慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	腸肝指向性腸内細菌と肝臓内免疫応答を介した原発性硬化性胆管炎の進展機序の解明
Sub Title	Role of gut microbiota in the pathogenesis of primary sclerosing cholangitis
Author	中本, 伸宏(Nakamoto, Nobuhiro) 須田, 亙(Suda, Wataru) 福田, 真嗣(Fukuda, Shinji) 褚, 柏松(Chu, Po-Sung) 谷木, 信仁(Taniki, Nobuhito) 寺谷, 俊昭(Teratani, Toshiaki)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	PSC患者由来糞便微生物を無菌マウスに移入したヒトフローラ化マウス (PSCUCマウス)において肝臓内TH17細胞の増加を認め、同マウスの腸間膜リンパ節からKlebsiella pneumonia (KP)、Proteus mirabilis (PM)、Enterococcus gallinarum (EG) のbacterial translocation (BT)誘導菌3菌を分離した。定量PCRの結果、上記BT誘導菌はPSC患者の糞便中に高率に検出され (PSC/UC患者18名中17名で検出)、腸管病変を有するPSCの診断マーカー、および治療標的として有用である可能性が示唆された。 Primary sclerosing cholangitis (PSC) is a chronic inflammatory liver disease and its frequent complication with ulcerative colitis highlights the pathogenic role of epithelial barrier dysfunction. Intestinal barrier dysfunction has been implicated in the pathogenesis of PSC, yet its underlying mechanism remains unknown. Here, we identify Klebsiella pneumonia in the microbiota of PSC patients and demonstrate that K. pneumoniae disrupts the epithelial barrier to initiate bacterial translocation and liver inflammatory responses. Gnotobiotic mice inoculated with PSC-derived microbiota exhibited T helper (Th) 17 cell responses in the live . Bacterial culture of mesenteric lymph nodes in these mice isolated K. pneumoniae, Proteus mirabilis, and Enterococcus gallinarum, which were prevalently detected in PSC patients. These results highlight the role of pathobionts in intestinal barrier dysfunction and liver inflammation, providing insights into therapeutic strategies for PSC.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K09374 研究分野：消化器内科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K09374seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

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　元 年　 ６ 月　 ４ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ０９３７４

研究課題名（和文）腸肝指向性腸内細菌と肝臓内免疫応答を介した原発性硬化性胆管炎の進展機序の解明

研究課題名（英文）Role of gut microbiota in the pathogenesis of primly sclerosing cholangitis

研究代表者
中本　伸宏（NAKAMOTO, NOBUHIRO）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：４０３８３７４９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：PSC患者由来糞便微生物を無菌マウスに移入したヒトフローラ化マウス(PSCUCマウス)において肝臓内TH17細胞の増加を認め、同マウスの腸間膜リンパ節からKlebsiella pneumonia (KP)、Proteus mirabilis (PM)、Enterococcus gallinarum (EG) のbacterial translocation (BT)誘導菌3菌を分離した。定量PCRの結果、上記BT誘導菌はPSC患者の糞便中に高率に検出され(PSC/UC患者18名中17名で検出)、腸管病変を有するPSCの診断マーカー、および治療標的として有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
原発性硬化性胆管炎(Primary Sclerosing Cholangitis; PSC)は肝臓内外の胆管に障害を認め胆汁うっ滞をきたす原因不明の自己免疫性疾患である。本邦における総患者数は約2,000名と推計され今後患者数の増加が予想される。高率に肝硬変への進展、胆管癌の合併を認め、肝移植以外に根本的な治療法が存在せず新規治療法の開発が待たれている。本研究課題の成果により、PSC患者に効率に存在する腸内細菌が病態の発症、および進展に寄与する可能性が示唆された。また、PSCの新規バイオマーカー、また治療標的としての有用性も期待され、学術的、社会的に大きな意義を有する成果と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Primary sclerosing cholangitis (PSC) is a chronic inflammatory liver disease and its frequent complication with ulcerative colitis highlights the pathogenic role of epithelial barrier dysfunction. Intestinal barrier dysfunction has been implicated in the pathogenesis of PSC, yet its underlying mechanism remains unknown. Here, we identify Klebsiella pneumonia in the microbiota of PSC patients and demonstrate that K. pneumoniae disrupts the epithelial barrier to initiate bacterial translocation and liver inflammatory responses. Gnotobiotic mice inoculated with PSC-derived microbiota exhibited T helper (Th)17 cell responses in the live . Bacterial culture of mesenteric lymph nodes in these mice isolated K. pneumoniae, Proteus mirabilis, and Enterococcus gallinarum, which were prevalently detected in PSC patients. These results highlight the role of pathobionts in intestinal barrier dysfunction and liver inflammation, providing insights into therapeutic strategies for PSC.

研究分野：消化器内科

キーワード：原発性硬化性胆管炎　腸内細菌

１．研究開始当初の背景

原発性硬化性胆管炎(Primary Sclerosing Cholangitis; PSC)は肝臓内外の胆管に障害を認め胆汁うっ滞をきたす原因不明の自己免疫性疾患である。本邦における総患者数は 2,300 名と推計され今後患者数の増加が予想され、国の難病特定疾患に認定されている。高率に肝硬変への進展、胆管癌の合併を認め、肝移植以外に根本的な治療法が存在せず新規治療法の開発が待たれている。PSC の病因として多くの遺伝的要因、免疫学的要因、環境的要因の関与が報告されているが病態の解明には至っていない。PSC は高率に炎症性腸疾患を合併することを特徴とし、一部の症例において抗生物質の投与により肝胆道系酵素の改善が認められることから、疾患特異的な腸内細菌が胆管–腸-肝臓を循環する免疫細胞との相互作用を介して PSC の病態に寄与することが予想される。近年の PSC 患者の大腸生検検体や糞便検体を用いた検討においても、健常人と比較して腸内細菌叢の種類や多様性が有意に低下していることや、特定の腸内細菌叢が増加していることが報告されている。

２．研究の目的

これらの背景、知見をもとに本研究において、疾患特異的腸内細菌が胆管–腸管–門脈–肝臓を経由する腸肝循環を介した肝臓内免疫細胞との相互作用により PSC 病態に寄与する、という仮説を疾患モデルマウス、患者臨床検体を用いた検討で検証する。さらにトランスレーショナル研究としてノトバイオート技術を用いたヒトフローラ化無菌マウスの検討を行い、疾患特異的腸内細菌叢の制御による PSC 進展抑制の可能性を探り、新規治療薬の開発を目指すことを目的とした。

３．研究の方法

(1)患者糞便検体を用いた腸内細菌の解析

(2)疾患腸内細菌移植ノトバイオートマウスの疾患感受性の検討

PSC 患者由来腸内細菌を無菌マウスに投与しノトバイオートマウスを作成し、肝臓、大腸、小腸をはじめとする各臓器における免疫細胞の誘導を検証した。さらに、上記ノトバイオートマウスの実験的肝障害・肝線維化の感受性、抗生剤投与による肝臓内免疫細胞誘導能の増強、減弱の有無を評価した。

４．研究成果

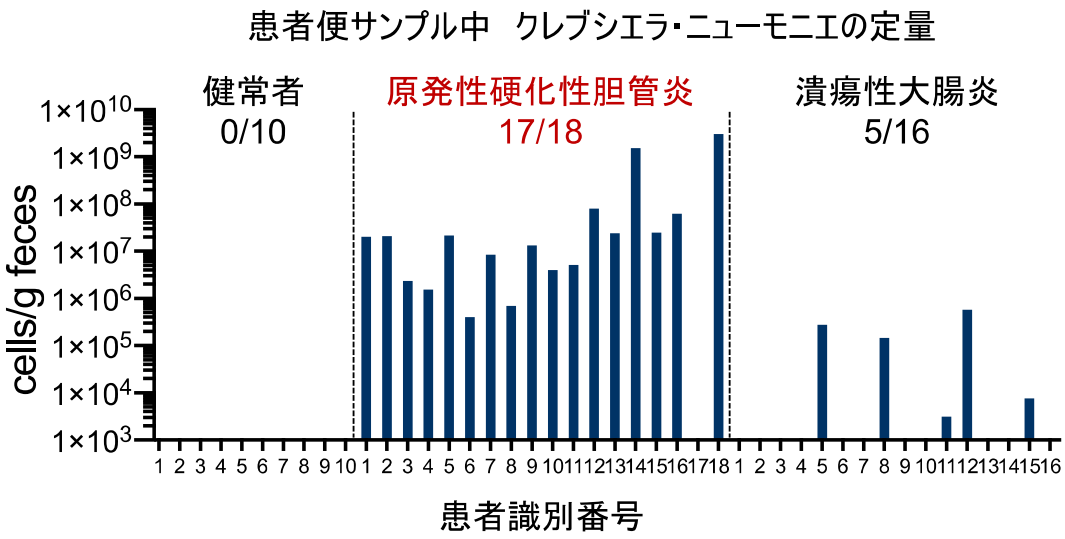
(1)当院に通院中の腸管病変を合併した PSC 患者 18 名について、糞便中の腸内細菌の 16S rRNA を用いたメタゲノム解析を行い、潰瘍性大腸炎(UC)患者および健常人コントロール(HC)と比較検討した。PSC 患者において健常人コントロールと比較して有意に腸内細菌叢の多様性が低く、また UniFrac 解析の結果、PSC 患者の糞便中の腸内細菌は UC、健常人と比較して類似度が異なる集団に属していた。さらに構成する各腸内細菌の解析の結果、PSC 患者において Proteobacteria(Phylum)、中でも Enterobacteriaceae(Family)が有意に増加していた。

(2)腸内細菌叢と免疫細胞との相互作用を明らかにするために、患者由来糞便微生物を無菌マウスに経口的に移植しヒトフローラ化マウスを作製し、移植 21 日後に小腸、大腸、肝臓、脾臓各臓器における免疫細胞の解析を行った。健常人由来糞便微生物を無菌マウスに移植した HC マウス、同様に UC マウス、PSC マウスいずれにおいても無菌マウスと比較して、大腸 IL-17 産生 T 細胞(Th17)数の有意な増加を認めた。一方 HC マウス、UC マウス、PSC マウス間で大腸 Th17 数の差は認められなかった。興味深いことに PSC マウスにおいて無菌マウス、HC マウス、UC マウスと比較して肝臓内 Th17 の増加を認めた。さらに PSC マウスは他のマウスと比較して 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC)投与により惹起した二次性胆管炎、肝線維化の増悪を認めた。本結果から PSC 患者腸内細菌に肝臓内免疫応答性 Th17 誘導に寄与する腸内細菌が存在する可能性が示唆された。

(3)PSC 患者由来糞便微生物を移植した PSCUC マウスの腸間膜リンパ節から Klebsiella pneumonia (KP)、Proteus mirabilis (PM)、Enterococcus gallinarum (EG) の bacterial translocation (BT)誘導菌 3 菌を分離した。EUB338 を用いた FISH 法により、上記 3 菌を移植したノトバイオートマウスにおいて SPF マウスで認められない菌の大腸上皮移行像を認めた。

(4)定量 PCR の結果、上記 BT 誘導菌 3 菌は PSC 患者の糞便中に高率に検出され(KP; PSC/UC: 17/18, UC: 5/16, HC: 0/10)、腸管病変を有する PSC の診断マーカー、および治療標的として有用である可能性が示唆された（次ページ図参照）。

(5)ヒト腸管上皮オルガノイドと腸内細菌の共培養の結果、PSC 患者由来 KP は上皮障害能を有することを見出した。興味深いことに PSC 患者以外のサンプルから分離した KP は大腸上皮に対する上皮障害能を有さず、本菌が腸管バリアの破壊、BT、肝臓 TH17 誘導を介して病態に寄与する可能性が示唆された。



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

(1)

著者名

Nakamoto N, Sasaki N, Aoki R, Miyamoto K, Suda W, Teratani T, Suzuki T, Koda Y, Chu PS, Taniki N, Yamaguchi A, Kanamori M, Kamada N, Hattori M, Ashida H, Sakamoto M, Atarashi K, Narushima S, Yoshimura A, Honda K, Sato T, Kanai T.

論文標題

Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver Th17 immune responses in primary sclerosing cholangitis

雑誌名

Nature Microbiology 2019 年 4 月号 492-503　DOI; 10.1038/s41564-018-0333-1

査読　有り

〔学会発表〕（計 1 件）

(1)

発表者名

Nobuhiro Nakamoto

発表標題

Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver Th17 immune responses in primary sclerosing cholangitis

学会名

EASL annual meeting 2019

発表年

2019 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：Pore-forming Klebsiella pneumoniae strains enriched in primary sclerosing cholangitis trigger bacterial translocation and pathogenic Th17 priming in the liver
発明者：中本伸宏
権利者：中本伸宏
種類：特許
番号：2018-082192
出願年：2018 年
国内外の別：　国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等
原発性硬化性胆管炎の病態に関与する腸内細菌を発見－腸内細菌を標的とした新たな治療法の開発に期待－ https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2019/1/15/28-50637/

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：須田　亙
ローマ字氏名：SUDA, Wataru
所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所
部局名：生命医科学研究センター
職名：副チームリーダー
研究者番号（8 桁）：20590847

研究分担者氏名：福田　真嗣
ローマ字氏名：FUKUDA, Shinji
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：政策・メディア研究科
職名：特任教授
研究者番号（8 桁）：80435677

(2)研究協力者
研究協力者氏名：褚　柏松
ローマ字氏名：CHU, Po-Sung

研究協力者氏名：谷木　信仁
ローマ字氏名：TANIKI, Nobuhito

研究協力者氏名：寺谷　俊昭
ローマ字氏名：TERATANI, Toshiaki

※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、研究者個人に帰属されます。