

170. 炎症性腸疾患腸内細菌叢パターンによる治療選択法樹立

高山 哲朗

*東海大学 医学部附属八王子病院／わたクリニック

Key words : 腸内細菌叢, 炎症性腸疾患, 潰瘍性大腸炎, 自己組織化マップ

緒 言

潰瘍性大腸炎、クローン病に代表される炎症性腸疾患はわが国で急増する疾患ながら未だ根本的な治療法の存在しない難治性疾患である。その原因には免疫の機能異常が大きく関与している。近年では腸内細菌叢の炎症性腸疾患の病態への大きな関与が相次いで報告されている¹⁾。著者らが過去にヒト腸管検体を用いて行った基礎研究では、クローン病において病態の鍵となっている CD14+マクロファージからの炎症性サイトカイン産生には菌刺激を要する事、更に、その刺激強度は菌種 (*E. coli*, *E. faecalis*) により異なる事を証明した²⁾。腸内細菌のバランスを改善する、いわゆるプロバイオティクスも注目を集め、凍結乾燥させた複数の細菌 (乳酸菌、ビフィズス菌、連鎖球菌) を含有した VSL3 は、活動性潰瘍性大腸炎に対する寛解導入の有用性も示された。近年では潰瘍性大腸炎患者に健常人の便を移入する便移植も行われ注目を集めている。

この様に関与が示唆されながら発症の鍵となる菌や治療標的となる菌の同定はなされていない。その理由として原因となる菌は一つではないこと、また患者により腸内細菌叢に差異がある事が挙げられる。すなわち、複数の種類、量の同時解析が解明に必須といえる。また、自然界における全ての事象は直線だけでは表せない非線形な関係にあることが知られており³⁾、従来の統計手法での解析は困難である。複数の菌が共存する腸内細菌叢と、個々に異なる背景をもつ患者情報の分類、これに基づく予測には非線形な関係も包含するアルゴリズムを用いることが適していると考えた。その手法として我々は人工ニューラルネットワーク (Artificial Neural Network System: ANN) とその一手法である自己組織化マップ (Self Organizing Map: SOM) を用いた。ANN はヒトの脳の神経伝達を模したシステムであり、既存データを学習することにより新規のデータに対する予測を行うことが可能なシステムである⁴⁾。複雑な情報による高次元データを人間が瞬時に理解することは困難である。SOM は高次元データを視覚的に理解する手助けを行う解析手法であり、傾向や相関関係の発見などに応用することが可能である。SOM は主にデータマイニングの1手法として、プロセス解析、制御、検索システムなど様々な分野に応用されている。我々は本手法を用いて各症例の腸内細菌叢のみのデータを用いて症例を分類し、治療効果や臨床的特徴と比較し相関の検証を試みた。

方 法

1. 対象

2014年11月から2015年12月までに東海大学医学部附属八王子病院を受診した潰瘍性大腸炎患者のうち同意を得られた症例113例。健常人コントロールとして年齢、性別、BMIを適合させた人間ドック受診者のうち同意の得られた117例。本研究は倫理委員会の承認を得た。

2. 腸内細菌叢の解析

腸内細菌叢の解析は T-RFLP 法を採用した。検体処理はテクノスルガ・ラボ (静岡) に委託した。

3. データ解析

SOM 解析は Visoscovery® SOMine version 5.0 (Eudaptics Software GmbH, Vienna, Austria) を使用した。各クラスター間の有意差検定は GraphPad Prism software version 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) を使用した。

*現所属：東海大学医学部附属八王子／予測医学研究所／わたクリニック

結果

1. 健常人と潰瘍性大腸炎患者腸内細菌叢の比較

まず我々は健常人及び潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢のみのデータを用いて SOM による解析を行った。各細菌の分類結果からヘリックス間の差の大きいところで境界を引くと C1 から C5 の 5 つのクラスターに分類された (図 1A)。各クラスターにおける健常人と潰瘍性大腸炎患者の割合は各クラスターにより異なっていた (図 2)。C2 と C4 では健常人が多く、C1 と C5 では潰瘍性大腸炎が多かった。C3 は両者がほぼ同数であった。

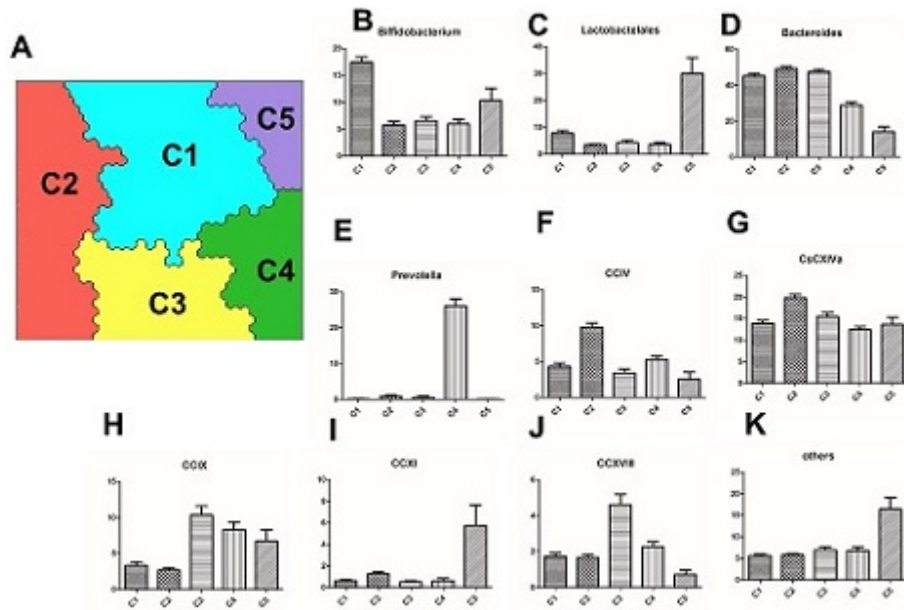


図 1. NL と UC の腸内細菌叢により分類されたクラスター

A) 分類されたクラスター (C1~C5)。B-K) 各クラスターにおける各細菌の割合。

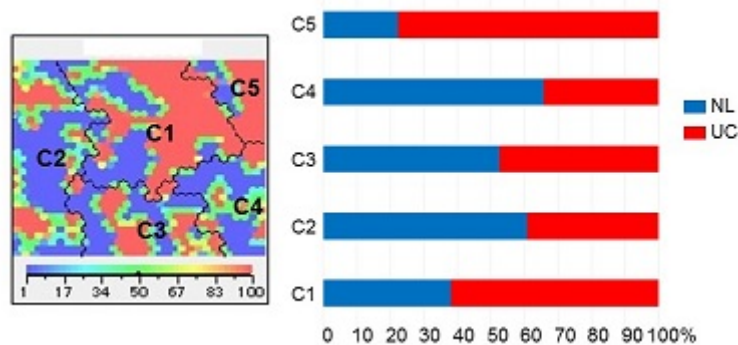


図 2. 各クラスターの UC の割合

左図は地図表記 (青: NL、赤: UC)。右図は各クラスターにおける割合。

2. 腸内細菌叢による潰瘍性大腸炎患者の分類

続いて我々は潰瘍性大腸炎患者のみの腸内細菌叢データを用いて SOM による分類を行った。各細菌の分類結果から 7 つのクラスターに分類された (図 3A)。C7 については 1 例のみであったため、統計学的解析からは除外した。各

クラスターにおけるパターンはそれぞれ異なるが、C4ではLactobacteralesが多く、Bacteroidesが少ないという特徴があり、C6ではPrevotellaが多いなどクラスターに特徴的な細菌もみられた（図3B-K）。

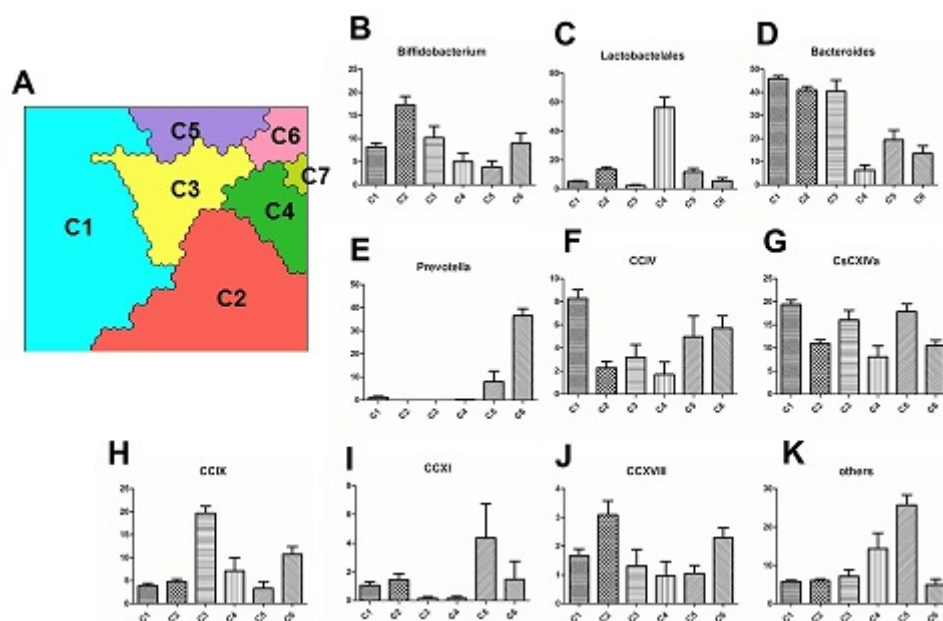


図3. UCの腸内細菌叢により分類されたクラスター

A) 分類されたクラスター（C1～C7）。B-K) 各クラスターにおける各細菌の割合。

3. 腸内細菌叢パターンと病型との相関

次に我々は各クラスターと疾患活動性との関連性を比較した。まず、腸内細菌叢採取時点において寛解状態であるか活動性をもっていたかを検証した。クラスターにより活動性は異なる傾向がみられた（図4A、B $p = 0.10$ ）。Lighttiger scoreについては有意差がみられ、C4とC5ではscoreの高い例が多くみられた（図4C、D）。臨床経過との関連をみると、C1は初回発作型が多くみられ、慢性持続型は全てC4に分類された（図5A、B）。この結果をもとにC1とそれ以外のクラスターで比較を行うと、C1には有意に初回発作型が多かった（図5C）。

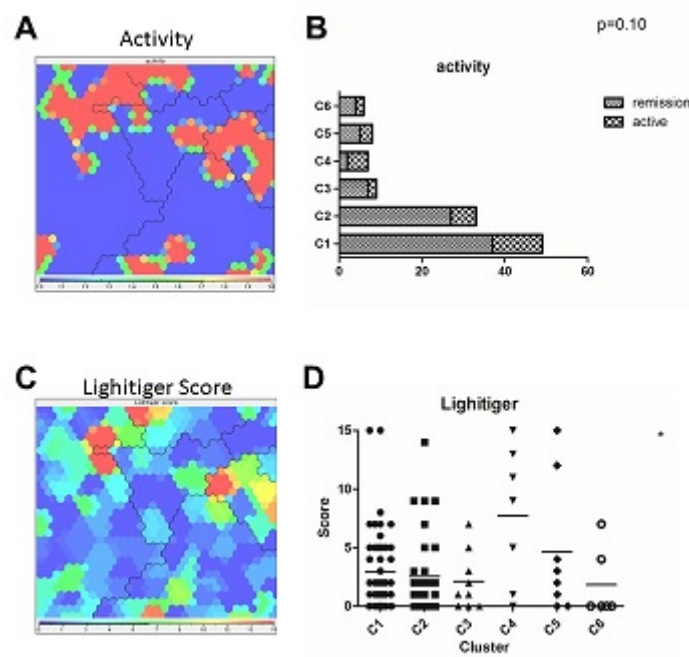


図4. 活動性との相関

A) 糞便採取時における臨床的活動性 (remission: 寛解、active: 活動) の地図。B) 症例数。C、D) Lightiger Score。

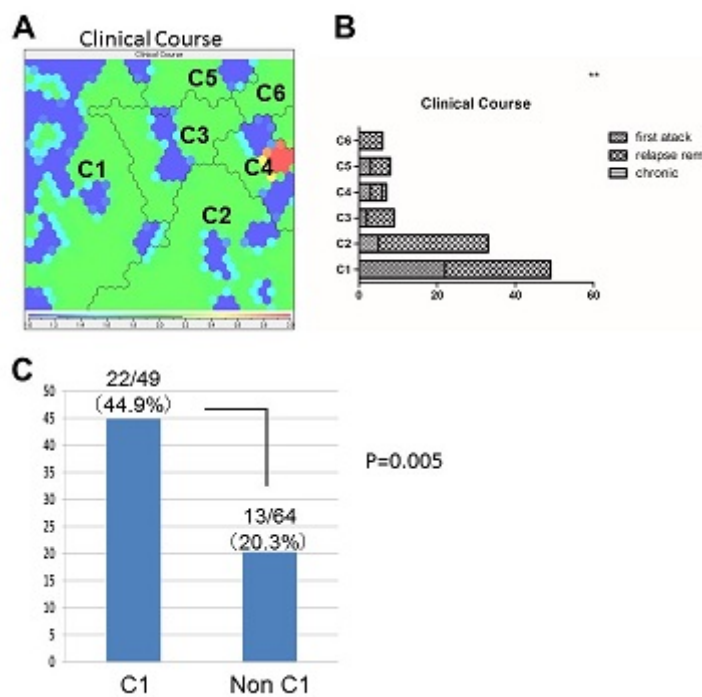


図5. 臨床経過との相関

A、B) 臨床経過の分類 (青: first attack 黄緑: relapse and remission 赤: chronic active)。C) C1 と Non C1 (それ以外のクラスター) における臨床経過の各症例数の比較。P = 0.005 (カイ二乗検定)

考 察

今回我々は健常者および潰瘍性大腸炎患者の糞便検体を用いて腸内細菌叢を分類した。腸内細菌叢には健常人と潰瘍性大腸炎患者で差が認められるグループも存在したが、両者の差は必ずしも明瞭に分類されるわけではなかった。潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢のみにより分類を行うと、活動性や臨床経過との相関がみられた。各クラスターにおける腸内細菌叢のパターンが得られ、更に特徴的な腸内細菌をもつクラスターも存在した。今後各クラスターに特徴的であった腸内細菌を次世代シーケンサーにより解析することで各クラスターを特徴づける鍵となる細菌を同定できる可能性があると考えられる。

潰瘍性大腸炎は単一疾患ではなくいくつかの病態が混在するとも考えられている。腸内細菌叢のパターンがいくつかに分かれており、潰瘍性大腸炎に特徴的なパターンが存在する一方で健常者とも類似するパターンが存在する点も潰瘍性大腸炎に多様な病態が存在する可能性が示唆される。潰瘍性大腸炎患者に対し健常者の糞便移植を行う研究が現在行われているが、有効性については未だ一定していない⁵⁾。今回の我々の検証から考えると、糞便移植の効果が一定しないのは腸内細菌叢パターンの類似した健常者と潰瘍性大腸炎患者とが混在し、その検証が行われずに移植がなされていることも一因として考えられる。

SOM および人工ニューラルネットワークの技術を用いることにより、今後新規患者の腸内細菌叢を検証すると、本研究で得られた地図のどこに分類されるかを検証することが可能である。新規患者が分類されたクラスターにおける臨床経過や治療成績を検証することで治療に対する反応性も検証することが可能であるため、治療方法の選択の補助になり得るものと考えられる。

本研究における限界：本研究においては腸内細菌叢を1時点のみにおける検証であるため、原因か結果か、変化しうるかは導き出せない。その後の臨床経過を調べることにより、腸内細菌叢パターンからその後の経過を予測することも今後できると考えられる。また、同一患者において腸内細菌叢がどう変化するか、食事や治療による影響はどうかを検証したい。これらの検証により腸内細菌叢の効果的なコントロール方法が得られると期待したい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東海大学医学部付属八王子病院の市川仁志および渡辺勲史である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflamm Bowel Dis*. 2016 May;22(5):1137-50. doi: 10.1097/MIB.0000000000000750. PMID: 27070911
- 2) Takayama T, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Kitazume MT, Chang J, Matuzaki Y, Suzuki S, Sugita A, Koganei K, Hisamatsu T, Kanai T, Hibi T. Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2010 Sep;139(3):882-92, 892.e1-3. doi: 10.1053/j.gastro.2010.05.040. Epub 2010 Jun 1. PMID: 20638936
- 3) Grossi E, Buscema M. Introduction to artificial neural networks. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 1046-1054. PMID: 17584929
- 4) Takayama K, Fujikawa M, Obata Y, Morishita M. Neural network based optimization of drug formulations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003 Sep 12;55(9):1217-31. PMID: 12954200
- 5) Moayyedi P. Fecal transplantation: any real hope for inflammatory bowel disease? *Curr Opin Gastroenterol*. 2016 May 5. [Epub ahead of print] PMID: 27152872