

## 学位論文要旨

氏名 北畑 翔吾

論文名 回腸の粘膜関連細菌叢における *Sphingomonas* 属の過剰増殖は  
原発性胆汁性胆管炎の独立した危険因子である

---

### 学位論文の要約

#### [背景と目的]

原発性胆汁性胆管炎 (primary biliary cholangitis; PBC) は病因が解明されていない慢性進行性の胆汁うっ滞を来す自己免疫性肝疾患である。肝硬変および肝細胞がんの発生に至るが根治的治療法はない。また進行した PBC には肝移植が唯一の治療手段となる。PBC の病態に影響を与える因子として、遺伝的素因と環境因子の関与が想定される。近年、環境因子として特に腸内細菌叢の変化が注目され、先行研究において *Alphaproteobacteria* 綱に属する細菌に感染したマウスが PBC 様の肝病変を発症したことが報告された (Cell Host Microbe, 2008)。また健常人と比較して、PBC 患者では糞便細菌叢の多様性の有意な減少 (dysbiosis) が報告されているが (Gut, 2018)、*Alphaproteobacteria* 綱を含む特定の細菌の過剰増殖は PBC 患者の糞便細菌叢からは確認されていない。腸内細菌叢は糞便中の管腔内細菌叢 (luminal microbiota; LM) と腸粘膜に存在する粘膜関連細菌叢 (mucosal-associated microbiota; MAM) で構成される。特に MAM は LM よりも粘膜上皮の機能調整を行うとされており、PBC の環境因子として直接的に作用している可能性がある。PBC の病態進行に寄与する胆汁酸は回腸末端から再吸収され肝臓へ輸送されるため、我々は回腸末端における MAM が PBC の病態に関与する可能性があるかと仮定した。これまで PBC 患者の MAM についての報告はなく、申請者は消化器内視鏡を用いた MAM 採取法を用いて PBC 患者の MAM を解析し、PBC の病態との関連を明らかにすることを研究の目的とした。

#### [材料と方法]

- 2018年3月から2020年1月の間に愛媛大学で大腸内視鏡を施行した患者のうち、研究同意が得られた PBC 患者 34 人と健常人 21 人を対象とした。

氏名 北畑 翔吾

2. 内視鏡下にブラシ鉗子を用いて回腸末端の粘膜を擦過してサンプルを得た。サンプルは-80°Cで凍結し DNA を抽出した。
3. 細菌の 16S リボソーム RNA 遺伝子の V3~V4 領域を増幅し、アンプリコンを精製して定量化したのち 16S rRNA シーケンスを実行した。QIIME ソフトウェアツールスイート (v1.9.1) を用いて 16S rRNA 配列分析を実行した。Greengenes データベース (v13.5) に含まれる既知の細菌の配列ごとに、97 %以上相同な配列を持つリードをまとめて Operational Taxonomic Unit を作成した。加重および非加重の UniFrac 距離を計算し  $\beta$  多様性を比較した。
4. すべての被験者はインフォームドコンセントが提供され、研究プロトコルはヘルシンキ宣言の倫理ガイドラインに従って開発された。本研究は愛媛大学の倫理委員会によって承認され (承認番号 1610012)、大学病院医療情報ネットワークセンター (UMIN 000040177) に登録されている。

#### [結果と考察]

- ① 多様性評価により PBC 患者の小腸 MAM における dysbiosis の存在が明らかになった。
- ② PBC 患者では綱レベルにおいて *Alphaproteobacteria* 綱が有意に多かった。
- ③ PBC 患者の小腸 MAM に、natural killer T cell を活性化させる *Sphingomonas* 属とミトコンドリアピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 E2 (PDC-E2) と交差反応を起こす *Pseudomonas* 属が、健常人と比較して有意に豊富にみられた。
- ④ 上記のデータを元に、*Sphingomonas* 属と *Pseudomonas* 属の存在量が PBC リスクに関連するか評価するため ROC 曲線を作成した。得られたカットオフ値をもとに *Sphingomonas* 属および *Pseudomonas* 属が豊富な群と少ない群に分け、単変量解析で有意であった性別を含めて多変量解析を行ったところ、*Sphingomonas* 属が豊富であることが PBC の独立した危険因子であった。
- ⑤ 小腸 MAM は腸肝相関を介して、自己免疫の活性化や PDC-E2 と交差反応を引き起こすことで PBC の病因に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

#### [結論]

PBC 患者の小腸粘膜細菌叢 (MAM) は健常人と比較し dysbiosis を認め、*Sphingomonas* 属と *Pseudomonas* 属の過剰増殖がみられた。*Sphingomonas* 属の増加は PBC の独立した危険因子であった。*Sphingomonas* 属増殖は PBC における環境リスク因子である可能性があり、今後プロバイオティクスや選択的除菌など腸肝相関に基づく新しい治療法の開発につながる可能性がある。

キーワード (3~5)	原発性胆汁性胆管炎 粘膜関連細菌叢(mucosal-associated microbiota; MAM) <i>Sphingomonas</i> 属 <i>Pseudomonas</i> 属 腸肝相関
-------------	---