187　機械学習による腸内細菌叢層別化と腸管GVHDリスク解析	新井　康之

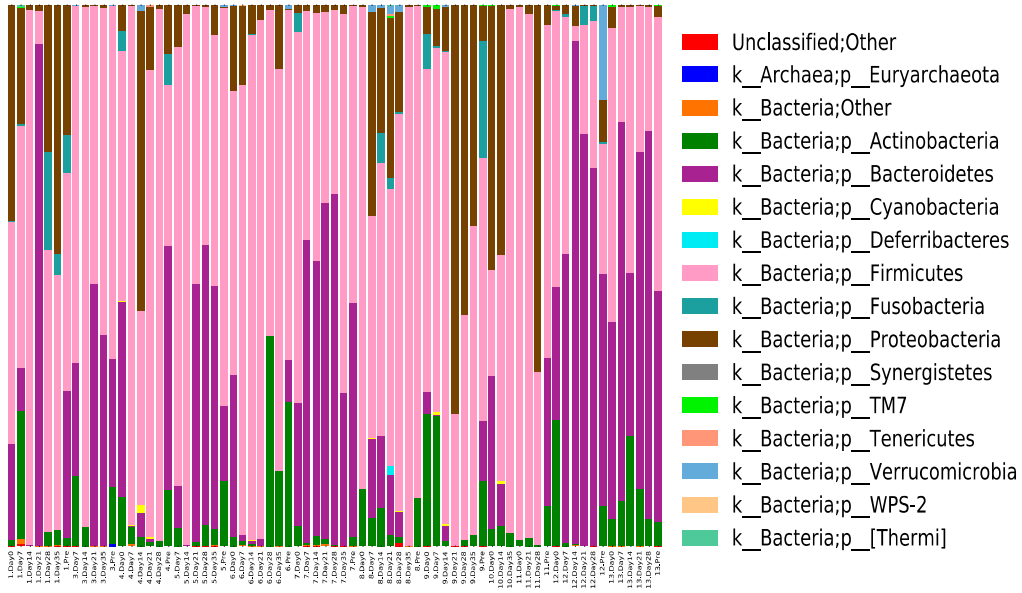
【目的】白血病やリンパ腫などの難治性造血器腫瘍に対して、同種造血幹細胞移植は根治治療となる。移植後には様々な合併症を伴うが、中でも、腸管急性移植片対宿主病（GVHD）は、ドナー免疫細胞が、患者腸管粘膜細胞を攻撃する病態で、予後不良因子として知られる。その病因として、一般的な炎症性腸疾患と同様に、「腸管細菌叢の変化（dysbiosis）」が関連している可能性がある。同種移植に際しては、前処置に用いる化学療法や抗生剤によって、短期間のうちに腸管細菌叢の様態が劇的に変化し、dysbiosis が起こることが予想されるが、包括的な研究はされていない。

そこで、我々は、移植後患者の糞便に対して、次世代シーケンスを用いた腸内細菌叢の同定を行うとともに、マススペクトグラムを用いた代謝産物の解析を行う。得られた結果は、前処置や抗生剤使用、腸管 GVHD との関連を解明する。それにより、特徴的な dysbiosis や代謝産物パターンを、腸管 GVHD の早期予測マーカーとして確立し、予後改善のために最適化された同種移植レジメンを提案することが、本研究の目的である。

【方法】1. 造血器腫瘍に対する骨髄移植後の腸内細菌叢の採取と同定、2. AI を用いた機械学習による腸内細菌叢の分類と、移植後臨床データベースとの融合と解析、3. マウス実験モデルでの同様の検討と生菌製剤を用いた予防実験、およびそれを踏まえたヒト臨床試験の準備、に分けて、ステップ毎に研究を行った。

【結果】我々は 2018 年度後半から検体採取を開始した。検体に関しては、これまでに約 10 患者（合計 70 検体）の解析を行っている。次世代シーケンスを用いた細菌叢同定を行い、属名まで同定できることを確認した（下図）。また、脂質メタボロームに関しても同様に同定できることが分かった。結果からは、移植前処置によって、腸内細菌叢 Dysbiosis や脂質メタボロームの乱れが起こっていることが、実際に確認できた。これをもとに、計画通り研究を進め、2 年後を目処に新たな創薬に繋げたい。

同定された腸管細菌叢の分類



187. 機械学習による腸内細菌叢層別化と腸管 GVHD リスク解析

新井　康之

京都大学 医学部附属病院 輸血細胞治療部

Key words：腸管細菌叢，同種造血幹細胞移植，腸管 GVHD，次世代シーケンス，機械学習

緒　言

白血病やリンパ腫などの難治性造血器腫瘍に対して、同種造血幹細胞移植は根治治療となる。移植後には様々な合併症を伴うが、中でも、腸管急性移植片対宿主病（GVHD）は、ドナー免疫細胞が、患者腸管粘膜細胞を攻撃する病態で、予後不良因子として知られる。その病因として、一般的な炎症性腸疾患［1］と同様に、「腸管細菌叢の変化（dysbiosis）」が関連している可能性がある。同種移植に際しては、前処置に用いる化学療法や抗生剤によって、短期間のうちに腸管細菌叢の様態が劇的に変化し、dysbiosis が起こることが予想されるが、包括的な研究はされていない。

そこで、我々は、移植後患者の糞便に対して、次世代シーケンスを用いた腸内細菌叢の同定を行うとともに、マススペクトグラムを用いた代謝産物の解析を行う。得られた結果は、前処置や抗生剤使用、腸管 GVHD との関連を解明する。それにより、特徴的な dysbiosis や代謝産物パターンを、腸管 GVHD の早期予測マーカーとして確立し、予後改善のために最適化された同種移植レジメンを提案することが、本研究の目的である。

造血器腫瘍に対する同種移植後の腸管急性移植片対宿主病（GVHD）は、予後不良因子として知られる。そのため、腸管 GVHD の発症リスク因子を同定する目的で、多くの臨床疫学研究がなされてきた［2］。これまでに、患者ドナー間の HLA 不一致に加え、特定の移植前処置の組み合わせや、移植前後に用いられる抗生剤の使用が、腸管 GVHD の発症と関連することが明らかにされている［3～5］。

しかし、特定の移植前処置や抗生剤の使用と、腸管 GVHD 発症との関係性は、臨床疫学的に示されたのみで、生物学的な検証はなされていない。そのような裏付けが取れれば、確定的なエビデンスとして、最適な移植前処置や抗生剤の使用方法を提唱することが出来、同種移植の予後改善に繋がる。

近年の研究で、炎症性腸疾患など腸管に対する自己免疫疾患に、腸管細菌叢構成の dysbiosis が関連していることが明らかになった。患者腸管粘膜に対するドナー由来リンパ球の免疫応答である、腸管 GVHD においても、腸管細菌叢の dysbiosis が関連している可能性がある。しかし、短期間で複雑に様態を変える同種移植後の腸内細菌叢に関する研究は不十分であり、特に日本人を対象にした検討はなされていない。また、実際に腸管細胞に作用すると思われる腸内細菌叢由来の代謝産物を詳細に解析した研究も、未だなされていない。そこで、我々の施設における前向き試験として、今回の課題研究を計画した。短期目的は次の 2 つである（図 1）。

1. 難治性造血器腫瘍患者糞便に対して、次世代シーケンス技術を用いた同種移植後の腸内細菌叢の同定
   - ・マススペクトグラムによる代謝産物の解析
   - ・移植前処置や抗菌薬など臨床経過との関連性探索
2. 移植後の各時点での腸内細菌叢の dysbiosis パターンや代謝産物分布と、腸管 GVHD 発症リスクの相関解明

これらの短期目的を達成することで、腸内細菌叢や代謝産物の変化を、GVHD 予測・早期診断可能なバイオマーカーとして確立し、それに基づく最適化移植レジメンを提唱することで、難治性造血器腫瘍の予後を改善することが長期目的である。

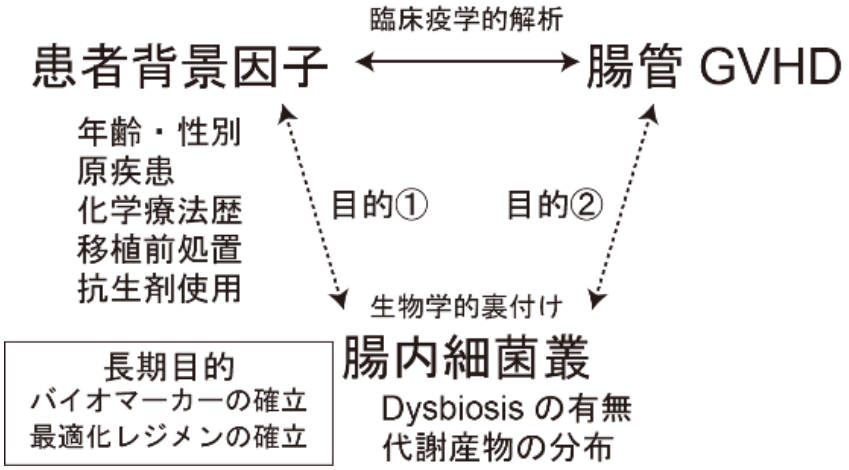


図 1. 研究目的

従来の細菌培養とコロニー形状を用いた細菌検査では、無数の細菌が存在する腸内細菌叢の同定は困難であった。近年の次世代シーケンスやバイオインフォマティクス技術の発展によって、腸管細菌叢の構成を正確に同定することが可能となった。腸内細菌叢に関しては、これまでに様々な研究がなされているが、いずれも海外からの報告が主で、本邦からの研究はごく僅かである。出生時の細菌伝播、食事摂取、環境などに大きく左右される腸内細菌叢は、欧米と本邦では大きく異なることが予想される。それゆえ、日本を含めたアジアにおけるデータを集積することは、極めて重要な課題である。

また、実際に腸管内皮細胞に作用を及ぼすのは、細菌そのものではなく、細菌叢から放出される代謝産物である。代謝産物に着目した解析は、その煩雑さゆえ、全世界的に見ても、皆無である。今回の研究においては、マススペクトグラムを用いることで、便中の腐敗産物や胆汁酸などを含めた代謝産物の網羅的解析を試みる。これは世界的にも初めての試みであり、腸管細菌叢の dysbiosis がもつ真の意義を明らかにする上で、重要な研究になると考える。

我々が今回対象とする疾患は、同種移植後の腸管 GVHD という、限られたものである。本研究が順調に進捗すれば、その他の細菌叢解析（皮膚や口腔内）も行い、皮膚 GVHD や口腔粘膜傷害との関連解析にも取り組む予定である。このように、本研究は、これまでとは全く異なるアプローチを用いて、細菌叢を介した移植合併症の評価とその予防を目指し、さらには難治性造血器腫瘍の移植成績改善を目標とするもので、今後極めて貴重な研究となる。

方　法

1.　方法のまとめ

本研究は、①造血器腫瘍に対する骨髄移植後の腸内細菌叢の採取と同定、②AI を用いた機械学習による腸内細菌叢の分類と、移植後臨床データベースとの融合と解析、③マウス実験モデルでの同様の検討と生菌製剤を用いた予防実験、およびそれを踏まえたヒト臨床試験の準備、に分けられる。平成 30 年 8 月より検体採取を始め、平成 31 年度より本格的に解析し、3 年計画で行っている（図 2）。

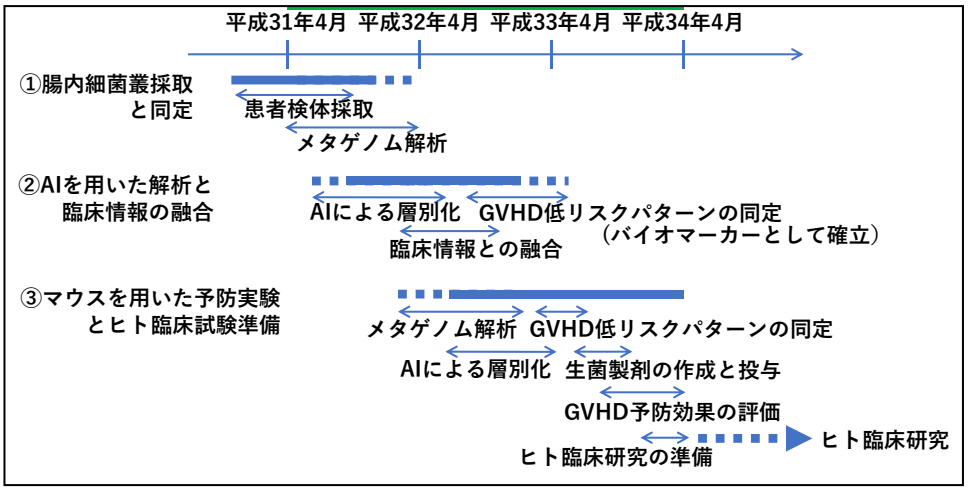


図 2. 研究計画

計画をステップ毎に示す。

2. 腸管細菌叢採取

①の造血器腫瘍に対する骨髄移植後の腸内細菌叢の採取と同定に関しては、移植前処置開始から 2 ヶ月に渡り、患者便検体を毎週採取する。約 80 名の患者を対象とし、検体は、栄養病理学研究所の協力を得て、細菌に特異的な遺伝子である 16S リボゾーム RNA コード遺伝子の塩基配列を、次世代シーケンサで決定する。このメタゲノム解析により、検体に含まれる腸内細菌叢の構成を同定し、各患者で dysbiosis を時系列に沿って解析する（平成 31 年度)。

3. 腸管細菌叢分類

②の AI を用いた機械学習による腸内細菌叢の分類に関しては、今回得られる膨大な量のメタゲノム解析結果から、AI を用いて共通点を見いだすことで、30～50 種類に層別化する。この結果を、同種移植の臨床データベースと融合させる。前処置や抗生剤使用などの移植前パラメータ、腸内細菌叢の dysbiosis、さらには GVHD 発症イベントの間で、相関関係を見つけ、バイオマーカーとして確立する。これにより、ヒトでの腸管 GVHD リスクが低い腸内細菌叢組成を同定する（令和 2～3 年度)。

4. 動物モデルでの検証

③のマウス実験モデルでの同様の検討と生菌製剤を用いた予防実験については、マウス骨髄移植モデル（C57BL6→BALB/c）を用いて、GVHD 発症とマウス腸内細菌叢の dysbiosis の相関を、②と同様に次世代シーケンスと AI を組み合わせて解析する。この際、マウス食餌（糖質と脂質のバランス）や飼育環境（Specific Pathogen Free 条件か、コンベンショナル条件か) に変化を持たせることで、予め腸内細菌叢に多様性を持たせたマウスコロニーで実験を行う。GVHD リスクが低かった腸内細菌叢組成を参考に、人工的に細菌を配合したカプセル製剤（生菌製剤）を作製する。生菌製剤の作製と投与は、同様の実験経験を持つ京都大学臨床病態検査学講座の協力を得る。GVHD 発症高リスクのマウスに、この生菌製剤を投与することで、腸内細菌叢を置き換え、GVHD の発症を抑制できるかを検討する。また、経過中に腸管上皮細胞を採取し、細胞内シグナル分子の変化についても詳細に解析し、メカニズムの点からも裏付けを取る（令和 2～3 年度)。

5. 今後の方針

動物実験に引き続き、ヒトにおいて、生菌製剤に関する臨床試験の準備を行う。過去の同種移植治療患者をコントロール群とし、「腸管細菌叢を定期的に同定し、GVHD 発症高リスクパターンを示す場合に生菌製剤を投与する症例」を介入群とする。介入群で、「腸管 GVHD 発症の抑制」と「生命予後改善」が得られるか解析する。両群それぞれ 50 症例を想定し、患者年齢や前処置強度などのパラメータを多変量解析モデルに組込むことで、介入がもたらす、真の効果を評価する。本プロトコールに関しては、臨床試験法に基づき、倫理委員会への申請準備を進める（令和 3 年度)。令和 4 年度より安全性試験を開始し、その後、両群を比較する臨床試験を行う。我々の単施設で良い成績が得られた場合は将来的には、多施設共同研究も実施予定である。

結　果

我々は2018年度後半から検体採取を開始している。検体に関しては、これまでに約10患者（合計70検体）の解析を行っている。次世代シーケンスを用いた細菌叢同定を行い、属名まで同定できることを確認した（図 3）。また、脂質メタボロームに関しても同様に同定できることが分かった。結果からは、移植前処置によって、腸内細菌叢 dysbiosis や脂質メタボロームの乱れが起こっていることが、実際に確認できた。これをもとに、計画通り研究を進め、2年後を目処に新たな創薬に繋げたい。

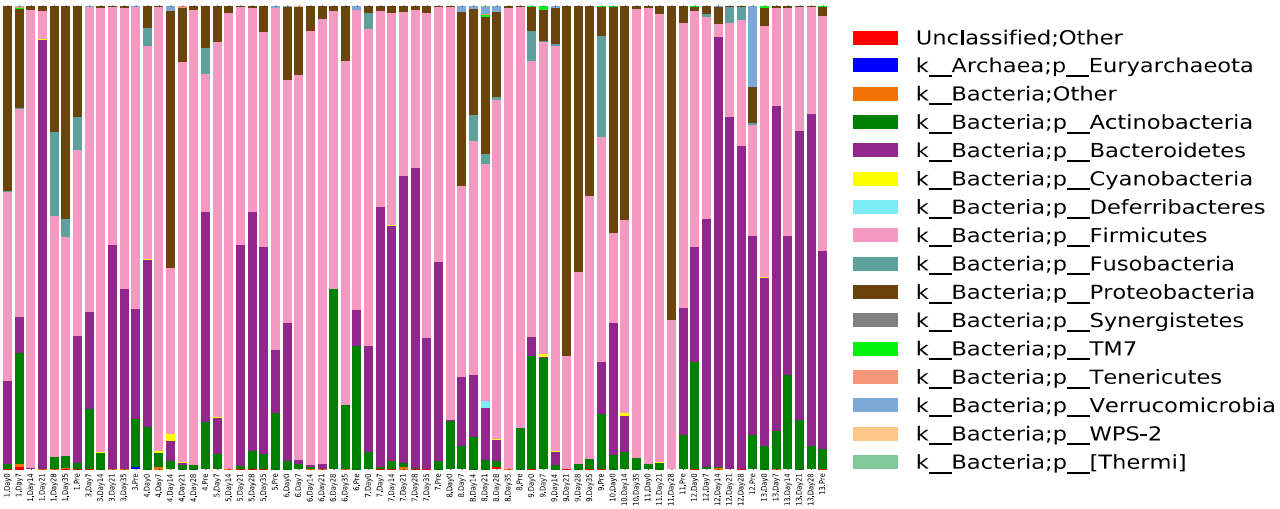


図 3.　腸管細菌叢の分布

先行する10症例での結果を示す。

考　察

本研究は、腸管 GVHD のバイオマーカーと予防法の確立とともに、腸内細菌叢や dysbiosis がもつ生物学的意義を解明する上で大きな情報を与えることが可能である。また、次世代シーケンスと AI という、情報工学における近年の大きなブレイクスルーとなった技術を組み合わせる手法は、今後の同様の研究においても、広く応用可能である。このような新しい観点から、難治性造血器腫瘍の予後改善を目指したい。造血器腫瘍に対する同種移植後の腸内細菌叢変化と、腸管 GVHD 発症リスクの解析を行っている。今後はさらに発展させ、新たな創薬に繋げたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、栄養・病理学研究所の塚原隆充所長である。

文　献

1）　Minaga K, Watanabe T, Arai Y, Shiokawa M, Hara A, Yoshikawa T, Kamata K, Yamashita K, Kudo M. Activation of interferon regulatory factor 7 in plasmacytoid dendritic cells promotes experimental autoimmune pancreatitis. J Gastroenterol. 2020 Jan 20. doi: 10.1007/s00535-020-01662-2. PMID: 31960143

2）　Arai Y, Kondo T, Fuse K, Shibasaki Y, Masuko M, Sugita J, Teshima T, Uchida N, Fukuda T, Kakihana K, Ozawa Y, Eto T, Tanaka M, Ikegame K, Mori T, Iwato K, Ichinohe T, Kanda Y, Atsuta Y. Using a machine learning algorithm to predict acute graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. Blood Adv. 2019 Nov 26;3(22):3626-3634. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000934. PMID: 31751471

3) Izumi K, Kanda J, Nishikori M, Arai Y, Ishikawa T, Yoshioka S, Ueda Y, Maeda T, Yonezawa A, Anzai N, Moriguchi T, Imada K, Akasaka T, Nohgawa M, Itoh M, Aiba A, Tsunemine H, Watanabe M, Kondo T, Takaori-Kondo A. Outcomes of allogeneic stem cell transplantation for DLBCL: a multi-center study from the Kyoto Stem Cell Transplantation Group. Ann Hematol. 2019 Dec;98(12):2815-2823. doi: 10.1007/s00277-019-03835-3. Epub 2019 Nov 12.

4) Ueda T, Jo T, Okada K, Arai Y, Sato T, Maeda T, Onishi T, Ueda Y. Curative potential of fludarabine, melphalan, and non-myeloablative dosage of busulfan in elderly patients with myeloid malignancy. Int J Hematol. 2020 Feb;111(2):247-255. doi: 10.1007/s12185-019-02763-2. Epub 2019 Nov 7. PMID: 31701479

5) Nanya M, Yurugi K, Kato I, Hiramatsu H, Kawabata H, Kondo T, Iemura T, Hishida R, Shibutani E, Matsui K, Nakagawa Y, Niwa N, Kasai Y, Roig JM, Arai Y, Miura Y, Takaori-Kondo A, Maekawa T, Hirai H. Successful granulocyte apheresis using medium molecular weight hydroxyethyl starch. Int J Hematol. 2019 Dec;110(6):729-735. doi: 10.1007/s12185-019-02755-2. Epub 2019 Oct 10. PMID: 31602571