

2024年7月11日
大阪公立大学
東京大学

毒性の強い腸内細菌が造血幹細胞移植の重篤な合併症を引き起こすことを発見

-ファージ由来の溶菌酵素による新規治療薬の開発へ-

<ポイント>

- ◇造血幹細胞移植患者の腸管内で毒性の強い腸内細菌を特定。
- ◇この腸内細菌はバイオフィーム^{※1}を形成し、腸管内で増加していることが明らかに。
- ◇メタゲノム解析から同定したファージ由来の溶菌酵素（エンドライシン^{※2}）で、バイオフィームごと菌を溶解。
- ◇エンドライシンの投与が移植片対宿主病（GVHD）の悪化を抑制し、死亡率を大幅に改善することをマウスで確認。

<概要>

近年、“腸内細菌叢の乱れ”がさまざまな疾患で見られることが、ゲノム解析技術の向上により明らかになってきました。臓器移植では、免疫細胞が移植された臓器を異物とみなして攻撃し、拒絶反応が起こります。白血病治療などで行われる造血幹細胞移植では、移植された造血幹細胞由来の免疫細胞が、移植患者の臓器を異物とみなし攻撃する「移植片対宿主病（GVHD）」を発症することがあります。これまでの研究で、造血幹細胞移植の治療過程で腸内細菌叢のバランスが乱れ、エンテロコッカス属の細菌が増加することで、GVHDが悪化することが報告されていました。

大阪公立大学大学院医学研究科ゲノム免疫学の植松 智教授（東京大学医科学研究所附属ヒトゲノム解析センターメタゲノム医学分野特任教授を兼任）、藤本 康介准教授（東京大学医科学研究所附属ヒトゲノム解析センターメタゲノム医学分野特任准教授を兼任）らと、東京大学医科学研究所附属ヒトゲノム解析センター健康医療インテリジェンス分野の井元 清哉教授らの共同研究グループは、大阪公立大学医学部附属病院の造血幹細胞移植（同種移植）患者46名の糞便のメタゲノム解析を実施。46名のうち30名でエンテロコッカス属の細菌が増加していることを明らかにしただけでなく、一部の症例で毒性の強いエンテロコッカス・フェカーリス（*Enterococcus faecalis*）が存在し、GVHDの発症に関わることを見出しました。

造血幹細胞移植の治療では、感染症から身を守るために抗菌薬を使用しますが、この毒性の強い *E. faecalis* は腸管内でバイオフィームを形成することで、抗菌薬から逃れて増殖していると考えられました。また、毒性の強い *E. faecalis* を定着させたマウスでは、GVHDが悪化することが明らかとなりました。そこで本研究グループは、*E. faecalis* に特異的に作用し、バイオフィームを破壊することが可能な溶菌酵素を探索するため、*E. faecalis* のメタゲノム解析を行いました。その結果、新規の溶菌酵素（エンドライシン）の配列を同定し、その精製に成功しました。このエンドライシンを毒性の強い *E. faecalis* を定着させた GVHD モデルマウスに投与したところ、GVHDの悪化を抑制し死亡率が大幅に改善することを確認しました。本研究で得られたファージ由来のエンドライシンは、今後 GVHD の新規治療薬の開発に繋がることが期待されます。

本研究成果は、2024年7月11日（木）0時（日本時間）に国際学術誌「Nature」のオンライン速報版に掲載されました。

同種造血幹細胞移植は治療効果の高い治療法ですが、GVHDなどの重篤な合併症のリスクがあります。同種移植患者の腸内では毒性の強い *E. faecalis* が増加し、それにより GVHD の病態が悪くなりやすいことを明らかにしました。さらに、*E. faecalis* に特異的な溶菌酵素エンドライシンを同定し、世界に先駆けて生体内でのその有効性を示しました。本研究成果は将来的な GVHD の新規予防法・治療法に繋がるのが強く期待されます。



藤本 康介准教授

<研究の背景>

消化管内には細菌やウイルスをはじめとした常在微生物叢が存在し、私たちの健康に大きな影響を与えています。ゲノム解析技術の進歩に伴い、常在微生物叢解析が盛んに行われるようになり、近年では、疾患の発症と直接的に関わる腸内共生病原菌も発見されています。疾患の発症予防のため、腸内共生病原菌の除菌が期待されていますが、抗菌薬の使用は有益菌も殺傷し腸内細菌の乱れを助長する可能性があるため、腸内共生病原菌だけを特異的に排除できる方法が求められています。腸管内には細菌よりはるかに多数のウイルスが存在しています。この常在腸内ウイルスは、ノロウイルスのように私たちの細胞に感染するのではなく、腸内細菌を宿主とするバクテリオファージ（ファージ）が主となります。ファージは宿主細菌を溶菌する作用を持っており、ファージ療法は腸内共生病原菌を制御するための有効な方法の一つと考えられています。

本研究グループはこれまでに、東京大学医科学研究所のスーパーコンピュータ SHIROKANE を用いて腸内細菌叢と腸内ウイルス叢のメタゲノム解析パイプラインの構築を行い、世界に先駆けて健常者の糞便における細菌叢とウイルス叢のメタゲノムデータベースを作成しました。この解析手法により、細菌やファージの培養が不可能な場合でも、感染関係を同定することができます。また、ファージが有する溶菌酵素の網羅的な探索も可能です。

これまで、同種造血幹細胞移植患者の大規模な糞便解析により、移植後にエンテロコッカス属の細菌が増加し、腸管内でエンテロコッカス属の細菌を多く持つ人は GVHD に関連した死亡率が増加することが報告されています (doi: 10.1126/science.aax3760)。エンテロコッカス属の中でも、特に *E. faecalis* が GVHD の増悪に関与しており、治療標的と考えられていました。

<研究の内容>

本研究では、大阪公立大学医学部附属病院血液内科・造血細胞移植科に入院中の 46 名の同種造血幹細胞移植患者の経時的な糞便解析を行い、30 名で糞便中のエンテロコッカス属の細菌が増加していることを確認しました。糞便からエンテロコッカス属の細菌を単離して詳細に調べたところ、サイトライシン^{※3}を持つ毒性の強い *E. faecalis* が見つかりました (図 1)。さらに、この毒性の強い *E. faecalis* が検出された患者では、有意に GVHD が発症していることが明らかになりました。単離した毒性の強い *E. faecalis* のメタゲノム解析を行ったところ、バイオフィルムに関連する遺伝子が有意に検出されました。本研究で単離した *E. faecalis* はいずれも薬剤耐性株ではなかったことから、腸管内でバイオフィルムを形成し、移植治療の過程で投与された抗菌薬から逃れて生存したものと考えられました。

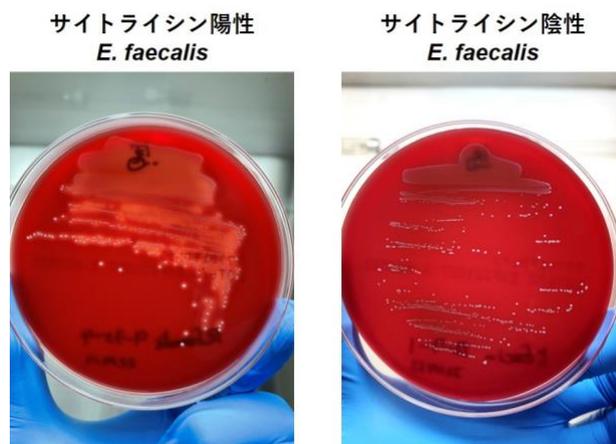


図 1 毒性の強い *E. faecalis* を培養した血液寒天培地
サイトライシン陽性 *E. faecalis* は溶血反応を示す

次に、*E. faecalis* のメタゲノムデータから、*E. faecalis* を宿主とするファージを探索し、ファージ由来の溶菌酵素配列を同定し、エンドライシンを精製しました。このエンドライシンは *E. faecalis* を溶菌するものの、エンテロコッカス・フェシウム (*E. faecium*) や大腸菌などの他の腸内細菌には溶菌活性を持たず、*E. faecalis* 特異的と考えられました。また、*E. faecalis* のバイオフィルムに対する効果を検討したところ、試験管内試験だけでなく、生体内試験でもバイオフィルムを溶解することが明らかとなりました (図 2)。

さらに毒性の強い *E. faecalis* を定着させたノトバイオートマウス^{※4} を作成し、GVHD を誘導したところ、サイトライシンを持たない *E. faecalis* や *E. faecium* を定着させたノトバイオートマウスと比較して、有意に生存率が悪化することが分かりました。また、エンドライシンを投与すると、生存率が回復することが明らかとなりました (図 3)。

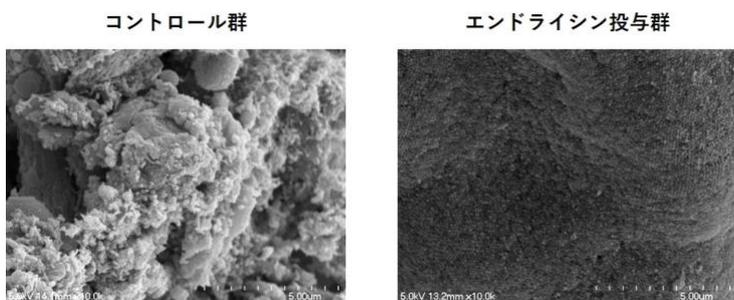


図 2 小腸の電子顕微鏡画像
溶菌酵素 (エンドライシン) を投与すると腸管での *E. faecalis* のバイオフィルム形成が抑制される

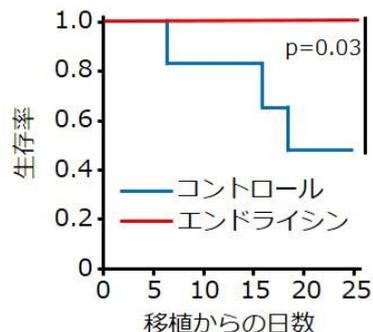


図 3 毒性の強い *E. faecalis* を単独定着させたノトバイオートマウスに GVHD を誘導した際の生存率の推移
溶菌酵素 (エンドライシン) を投与すると生存率が回復する

最後に、毒性の強い *E. faecalis* を含む患者糞便を無菌マウスに移植し GVHD を誘導したところ、エンドライシンの投与とともに腸管内の毒性の強い *E. faecalis* が減少し、エンドライシンを投与した群では有意に生存率が伸びることが明らかとなりました (図 4)。

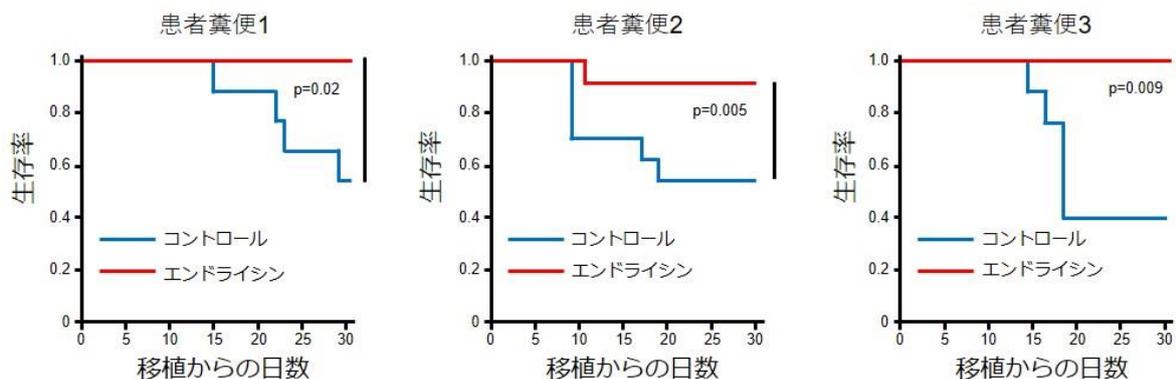


図 4 毒性の強い *E. faecalis* を含む患者糞便を移植したノトバイオートマウスに GVHD を誘導した際の生存率の推移
溶菌酵素 (エンドライシン) を投与すると生存率が回復する

<期待される効果・今後の展開>

本研究成果により、今後 *E. faecalis* 特異的なファージ由来のエンドライシンを用いた GVHD に対する治療薬の開発が進むとともに、GVHD に対する新たな治療技術としての貢献が強く期待されます。また、*E. faecalis* に起因する感染症 (心内膜炎、尿路感染症、前立腺炎、腹腔内感染症、蜂窩織炎など) への応用も強く期待されます。

<資金情報>

本研究は、日本学術振興会（JSPS）研究費（22K16329、21K19495、22H00477）、日本医療研究開発機構（AMED）研究費（JP21ae0121048、JP21fk0108619、JP21ae0121040）、武田科学振興財団、キャノン財団、科学技術振興機構（JST）研究費（JPMJCE1304）からの支援を受けて行われました。

<用語解説>

- ※1 バイオフィーム…微生物や微生物が産生するさまざまな物質が集合してできた構造体。微生物自身が産生する物質（菌体外多糖類など）によって微生物を覆う形で形成される。バイオフィーム内では微生物は増殖を繰り返す。
- ※2 エンドライシン…ファージが細菌を破壊するための酵素。細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカンを分解する。
- ※3 サイトライシン…細菌が産生する細胞溶解素。腸管内では腸管上皮を傷害したり、他の微生物を溶解したりする作用を持つ。
- ※4 ノトバイオートマウス…特定の微生物のみが定着したマウスのこと。無菌マウスに微生物や細菌叢を定着させることで作出する。

<掲載誌情報>

【発表雑誌】 Nature

【論文名】 An enterococcal phage-derived enzyme suppresses graft-versus-host disease

【著者】 Kosuke Fujimoto[†], Tetsuya Hayashi[†], Mako Yamamoto, Noriaki Sato, Masaki Shimohigoshi, Daichi Miyaoka, Chieko Yokota, Miki Watanabe, Yuki Hisaki, Yukari Kamei, Yuki Yokoyama, Takato Yabuno, Asao Hirose, Mika Nakamae, Hirohisa Nakamae, Miho Uematsu, Shintaro Sato, Kiyoshi Yamaguchi, Yoichi Furukawa, Yukihiro Akeda, Masayuki Hino, Seiya Imoto*, and Satoshi Uematsu*（[†]共同筆頭著者、*共同責任著者）

【DOI】 10.1038/S41586-024-07667-8

<参考情報>

・大規模データから新規抗菌物質を同定 腸内ウイルスのビッグデータを使った新しい治療法を開発 ～腸内ファージのデータベースを構築～（2020年7月11日プレスリリース）

<https://www.osaka-cu.ac.jp/ja/news/2020/200711>

・腋臭症（わきが）のニオイの原因となる菌を遺伝子レベルで解析 ―ファージ由来の抗菌剤の開発に期待！―（2024年4月23日プレスリリース）

https://www.omu.ac.jp/info/research_news/entry-11124.html

【研究内容に関する問い合わせ先】

大阪公立大学大学院医学研究科
准教授 藤本 康介（ふじもと こうすけ）
TEL：06-6645-3926
E-mail：kfujimoto@omu.ac.jp

東京大学医科学研究所
特任准教授兼務
TEL：03-6409-2163
E-mail：kfuji@ims.u-tokyo.ac.jp

【報道に関する問い合わせ先】

大阪公立大学 広報課
担当：竹内
TEL：06-6605-3411
E-mail：koho-list@ml.omu.ac.jp

東京大学医科学研究所
プロジェクトコーディネーター室（広報）
TEL：090-9832-9760
E-mail：koho@ims.u-tokyo.ac.jp