

ヒト腸管自然免疫細胞内に寄生する腸内細菌群に着目した クローン病の病態解明研究

大阪大学大学院医学系研究科 消化器外科学 特任助教

関戸 悠紀

1. 諸言

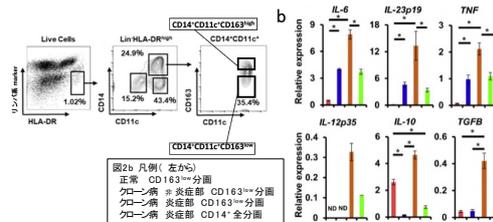
クローン病 (Crohn's Disease : CD) は腸管粘膜に慢性炎症を呈する消化器疾患で、潰瘍性大腸炎 (Ulcerative Colitis : UC) とともに炎症性腸疾患として称され、国の指定難病にも指定されている。UC では原則として病変は直腸から連続的に生じ大腸に限局するのに対して、CD では口から肛門までの全腸管粘膜に生じ、かつ病変は非連続性または区域性に生じる (skip lesion)。腸管膜は腸管の血管およびリンパ網を包み腸管に付着するが、CD では腸管を取巻くように腸管膜が増殖・肥厚する (Creeping Fat : CF、図 1a)。CD の腸管粘膜で特徴的に観察される縦走潰瘍は腸管膜付着側(CF 被覆部)に生じるが (図 1b)、興味深いことに、縦走潰瘍の形成前から CF が生じるとされる¹⁾。さらに、CD 腸管切除例では残存腸管膜が多いことが再発リスクであるとの報告もあり²⁾、腸管膜の炎症が腸管粘膜の炎症の結果ではなく病態に関与している可能性が示唆される。しかし、skip lesion として区域性・非連続性に腸管膜に炎症が持続する理由は不明である。



図 1 クローン病炎症部腸管に特徴的な腸管膜脂肪の増殖

われわれはこれまでに、ヒト腸管粘膜固有層に存在するミエロイド細胞の中でも、CD14+ CD11c+ CD163low 分画が炎症性サイトカインの産生、および Th17 細胞の誘導を介して

proinflammatory な炎症制御に関与していること、また CD の炎症部において非炎症部より proinflammatory な活性が高いこと³⁾ (図 2)、さらに CD14⁺ CD11c⁺ CD163^{high} 分画には抗炎症性サイトカインの産生があるが、潰瘍性大腸炎症例では population が低下していることを示してきた⁴⁾。しかしながら、CD 炎症部腸管ミエロイド細胞分画の活性や population の変化をもたらす直接の要因は明らかになっていない。



a CD14⁺ミエロイド分画に存在する炎症性のCD163^{low}分画
b クロノ病炎症部のCD163^{low}分画は炎症性サイトカイン産性能が亢進している

図 2 腸管ミエロイド細胞に存在する炎症性分画

CD の病態については、遺伝要因、食事など環境要因に加えて、腸内細菌と宿主免疫に注目した研究が行われてきた。粘膜への付着侵襲性をもつ大腸菌 (adherent invasive *E. Coli* : AIEC) の一部など、ヒト腸内細菌の中にはミエロイド細胞による貪食を受けても phagosome 内で消化されず、生存・増殖 (寄生) するものが知られている⁵⁾。また、ミエロイド細胞の炎症性サイトカイン分泌は貪食した腸内細菌により変化することや、AIEC を含む CD 患者の腸内細菌をマクロファージの細胞株に貪食させると炎症性サイトカインの分泌が亢進することが報告されている⁶⁾。実際に、未治療の小児 CD 症例の腸内細菌に関する報告では特定の細菌群の増加が病勢と相関しており、増加していた細菌群の中には粘膜への付着侵襲性をもつ大腸菌 (AIEC) を含む Gammaproteobacteria の増加が認められていることから⁷⁾、特定の細菌を貪食することが、ミエロイド細胞の炎症性サイトカイン分泌亢進を介して腸管炎症に関わっている可能性がある。

マクロファージをはじめとしたミエロイド細胞は末梢組織内で数カ月の寿命をもつことから、上記背景より、CD で生じる非連続な粘膜病変は、腸管粘膜を介して特定の細菌を貪食したミエロイド細胞内の細菌がミエロイド細胞の活性を持続させ、さらに腸管膜内のリンパ節において持続的にリンパ球を活性化する結果、そのリンパ領域の腸管に非連続性・区域性の炎症が誘導され生じるとの仮説を立て、その検証を目的とした。

2.方法

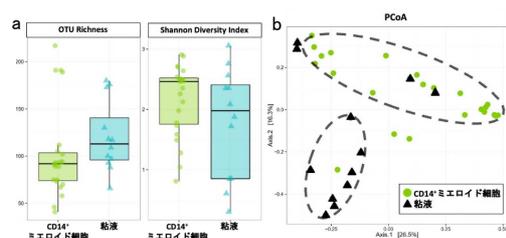
CD 手術症例の切除腸管サンプル (炎症部・非炎症部) およびコントロールの大腸癌症例で付随的に得られる正常部切除腸管サンプルから腸管膜およびリンパ節を摘出し、当グルー

プの既報⁸⁾で報告している実験系で、それぞれのミエロイド細胞分画をフローサイトメトリーでソーティングし DNA を抽出する【本研究で 2021 年度に実施】。

得られたミエロイド細胞分画内に存在する細菌 DNA を、16S rRNA sequencing を用いて網羅的に解析し、コントロールと比較して有意に増えている菌群を同定する。また、同定した寄生菌群について、コントロール癌症例およびクローン病非炎症部粘膜に存在するミエロイド細胞 subset に対して寄生させ、炎症性サイトカイン産性能および培養系での Th17 細胞の誘導能等炎症病態に関わる活性に与える影響を、当グループの既報³⁾で報告している実験系で検証する。【2022-2023 年度に新規研究費を獲得して実施】

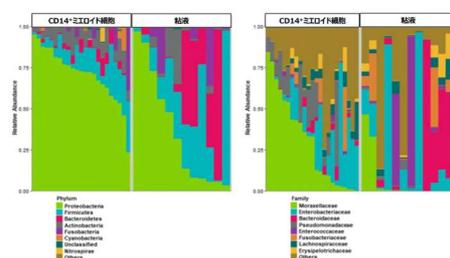
3.結果

われわれは、腸管組織中のミエロイド細胞中の細菌を網羅的に解析する系を確立した。CD 症例の炎症部腸管において、腸管粘膜層に存在するマクロファージ内の細菌群に比較して腸管粘膜固有層内に存在するマクロファージ内の細菌群で Gammaproteobacteria が濃縮されていた⁸⁾ (図 3、4)。



a 腸管ミエロイド細胞内菌群の多様性は粘液より低下していた
b 両者の菌群はそれぞれ別クラスターを形成した

図 3 クローン病腸管粘液内の細菌群と腸管ミエロイド細胞内の細菌群は異なる



特定のGammaproteobacteriaが濃縮されていた

図 4 クローン病腸管ミエロイド細胞内に存在する細菌群組成

5.結語

腸管、腸管膜および腸管膜リンパ節に存在するマクロファージ内に存在する細菌群の DNA を得る系を確立した。計画のとおりサンプルを蓄積しており、引き続き解析を行う予定である。

6.文献

- 1) Charles N Bernstein, et al. A prospective comparison study of MRI versus small bowel follow-through in recurrent Crohn's disease. *Am J Gastroenterology*. 2005;100(11):2493-502.
- 2) Calvin J Coffey, et al. Inclusion of the Mesentery in Ileocolic Resection for Crohn's Disease is Associated With Reduced Surgical Recurrence. *J. Crohn's Colitis*. 2018;12(10):1139-50.
- 3) Takayuki Ogino, et al. Increased Th17-inducing activity of CD14⁺ CD163^{low} myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2013;145(6):1380-91.
- 4) Soumik Barman, et al. Identification of a human intestinal myeloid cell subset that regulates gut homeostasis. *Int Immunol*. 2016;28(11):533-45.
- 5) A L Glasser, et al. Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun*. 2001;69(9):5529-37.
- 6) Khalidur Rahman, et al. Crohn's disease-associated *Escherichia coli* survive in macrophages by suppressing NF κ B signaling. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(8):1419-25.
- 7) Dirk Gevers, et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Medicine*. 2014;15(3):382-92.
- 8) Yuki Sekido, et al. Some Gammaproteobacteria are enriched within CD14⁺ macrophages from intestinal lamina propria of Crohn's disease patients versus mucus. *Scientific Reports*. 2020;10(1):2988.