

学位論文審査結果の要旨

氏名	北畑翔吾
審査委員	主査 北澤 荘平 副査 内田 大亮 副査 小川 晃平 副査 山之内 純 副査 ミヤケ 深雪

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

審査結果の要旨

【背景と目的】

原発性胆汁性胆管炎 (primary biliary cholangitis; 以下 PBC) は、慢性進行性に胆汁うっ滞を来す自己免疫性肝疾患である。根治的治療法は未だ確立されておらず、進行した PBC には肝移植が唯一の治療手段となる。PBC の病態には、遺伝的素因と環境因子とが想定され、環境因子として特に腸内細菌叢の変化が注目されている。動物実験では、*Alphaproteo bacteria* 綱に属する細菌に感染したマウスが PBC 様の肝病変を発症することが報告されている。一方、PBC 患者の糞便では、細菌叢の多様性が有意に減少している (dysbiosis) ものの、特定の細菌の過剰増殖についての定説はない。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) とで構成されている。申請者等は、MAM が粘膜上皮の機能調整機能を有することから、回腸末端における MAM が PBC の病態に関与しているのではないかという仮説の下に、消化器内視鏡を用いて、PBC 患者の MAM を直接解析し、PBC の病態と MAM との関連性を検討した。

【材料と方法】

1. 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。
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、既知の細菌の配列ごとに、97%以上相同な配列をまとめてOperational Taxonomic Unitを作成した。加重および非加重のUniFrac距離を計算しβ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（以下、S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（以下、P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、S属とP属の存在量がPBCリスクに関連するか評価した。得られたカットオフ値をもとにS属およびP属が豊富な群と少ない群とに分け、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、S属が豊富であることがPBCの独立した危険因子で有ることが明らかとなった。
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MAMにはdysbiosisが認められた。S属とP属の過剰増殖がみられ、S属の過剰増殖はPBCの独立した危険因子であった。S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示された。

公開審査会は、令和3年2月3日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表した後に、審査員から本研究に関する以下の様な質問がなされた。

- 1) 腸管バリア破綻のメカニズム、2) 肝移植後の原疾患再発防止への展望、3) 性差との関連性、4) 口蓋扁桃摘出の適応の可能性、5) 肝臓特異性とNKT細胞との関係、6) 胆汁酸内の菌叢との関連性

申請者は、これらの質問に対して適切に回答した。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。