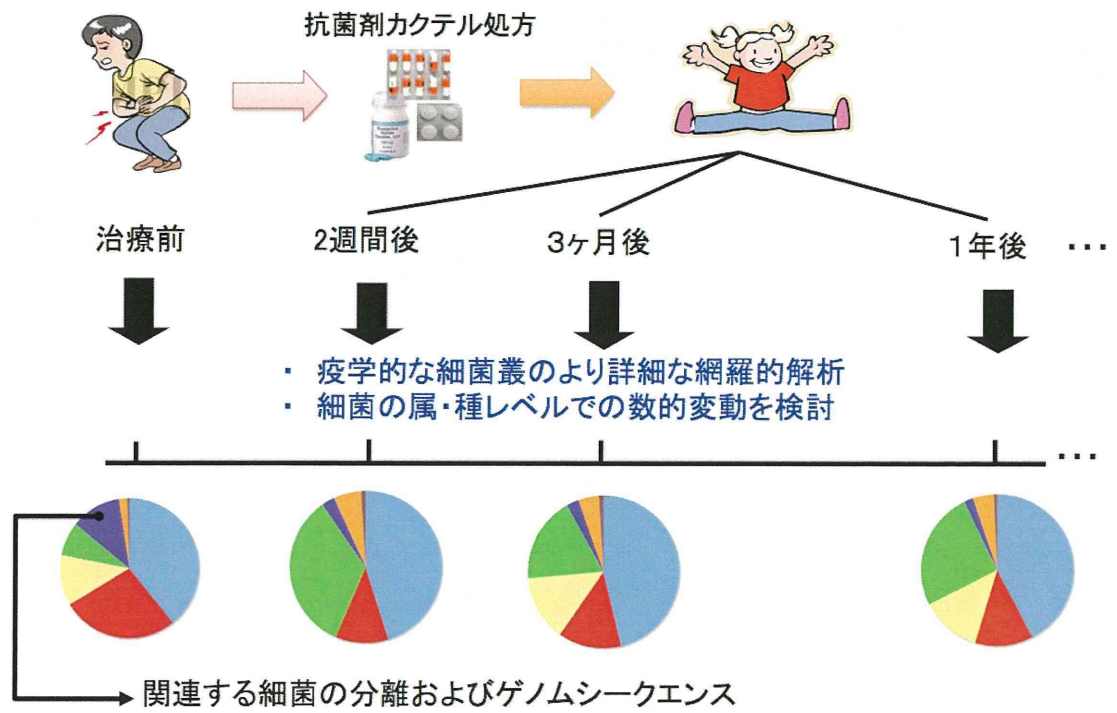


図1 研究計画の流れ図

AFM治療における便フローラの組成分析 (TetracyclineからFosfomycinに治療薬変更)

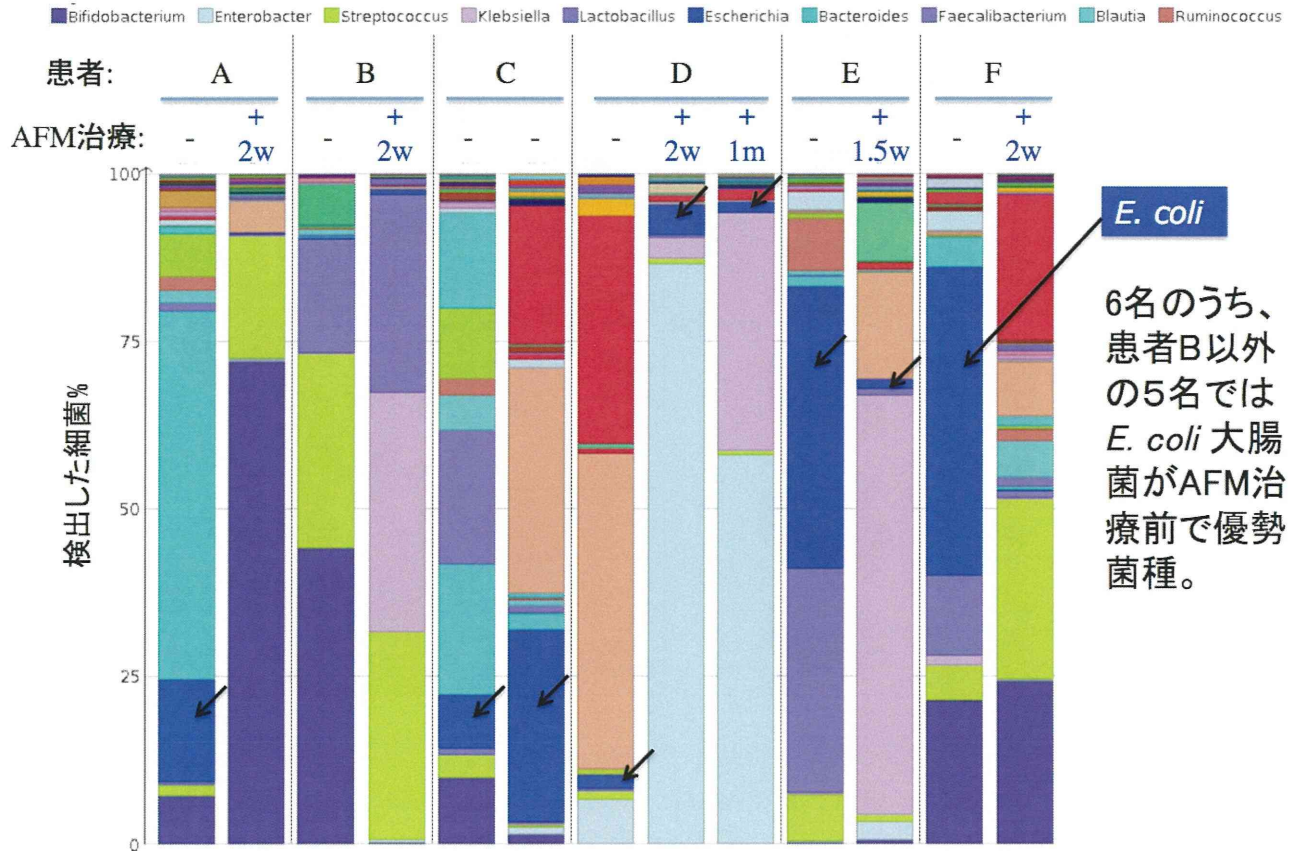


図2 AFM治療を受けたUC患者6名の自然排泄便(-, 発症時; 2w, AFM治療2週後; 1m, AFM治療1ヶ月後)のメタゲノム解析を行った。塩基レベルで相同性解析した結果を細菌属レベルで分類した。一見してAFM治療前の発症時には大腸菌 *Escherichia coli* の検出率が高く(青バー、矢印)、UC患者6名のうち患者B以外の5名から検出された。AFM治療により患者D以外の4名で検出率が大幅に減少し、AFM治療効果とUC寛解との関係性が示唆された。

LefSe (Segata. et al, Genome Biol. 12, R60, 2011)
Non-parametric検定とLinear discriminant analysisによる統計解析法。

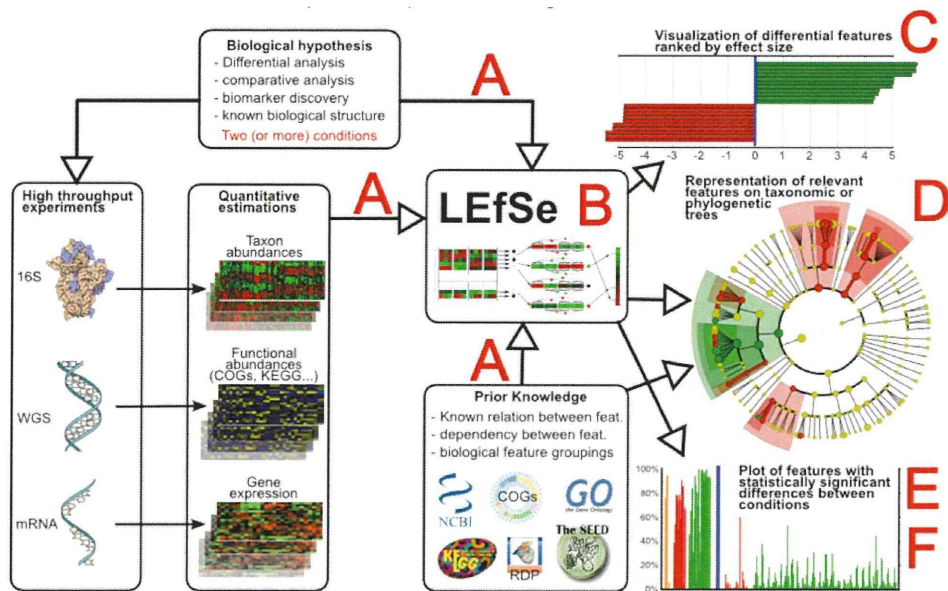


図3 LefSe 法の概要 (Segata. et al, Genome Biol. 12, R60, 2011)。

Non-parametric 検定と Linear discriminant analysis による統計解析法。

AFM 治療前後の 2 群比較において、症状に起因する腸内細菌群を同定するために使用した。

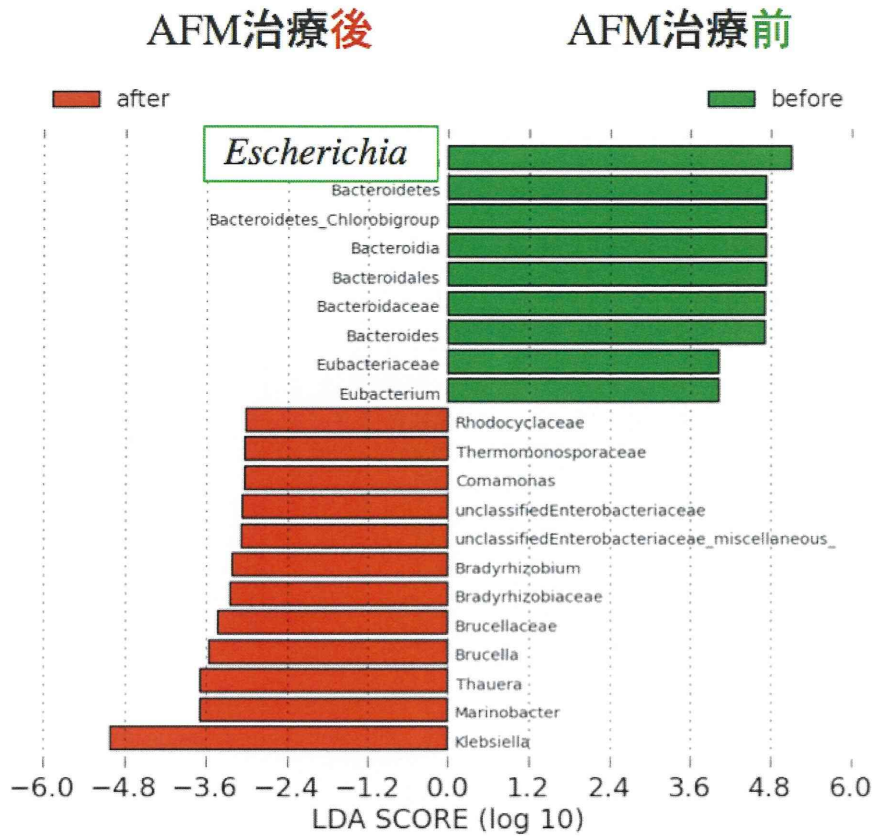


図4 LefSe 法により、6名の抗菌薬 AFM 治療の前後で有意に変動する細菌属を抽出した。治療前において大腸菌 *Escherichia coli* が有意に検出された。

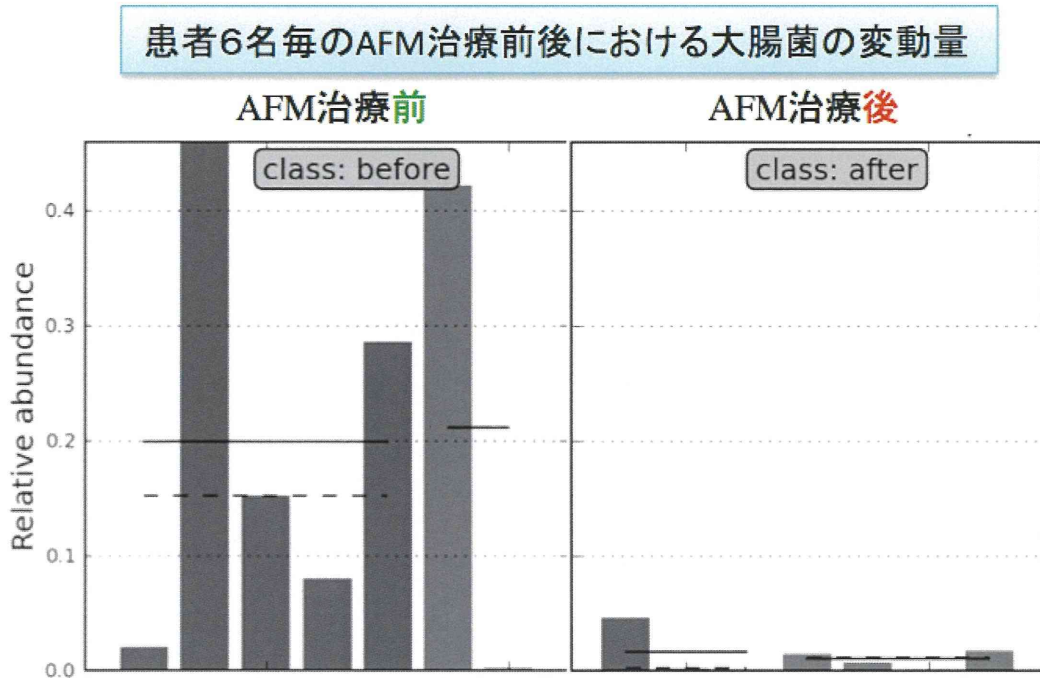


図5 LefSe 解析結果から大腸菌 *E. coli* のみを抽出して表示した。6名中4名で大腸菌 *E. coli* は治療前において有意な存在量を示し、潰瘍性大腸炎に何らかの要因となっている可能性が示唆された。

AFM治療前後で検出された大腸菌のゲノムワイドSNPs系統分類 (コントロールに食中毒等の腸管疾患を含む)

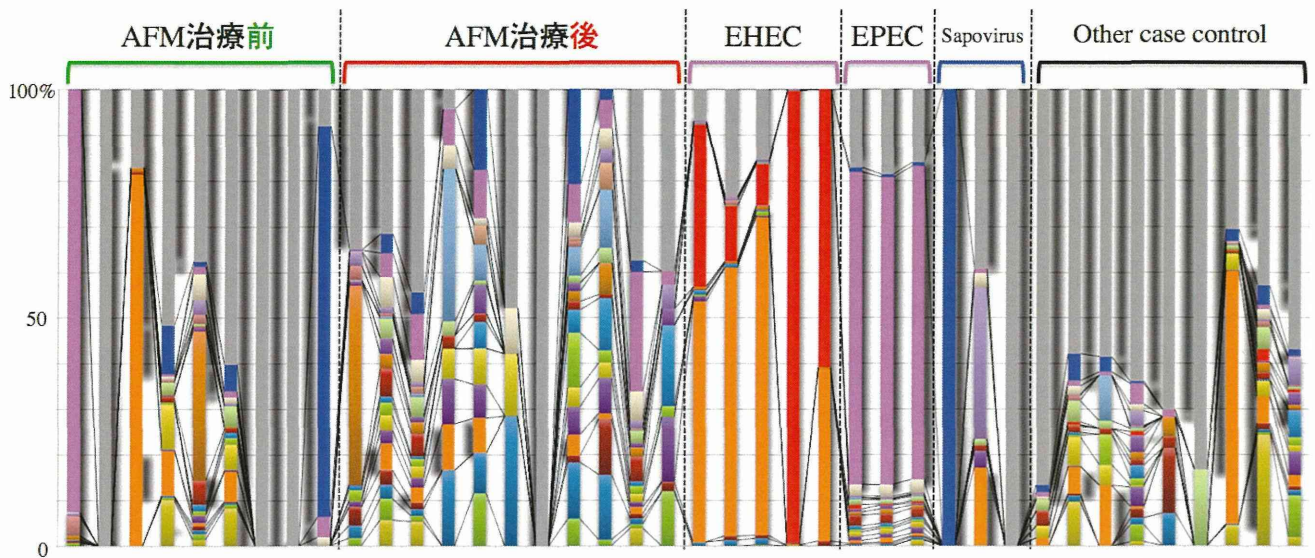


図6 同じ大腸菌の中でも株毎にゲノム上に異なる塩基 (SNVs, single nucleotide variations) を有し、個人特定のように細かく系統分類することが可能である。そこで、メタゲノム解読により得られた解読リードを各種大腸菌株 (計21株, 下表参照) のゲノム配列にリードマッピングし、どの系統群に類する大腸菌株が便中に含まれていたのか検討した。大腸菌 EHEC および EPEC 食中毒では食中毒に直接関連した大腸菌系統のみ顕著な量として検出された (EHEC は赤バー、EPEC はピンク・バー)。AFM 治療後や他ケースコントロールと比較して、治療前ではある特有の偏った大腸菌系統株が増殖しやすい環境であることが示唆された。治療によって多様な系統の大腸菌群が検出されていることから健康フローラに近づきつつある、つまり、菌叢の多様性が UC 寛解に貢献しているものと推察された。

大腸菌・系統群

536
55989
ATCC_8739
BL21_Gold_DE3-b_rel606
CFT073
e24377a
ED1a
HS_8739
IAI1
IAI39
K12
O103_H2_12009
O111
O127_H6_E2348_69
O157
O26
O55
SE11
sms_3_5
UMN026
UT189-APEC-S88

本研究計画のまとめ

難病・潰瘍性大腸炎の原因は不明である。
～抗炎症治療による対処療法しかない～



抗菌薬治療で奏功する症例報告がある。(3割程度)
～病因論を感染症として探る～



抗菌薬処方前後の細菌フローラの変動解析(次世代シーケンサー)

- UC発症時において、非常に偏った細菌フローラである。
(単一の系統に集約している。多様性が失われている)
- 抗菌薬治療により、減衰した細菌種を特定できた。
(*Bacteroides*, *Leuconostoc*, *Escherichia coli* 等)



潰瘍性大腸炎患者の根治療法を目指した病因論解明

