

報道関係者 各位

記 者 発 表 資 料
平成 28 年 9 月 30 日
済 生 会 横 浜 市 東 部 病 院
広 報 推 進 室 今 野 ・ 久 松
TEL 045-576-3000 内線 8213
E-mail:m_konno@tobu.saiseikai.or.jp

## 指定難病“原発性硬化性胆管炎”患者と健常者の腸内細菌叢の違いを発見

済生会横浜東部病院小児肝臓消化器科の十河剛（そごうつよし）副部長と元医員の岩澤堅太郎（いわさわけんたろう）（現在 済生会横浜市南部病院小児科）、および、早稲田大学理工学術院先進理工学研究科の服部正平（はっとりまさひら）教授らを中心とする共同研究グループ（#後述参照）は、小児期発症の原発性硬化性胆管炎（Primary sclerosing cholangitis: PSC）の患者と健常者および炎症性腸疾患の一つである潰瘍性大腸炎（Ulcerative colitis: UC）の患者の腸内細菌叢データの比較解析を行い、PSC の腸内細菌叢の菌種組成が UC とともに健常者とも異なり特徴的であることを明らかにしました。

PSC は、原因不明の指定難病で、肝内および肝外の胆道系の慢性炎症と線維化によって多発性の狭窄をきたし、最終的には胆汁性肝硬変に至る予後不良な肝疾患です。炎症性腸疾患を合併する事が高いことも知られていますが、日本の小児例では成人例よりその合併率が高いなど、異なる特徴を有しています。PSC の長期予後を改善することができる内科的治療法は開発されておらず、誰一の根本的治療法は肝移植ですが、移植後にも高率に PSC を再発します。さらに、PSC における生体肝移植は脳死肝移植に比して予後が非常に悪く、ドナー不足のため生体肝移植が多く行われている日本では、治療しようにもできないのが現状です。そのため、PSC の病態を把握し、内科的治療法を発見することが急務です。

全国から小児肝臓疾患患者さんが集まってくる済生会横浜市東部病院の小児肝臓消化器科を含めた、共同研究グループは、小児期発症の PSC の腸内細菌叢<sup>\*1</sup>の大規模なメタゲノム解析<sup>\*2</sup>を行いました。①健常者と比較して、PSC では *Streptococcus parasanguinis*、*Veillonella* sp. 3\_1\_44、*Enterococcus faecium*、*Enterococcus* sp. NBRC 107345 などの口腔内由来の細菌が増加していること、②PSC、UC の両群で *Parabacteroides distasonis*、*Anaerostipes hadrus*、*Blautia obeum* が健常者に比較して有意に低く、③PSC は UC と比較して、腸管保護作用がある酪酸産生菌である *Faecalibacterium* 属、*Ruminococcus* 属、*Roseburia* 属が有意に高いことが明らかとなりました。以上のような PSC の腸内細菌叢の特徴は病態発生に関連する可能性が示唆されました。

今回の成果は、まだ原因がわかっていない指定難病である PSC の腸内細菌叢が UC や健常者と比較して異なる事を明らかにしたもので、今後、腸内細菌叢に着眼した病態の解明や、新規治療の発見が期待されます。

本研究成果は、科学雑誌『Gut』（9月26日 online 版）に掲載されました。

論文名： Characterisation of the faecal microbiota in Japanese patients with paediatric-onset primary sclerosing cholangitis

<http://gut.bmj.com/content/early/2016/09/26/gutjnl-2016-312533.full>

### # 共同研究グループ

済生会横浜市東部病院小児肝臓消化器科（十河剛、及川愛里、梅津守一郎、乾あやの、藤澤知雄）

早稲田大学理工学術院先進理工学研究科（服部 正平）

済生会横浜市南部病院小児科（岩澤堅太郎）

東京医科歯科大学消化器内科（角田知之）

東京大学大学院新領域創成科学研究科（服部 正平、須田 亙）

慶應義塾大学医学部（須田 亙）

岡山大学農学部（森田 英利）

## ◆研究成果ダイジェスト

### 1. 背景

ヒトは出生から成人するまでに、体だけでなく腸管内も劇的に変化します。小児期、特に乳児期は生涯において最も劇的な腸内細菌叢の変化が起こる時期で、分娩形式（経膈分娩か帝王切開）、栄養（母乳栄養か人工栄養）、母子の相互関係などの因子が重要です。その後の離乳さらには固形食への食生活の変化により腸内細菌叢の多様性が増し、徐々に成人型の腸内細菌叢を獲得します。この消化管内での腸内細菌叢の不安定さが、小児期の免疫系の恒常性の不安定さを生み出し、さらには遺伝的要因、感染、ストレスなどのその他様々な因子も加わり、小児期特有の疾患を生み出している可能性が考えられます。我々は、腸内細菌叢との関連が示唆されてきた原発性硬化性胆管炎（Primary sclerosing cholangitis: PSC）の腸内細菌叢を、小児期発症症例に限って解析しました。

PSC は、肝内および肝外の胆道系の慢性炎症と線維化によって多発性の狭窄をきたし、最終的には胆汁性肝硬変に至る予後不良な肝疾患です。発症年齢の中央値は 30-40 歳代ですが、日本では、二峰性の年齢分布をとり、高齢者においても欧米にはみられないピークが存在します。PSC の長期予後を改善することができる内科的治療法はなく、唯一の根本的治療法は肝移植ですが、移植後にも高率に再発することが知られています。例えば、小児の報告では診断から肝移植までの中央値が 12.7 年で、肝移植後に 27%が再発したと報告されています。さらに、日本ではドナー不足のため生体肝移植が多く行われていますが、PSC における生体肝移植が脳死肝移植に比して予後が非常に悪い事も報告されています。そのため PSC の病態を把握し、内科的治療法を発見することが急務です。

PSC には潰瘍性大腸炎（Ulcerative colitis: UC）をはじめとする炎症性腸疾患を合併することが多く、肝移植前に大腸全摘を行った症例の方が、移植後再発率が低かったという報告や、PSC 患者に抗菌薬を経口投与した結果、血液検査で肝胆道系酵素値と肝組織所見に改善が見られたという報告もあります。これらの知見は、消化管の炎症や腸内細菌叢が PSC の病態や予後に関与している可能性を示しました。さらに、近年、成人の PSC 患者の大腸粘膜や糞便を用いた PSC の腸内細菌叢解析が報告され、健常人とは異なることが報告されてきました。しかし、小児期発症の PSC 患者の腸内細菌叢解析を行った報告はなく、日本における小児期発症 PSC の腸内細菌叢を、小児期発症 UC、健常小児と比較検討しました。

### 2. 研究手法と成果

腸内細菌叢のメタゲノム解析：本研究では、発症時年齢が 18 歳未満であった、PSC 患者（PSC 群）27 名（3~24 歳、男 19 名、女 8 名）、PSC を合併しない UC 患者（UC 群）16 例、および健常者（HC 群）23 例の 3 群の糞便から調製した腸内細菌叢の DNA を解析しました。次世代シーケンサー<sup>※3</sup>を用いて、被験者の細菌 DNA 配列（メタゲノム配列データ）を収集しました。この DNA 配列を参照ゲノムデータベースに相同検索することで、菌種の帰属や菌種組成等の細菌解析と、3 群間の比較解析を行いました。

#### 内服薬による腸内細菌叢への影響の検討：

最終解析の前に、内服による腸内細菌叢への影響を検討しました。サラゾスルファピリジン（SASP）は、その抗炎症作用を期待して、もともと UC や関節リウマチに対して古くから使用されてきた薬であり、消化管内で抗菌作用をもつスルファピリジンと抗炎症作用をもつメサラジンに代謝されます。我々は PSC 患者には、SASP が有効であるという報告に基づき、PSC の消化管病変に対して SASP を処方しています。この抗菌作用を持つスルファピリジンの腸内細菌叢への影響を考慮し、PSC 27 例を SASP 内服例と非内服例に分けて検討したところ、有意差を認めため、SASP を内服していた PSC 14 例と UC 1 例を除外した、PSC 13 例、UC 15 例、HC 23 例で最終検討を行いました。

### 原発性硬化性胆管炎の腸内細菌叢の比較解析

腸内細菌叢の菌種の種類数の指標となる Operational taxonomic units (OTU) 数や Chao1 では(図 1A)、PSC 群と UC 群の間に有意差が生じました。一方、腸内細菌の多様性の指標となる Shannon' s index では(図 1A)、PSC 群および UC 群と HC 群の間に有意差を認めました。続いて行った UniFrac 距離の主座標分析では(図 1B)、腸内細菌叢の類似度を視覚的に表示し、PSC 群は UC 群と HC 群のちょうど中間のような腸内細菌叢を形成することが明らかとなり、統計学的な有意差も認めました(図 1C)。これらの結果は PSC 群・UC 群はともに HC 群に比較して腸内細菌叢に変容が生じており、PSC 群と UC 群との間にも差があることを示唆しています。

### 原発性硬化性胆管炎の腸内細菌叢の菌の組成比

菌の属レベルでの 3 群それぞれの組成比の平均値で特に多かった 18 種類を解析したところ(図 2A)、3 群間で有意差を認めたのは 9 種類で、HC 群と比較して PSC 群、UC 群の両群で *Parabacteroides* 属は低下し、*Enterococcus* 属は増加していました。その他の 7 種類については UC と HC 間のみでの有意差でしたが、その中でも、UC 群と比較して PSC 群では *Faecalibacterium* 属、*Ruminococcus* 属、*Roseburia* 属が有意に高いことがわかりました。これらの 3 種類の菌属に属する菌種の多くは酪酸産生菌であり、腸管保護作用を持つ菌として知られています。一般に PSC 関連 IBD は、PSC を合併しない UC に比較して、炎症が軽微である事が知られていますが、これらの菌属の増加による酪酸産生の増加がその要因となっている可能性があります。

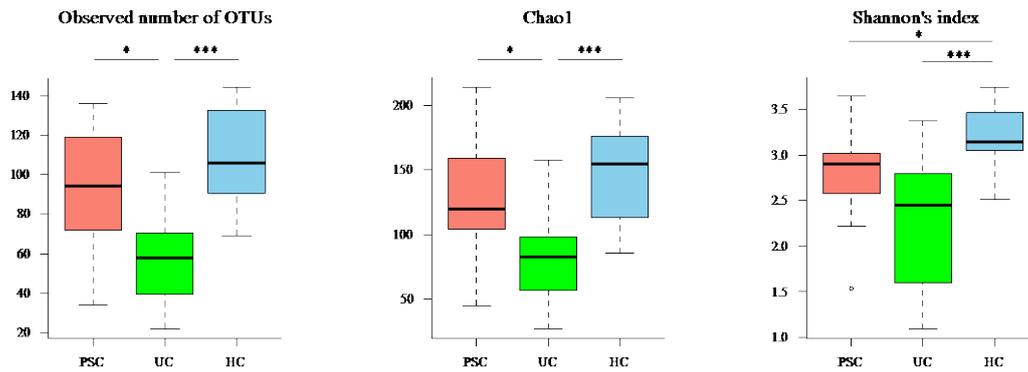
菌種レベルでの 3 群のそれぞれの組成比の平均値が 0.2%以上の菌種で、3 群間で有意差を認めたのは 16 種類でした(図 2B)。HC 群と比較して PSC 群、UC 群の両群で *Parabacteroides distasonis*、*Anaerostipes hadrus*、*Blautia obeum* は有意に低く、また、HC 群と比較して、PSC 群では *Streptococcus parasanguinis*、*Veillonella* sp. 3\_1\_44、*Enterococcus faecium*、*Enterococcus* sp. NBRC 107345 が増加しており、中でも *S. parasanguinis* は PSC 群と UC 群の間にも有意差があり、PSC 群に特異的に増加している菌種でした。成人例では、PSC 群における *Enterococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Veillonella* 属の増加は成人例でも報告されてきており、同様の傾向を認めています。今回 PSC 群にのみ特異的に増加していた *S. parasanguinis* を始めこれらの菌属の中に含まれる菌種が小児期発症の PSC の発症にかかわっていることが示唆されます。

### 今後の展開

本研究では、小児期発症の PSC と UC 及び HC との 3 群比較の結果、PSC では腸内細菌叢の変容を生じ、UC とも HC とも異なる腸内細菌叢を形成していることがわかりました。IBD を合併する事が多い PSC がありますが、UC の腸内細菌叢との違いの中に、PSC の病態解明につながるヒントが隠されている可能性があります。今後、さらなる症例の蓄積を行い病態解明および新しい治療法の開発につなげていくことが望まれます。

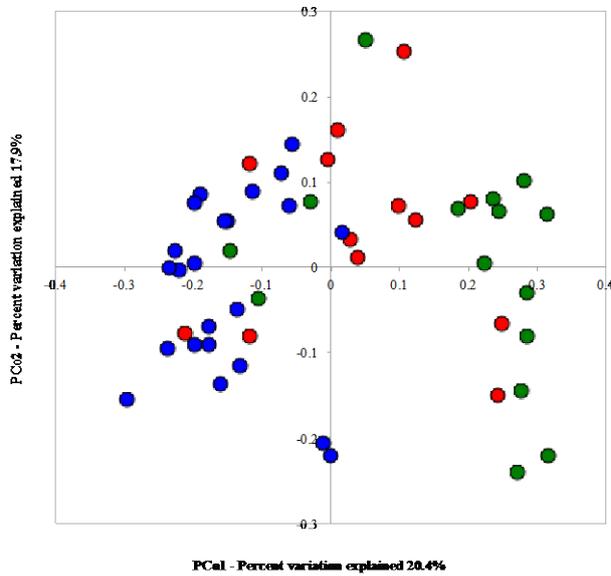
☒ 1

(A)



(B)

UniFrac PCoA P1 vs. P2 (Unweighted)

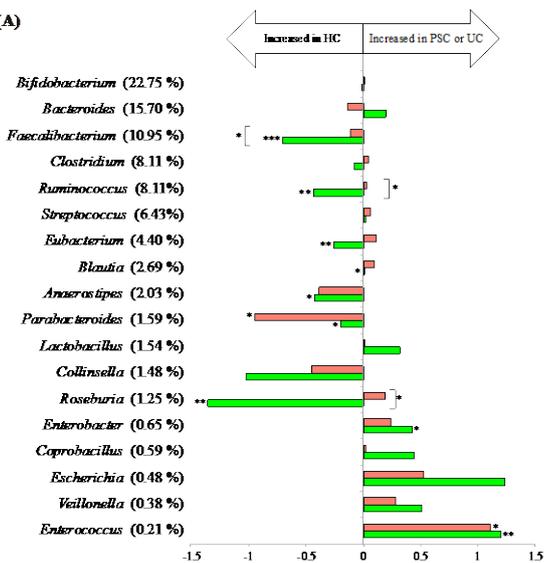


(C)

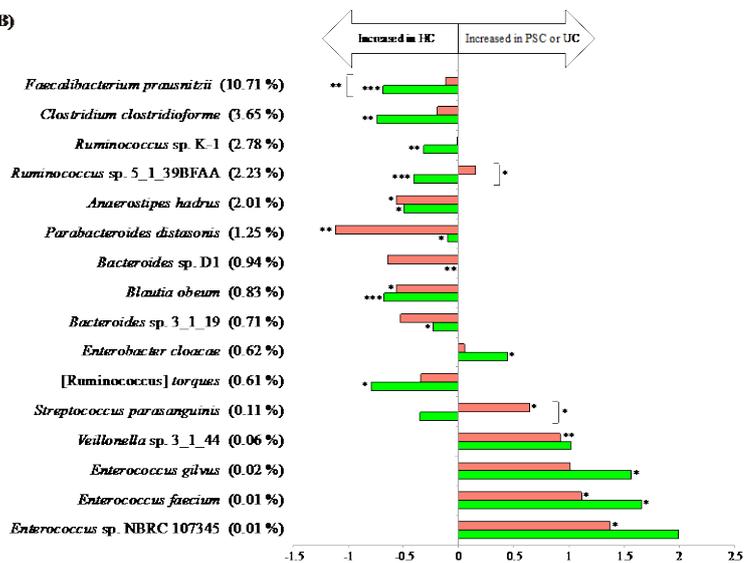
Category	No. subject	Unweighted UniFrac R <sup>2</sup>	P value
HC vs.PSC	HC: 23 PSC: 13	0.05561	<0.001
HC vs.UC	HC: 23 UC: 15	0.09717	<0.001
PSC vs.UC	PSC: 13 UC: 15	0.0474	0.03696

☒ 2

(A)



(B)



### ※1 ヒト腸内細菌叢

ヒトの消化管には種類にして約 1,000 菌種、菌数にしてヒトの細胞数の約 10 倍の数百兆個にのぼる腸内細菌の集団（細菌叢）が生息しています。腸内細菌叢はヒトの健康と病気に関係することが知られています。

### ※2 メタゲノム解析

腸内細菌叢を 1 つの有機体としてとらえてその DNA 情報から全体構造を明らかにする手法。メタゲノム解析には 2 つの方法があります。細菌のゲノム・遺伝子配列を網羅的に収集・解析する方法（狭義のメタゲノム解析）と、細菌の 16S リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子のみを解析する方法（16S 解析）です。前者からは細菌情報と遺伝子（＝機能）情報の両方が得られ、後者は細菌情報に特化した解析法です。今回は後者の解析手法を用いて両方法とも、大量の塩基配列データを情報学と統計学を駆使して解析します。

### ※3 次世代シーケンサー（Next Generation Sequencer; NGS）

DNA の塩基配列を自動的に解読する装置をシーケンサーと言います。2008 年頃より、従来のシーケンサー（ヒトゲノム計画 1991-2004 に使用）の～100 万倍の解読スピードをもつ種々の超高速シーケンサーが実用化され、これらを次世代シーケンサーと言います。

#### 【済生会横浜市東部病院の概要】

- 所在地 横浜市鶴見区下末吉三丁目 6 番 1 号
- 院長 三角 隆彦
- 病床数 560 床
- 横浜市地域中核病院・地域医療支援病院・災害医療拠点病院・救命救急センターなど
- ホームページ <http://www.tobu.saiseikai.or.jp/>