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

Title	宿主侵入菌に対する腸管免疫応答を介した消化器免疫難病の病態解明
Sub Title	Pathogenesis of gastrointestinal immune intractable diseases via the intestinal immune response to host invading bacteria.
Author	金井, 隆典(Kanai, Takanori) 寺谷, 俊昭(Teratani, Toshiaki) 三上, 洋平(Mikami, Yohei)
Publisher	
Publication year	2023
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	我々は肝臓免疫難病である原発性硬化性胆管炎(PSC)が潰瘍性大腸炎(UC)患者で頻発することに着目し、通性嫌気性細菌であるKlebsiella pneumoniae (KP)が、PSC患者の腸管内で異常増殖し、肝臓にTH17細胞を蓄積させることがPSC病態形成機序の中心であることを見出した。PSC患者由来KPを用いたノトバイオートマウスにおいて、DDC胆管炎を実験的に発症し、PSC/UCモデルの作成に成功した。PSC/UCマウス、リンパ節へ侵入しているKPの量と肝臓の線維化の程度が正比例することを明らかとし、KPを標的としたファージ療法がPSCを改善する可能性が示唆された。 We focused on the fact that primary sclerosing cholangitis (PSC) frequently occurs in patients with ulcerative colitis (UC) and found that Klebsiella pneumoniae (KP) is abundant in the gut of PSC patients. KP induced TH17 cells in the liver, which we showed is the central mechanism of PSC pathogenesis. The amount of KP invading the lymph nodes and the degree of fibrosis of the liver were positively correlated in PSC/UC mice, indicating that KP-targeted phage therapy may be a potential target for PSC pathology. phage therapy targeting KP may improve PSC.
Notes	研究種目：基盤研究 (A) (一般) 研究期間：2020～2022 課題番号：20H00536 研究分野：炎症性腸疾患
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20H00536seika

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　５ 年　 ５ 月 ３１ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(A)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｈ００５３６

研究課題名（和文）宿主侵入菌に対する腸管免疫応答を介した消化器免疫難病の病態解明

研究課題名（英文）Pathogenesis of gastrointestinal immune intractable diseases via the intestinal immune response to host invading bacteria.

研究代表者

金井　隆典（Kanai, Takanori）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：４０２４５４７８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　34,900,000円

研究成果の概要（和文）：我々は肝臓免疫難病である原発性硬化性胆管炎(PSC)が潰瘍性大腸炎(UC)患者で頻発することに着目し、通性嫌気性細菌であるKlebsiella pneumoniae (KP)が、PSC患者の腸管内で異常増殖し、肝臓にTH17細胞を蓄積させることがPSC病態形成機序の中心であることを見出した。PSC患者由来KPを用いたノトバイオートマウスにおいて、DDC胆管炎を実験的に発症し、PSC/UCモデルの作成に成功した。PSC/UCマウス、リンパ節へ侵入しているKPの量と肝臓の線維化の程度が正比例することを明らかとし、KPを標的としたファージ療法がPSCを改善す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
慢性免疫疾患と特定腸内細菌との因果関係を示し、その病態機序を解明することは重要である。そこで本研究は、嫌気性腸内細菌がリンパ節を介して生体内に侵入する特性を理解して、これまでの免疫疾患概念と異なり、これら細菌によって惹起される腸管内外の慢性免疫難病の病態形成機序の一端を解明した。これまで原因不明とされた免疫難病において、生体内侵入性腸内細菌による疾患発症機序を提唱するとともに、病因細菌特異的なバクテリオファージを用いた疾患発症・進展に関わる特定腸内細菌の排除を試み、慢性免疫難病の新規治療法の開発につながる基盤的研究成果を得た。

研究成果の概要（英文）：We focused on the fact that primary sclerosing cholangitis (PSC) frequently occurs in patients with ulcerative colitis (UC) and found that Klebsiella pneumoniae (KP) is abundant in the gut of PSC patients. KP induced TH17 cells in the liver, which we showed is the central mechanism of PSC pathogenesis. The amount of KP invading the lymph nodes and the degree of fibrosis of the liver were positively correlated in PSC/UC mice, indicating that KP-targeted phage therapy may be a potential target for PSC pathology. phage therapy targeting KP may improve PSC.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：炎症性腸疾患　潰瘍性大腸炎　原発性硬化性胆管炎　Klebsiella pneumoniae　バクテリオファージ

※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。

１．研究開始当初の背景

腸内細菌叢の乱れ（dysbiosis）が、近代化に伴い急増する腸管疾患および腸管外疾患(肥満、アトピー、肝硬変、自閉症など)の発症・進展因子であるが明示された。しかし、大半の研究は病態と腸内細菌との相関性を示すことを目的としており、胃潰瘍および胃がんの原因となるピロリ菌のようにヒト疾患病態を規定する腸内細菌の同定と細菌による病態形成機序の理解はあまり進んでいない。また、腸チフス症など感染症の病原菌とされる *Enterobacteriaceae* 科サルモネラ属細菌がリンパ節を介して体内に侵入することはよく知られているが、免疫難病の病態を決定づける生体内侵入性腸内細菌の存在と侵入細菌による病態形成機序の理解はほとんど進んでいなかった。

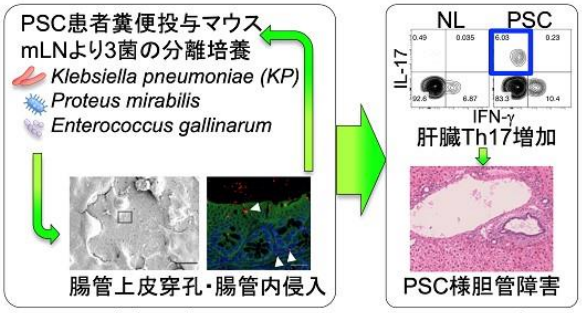


図 1: PSC 患者由来の KP は上皮を破壊、生体内に侵入し、肝臓の TH17 誘導を介して PSC 様の胆管炎を誘導する

これまで申請者らは、特定腸内細菌が腸管を経由して、肝臓および皮膚の生理機能を変化させることを証明した(Nakamoto, et al. *Cell Reports* 2018; Hayashi, et al. *Cell Reports* 2018(当教室からの論文は号、頁省略))。さらに、潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis; UC)に合併する原発性硬化性胆管炎(Primary Sclerosing Cholangitis; PSC)患者腸内で異常増殖する通性嫌気性菌 *Proteobacteria* 門 *Enterobacteriaceae* 科 *Klebsiella pneumoniae* が大腸上皮障害を惹起し、粘膜内さらに腸間膜リンパ節へと侵入することで肝臓に TH17 細胞を蓄積させて PSC 病態を形成することを明らかにした（Nakamoto, et al. *Nature Microbiology* 2019）(図 1)。一方、PSC を合併しない UC 患者の腸内には、リンパ節侵入性細菌は検出されなかった。従って、これまでの常識と異なり、本来腸内での存在が望まれない *Proteobacteria* 門細菌群が、腸管腔から生体内に侵入し、所属リンパ節内での免疫反応を誘導することが PSC をはじめとした腸管 dysbiosis 病の病態形成の本体であると示唆された。

この様に、腸間膜リンパ節に侵入する特性を有する細菌を分離培養し同定することは、各個体に無数に存在する腸内細菌から病因に直結する細菌を機能面から追求する極めて効率の良いスクリーニングシステムであるといえる。しかし、これまで「疾患特異的な体内侵入性腸内細菌」の観点から検討した報告は結核菌やサルモネラ菌の感染症領域では認められていたものの、PSC や IBD など免疫関連疾患においては不明な点が多い。

２．研究の目的

本研究課題の研究目的は、免疫機能異常が病因とされる免疫疾患群において、病変の首座を「病態の発症臓器」ではなく、「細菌が感染したリンパ節」とし、その病態形成機序の本質に迫ることである。

腸内細菌が腸管上皮構造・機能を破綻させ生体内に侵入し病態形成に関与するという考えは、腸チフス症など腸管病原性微生物による感染症では通念とされるが、この疾患概念を免疫機能異常が病因とされる免疫難病に当嵌める試みは極めて独自的であり、これまでのドグマへの挑戦といえる。実際に、強力な免疫統御療法が全く無効であるにも関わらず、免疫難病と位置付けられる疾患は数多ある。これらの疾患において、疾患特異的な嫌気性細菌が腸内で増殖し、腸管構造・機能を破綻させ、生体内への侵入・感染こそが病態形成の中心であると証明し、世界に先駆けて病因細菌の特異的排除による免疫難病治療法を提唱することは効率的な免疫制御を目指す上でも最重要課

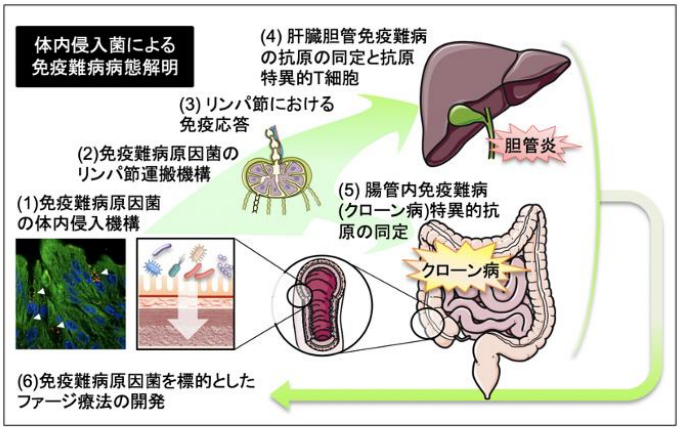


図2：疾患特異的体内侵入性腸内細菌 による疾患病態形成の解明フロー

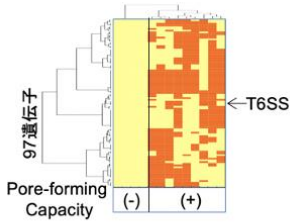
題と言える。
すでに、Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* は 2013 年に米国アメリカ疾病予防管理センター(CDC)から" Urgent threat to public health"と警告が発せられる現状を踏まえ、当教室で発見した PSC 病態責任細菌 *Klebsiella pneumoniae* を標的とした治療方針としては、従来の抗生剤による腸内細菌環境の破壊療法ではなく、バクテリオファージによる特異細菌除菌療法と糞便移植法の併用による、安全かつ効率的な治療法の確立を目指す。本事業で挙げられる成果は、免疫難病の根治を目指すだけでなく、耐性菌の蔓延を防止し、人類全体の利益に寄与する研究と言える。

３．研究の方法

「疾患特異的な体内侵入性腸内細菌」による消化管免疫疾患の病態解明のため、
(1)疾患特異的な体内侵入性細菌による腸管上皮破壊とリンパ節への感染
(2)リンパ節での免疫応答の解明
(3) 疾患特異的な侵入性細菌を特異的に排除するファージ療法の開発
を実施する。

４．研究成果

我々は先行研究より、PSC 患者腸内で増殖した通性嫌気性菌、*Klebsiella pneumoniae* (KP), *Proteus mirabillus* (PM), *Enterococcus gallineum* (EG)が、腸管上皮構造・機能を破綻させ、所属リンパ節に侵入し、肝臓内 TH17 細胞の蓄積を介して胆管炎病態を形成することを示した (Nakamoto N, et al. *Nature Microbiology* 2019) 。これら PSC 病態形成責任細菌 (KP, PM, EG)のうち、KP のみが腸管上皮破壊能を有しており、PSC 患者由来 KP(9 株)と非 PSC 患者(non-PSC)由来 KP(4 株)についてショットガン・メタゲノミクス解析を実施し、上皮障害の責任遺伝子候補として、VI 型分泌装置構成因子(T6SS)を含む 97 遺伝子を同定した(図 3)。BiomX 社(イスラエル)と共同で、ドイツ、フランス、イスラエル、ベルギー、カナダの PSC 患者糞便由来 KP 株を 200 株以上単離に成功し、これらから PSC 患者由来 KP を特異的に溶菌できる治療ファージ群のカクテルの作成に成功した(図 4)。



(T6SS: Type VI secretion system)
図3：Pore-forming KP 特異的遺伝子

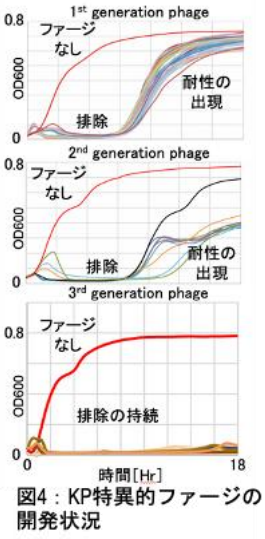


図4：KP特異的ファージの開発状況

これらの治療ファージカクテルの有効性をマウス PSC モデル(PSC 病態責任菌+タウロコール酸) で評価した。PSC 患者の胆管周囲に TH17 細胞が浸潤することが知られており(Katt, J. et al. ***Hepatology*** 58, 1084-1093) 、また、PSC 病態責任細菌として同定された 3 種の細菌は、肝臓内で TH17 細胞を蓄積させたことから、PSC 患者由来 3 種の菌に腸管膜リンパ節でプライミングされた TH17 細胞が、肝臓に移出し、腸管ではさらなる上皮破壊による KP の侵入を促進、肝臓では胆管障害を誘導すると考えられた。

実際に、ファージを投与した PSC モデルマウスにおいて、肝臓内の Sirius red 陽性で示される線維化の改善や、*Col1a1* 遺伝子発現の改善、さらに、*Tnf* や *Il1b* など炎症性サイトカインの改善を認めた。さらに、肝臓における IL-17 陽性 IFN-γ 陰性 TH17 細胞の優位な現象を認め(図 5)、ファージ療法は、KP が TH17 細胞を誘導して胆管炎を発症する炎症カスケードの上流に作用し、PSC の改善に寄与することが本検討より明らかとなった。

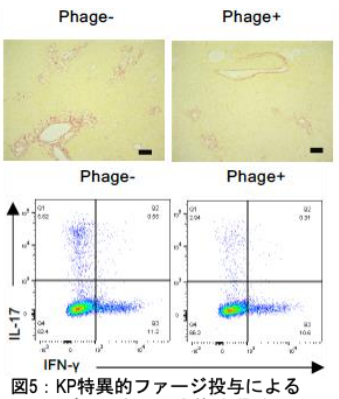


図5：KP特異的ファージ投与による PSCモデルマウスの改善(上段)とTh17 細胞の減少(下段)

我々が PSC の病態惹起性最近として同定した *K. pneumoniae* 細菌に関しては、本田賢也博士のグループが潰瘍性大腸炎患者の唾液から分離した *K. pneumoniae* 細菌が腸管 TH1 細胞を誘導すると報告しており (Atarashi K, et al. *Science* 2017, 358, 359-365)、本検討による知見は、PSC に限らず、*K. pneumoniae* を含む生体内侵入性腸内細菌が関与していると考えられる様々な免疫関連疾患や腫瘍性疾患への応用が期待される。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計6件（うち査読付論文　1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 Matsubara Yuta、Kiyohara Hiroki、Teratani Toshiaki、Mikami Yohei、Kanai Takanori	４．巻 205
２．論文標題 Organ and brain crosstalk: The liver-brain axis in gastrointestinal, liver, and pancreatic diseases	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Neuropharmacology	６．最初と最後の頁 108915～108915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuropharm.2021.108915	査読の有無 無
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 Kinouchi Kenichiro、Mikami Yohei、Kanai Takanori、Itoh Hiroshi	４．巻 80
２．論文標題 Circadian rhythms in the tissue-specificity from metabolism to immunity: insights from omics studies	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Molecular Aspects of Medicine	６．最初と最後の頁 100984～100984
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mam.2021.100984	査読の有無 無
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 Yoshimatsu Yusuke、Mikami Yohei、Kanai Takanori	４．巻 41
２．論文標題 Bacteriotherapy for inflammatory bowel disease	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Inflammation and Regeneration	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） 10.1186/s41232-020-00153-4	査読の有無 無
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 Iwata Kentaro、Mikami Yohei、Kato Motohiko、Yahagi Naohisa、Kanai Takanori	４．巻 41
２．論文標題 Pathogenesis and management of gastrointestinal inflammation and fibrosis: from inflammatory bowel diseases to endoscopic surgery	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Inflammation and Regeneration	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） 10.1186/s41232-021-00174-7	査読の有無 無
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 Yusuke Yoshimatsu, Yohei Mikami, Takanori Kanai	4．巻 41
2．論文標題 Bacteriotherapy for inflammatory bowel disease	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Inflammation Regeneration	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） 10.1186/s41232-020-00153-4.	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 Teratani Toshiaki、Mikami Yohei、Nakamoto Nobuhiro、Suzuki Takahiro、Kanai Takanori	4．巻 585
2．論文標題 The liver-brain-gut neural arc maintains the Treg cell niche in the gut	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Nature	6．最初と最後の頁 591～596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-020-2425-3	査読の有無 無
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4件（うち招待講演　3件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 金井隆典
2．発表標題 消化管疾患と神経の関わり
3．学会等名 日本消化管学会（招待講演）
4．発表年 2022年

1．発表者名 金井隆典
2．発表標題 腸内細菌情報を受信するLiver-brain-gut神経反射は腸管制御性T細胞を調整する
3．学会等名 日本自律神経学会総会（招待講演）
4．発表年 2021年

１．発表者名 金井隆典
２．発表標題 肝臓－脳－腸管迷走神経反射による腸管制御性T細胞産生機構の解明
３．学会等名 日本消化器病学会（招待講演）
４．発表年 2021年

１．発表者名 金井隆典
２．発表標題 腸内細菌による免疫・神経反射の臓器連関破綻によるヒト消化器免疫疾患の病態の解明
３．学会等名 第49回日本免疫学会学術集会
４．発表年 2020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	寺谷　俊昭 (Teratani Toshiaki) (40624408)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任准教授 (32612)	
研究分担者	三上　洋平 (Mikami Yohei) (80528662)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授 (32612)	

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