

表 題 クローン病の小腸細菌叢解析と
クローン病関連菌によるマウス腸管免疫細胞の誘導

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 永山 学

担当指導教員氏名 山本 博徳 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 地域医療学系
専攻分野 消化器疾患学
専攻科 消化器内科学

2020年1月10日申請の学位論文

目次

緒言

- 研究背景
- 研究目的

対象と方法

- 対象患者, サンプル収集, および倫理的配慮
- サンプルからの DNA 抽出と 16S rRNA メタ解析
- 細菌の単離培養
- ノトバイオートマウスの作出
- 腸管粘膜固有層のリンパ球抽出とフローサイトメトリー
- 統計学的解析

結果

1. 小腸細菌叢解析の基礎的検討
2. 比較解析によるクローン病関連菌の同定
3. クローン病関連菌による腸管免疫細胞への影響

考察

1. 小腸粘膜細菌叢の解析について
2. クローン病関連菌と腸管免疫
3. 本研究の限界

まとめ

参考文献

緒言

研究背景

クローン病は炎症性腸疾患（Inflammatory bowel disease）の一つで、主に回腸と大腸を侵し、病変の形態としては区域性の縦走潰瘍や腸管狭窄・瘻孔、病理組織像としては類乾酪性肉芽種や腸管壁全層の炎症を特徴とする疾患である¹。また、関節症状や皮膚・眼病変など関節外合併症がみられることもある。本疾患は若年層に好発し、厳密な食事制限を必要とするとともに、病勢の再燃を繰り返したり、腸管穿孔や難治性の腸管狭窄をきたすことから治療に入院・手術を必要とするなど、生活の質（quality of life）が大きく制限される。これまでは欧米諸国に多い疾患と考えられていたが、日本を含む東アジア諸国においても患者数が増加しており、厚生労働省の特定疾患調査による患者数（受給者証所持者数）は昭和 51 年の登録開始以降右肩上がりが増加し、最新の統計では 41,068 人（平成 29 年度）と潰瘍性大腸炎・パーキンソン病・全身性エリテマトーデスに次ぐ患者数となっている。抗 TNF- α 抗体製剤をはじめとする生物学的治療薬の出現により治療効果の改善が得られるようになってきたが、二次無効例の出現や高額な医療費などが問題となってきている。

クローン病はゲノムワイド関連解析（Genome Wide Association Study；GWAS）などにより 100 を超える感受性遺伝子が同定されている^{2,3}。この中には NOD2 や ATG16L1 など食細胞に関わるものや IL23R など TH17 細胞に関わるもの、抗炎症性サイトカインである IL-10、TNF スーパーファミリーに属する TNFSF15 など免疫関連遺伝子が多く含まれている。免疫学的な解析においても、クローン病ではまず腸管内抗原（腸内細菌など）により腸管マクロファージが活性化され、炎症性リンパ球への抗原提示を介した誘導・増殖を行うことで免疫系が過剰に活性化されることが報告されており^{1,4}、ステロイドや免疫調節薬、上述した抗 TNF- α 抗体製剤など免疫系を抑制する薬剤が現在治療として用いられている。

ヒトの腸管内には 1000 種・100 兆個を超える細菌が存在し腸内細菌叢を形成しているとされる⁵。腸内細菌に由来する遺伝子量はヒト個体の 100 倍にもなり、腸内細菌叢とヒト宿主が恒常性を保ちながら共存していることから、総じて「超生命体（superorganisms）」とも呼ばれる。腸内細菌は宿主が摂取した食事の消化に関わるとともに、腸管バリアの維持や免疫系の誘導など宿主への影響を有し、さらに病原微生物の排除にも関係する。

腸内細菌叢のバランスが崩れた状態を dysbiosis と呼び⁶、クローン病をはじめ糖尿病などの代謝性疾患や神経疾患において dysbiosis がみられる^{7,8}。クローン病では特定の細菌の増減が確認されている。代表的ものは *Faecalibacterium prausnitzii* の減少である^{9,10}。細胞実験や腸炎モデルマウスを用いた実験においても *F. prausnitzii* の抗炎症作用が報告されており¹¹、*F. prausnitzii* はクローン病に対して防御的な役割を果たしていることが推測されている。一方、クローン病で増加する細菌として *Escherichia coli* が報告されている⁹。クローン病に見られる *E. coli* の特徴として腸上皮細胞への接着能や侵入能、マクロファージ内での増殖能を有することから adherent-invasive *E. coli* (AIEC) と呼称されている^{12,13}。東アジア

におけるクローン病患者数の増加に関しては、食生活の変化（欧米化）による腸内細菌叢の変化がその一因として推測されているが、腸内細菌と本疾患の病態の関係はまだ多くが明らかとなっていない。

小腸は通常の上部消化管内視鏡や大腸内視鏡では到達できないことから、以前は小腸の観察や処置を行うことは困難であった。2000年初頭に登場したダブルバルーン内視鏡はオーバーチューブとバルーンシステムを利用して深部の小腸への到達を可能にした¹⁴。これによりクローン病の診断や治療の戦略は大きく変化し、特にこれまで切除手術しか選択肢のなかった小腸狭窄病変に対してダブルバルーン内視鏡を用いたバルーン拡張術を行うことができるようになった¹⁵。これまでにダブルバルーン内視鏡を利用した小腸細菌叢解析はほとんどなされていない。クローン病は回腸にも病変を認めることが多く、糞便細菌叢とは異なる固有の小腸細菌叢が病態に影響している可能性がある。

研究目的

本研究の目的は、これまでに明らかとなっていないクローン病の小腸細菌叢を解析して本疾患の病態に関わる細菌を特定することである。そのために、まず採取方法や挿入経路の影響を明らかにするために小腸細菌叢解析の基礎的検討を行なった。次に、クローン病患者と対照患者（非クローン病患者）の小腸粘膜細菌叢を統計学的に比較解析することによりクローン病関連菌を特定した。さらに、統計学的な菌叢解析により明らかとなったクローン病関連菌の腸管免疫系への影響について無菌マウスを用いて解析を行なった。

対象と方法

対象患者、サンプル収集、および倫理的配慮

本学消化器内科に通院するクローン病患者 27 人、対照として非クローン病患者 17 人を対象とした。小腸粘膜サンプルとして粘膜生検と粘膜擦過をダブルバルーン内視鏡を用いて採取した。内視鏡の挿入経路 (経口的、経肛門的) と内視鏡の種類 (EN-580T, EN-450T5 または EN-450P5, Fujifilm, Tokyo, Japan), およびサンプル採取方法は患者状態により担当内視鏡医が決定した。経口的挿入の場合は下部空腸からサンプルを採取し、経肛門的挿入の場合は上中部回腸からサンプルを採取した。小腸サンプルは活動性潰瘍や狭窄部を避けて採取した。経口的挿入では腸管洗浄は行わず、経肛門的挿入の場合は検査前日から腸管洗浄を行った。鎮静には midazolam と pethidine を用い、腸管蠕動抑制には timopidum bromide hydrate または glucagon を用いた。粘膜サンプルとして粘膜生検 (Radial Jaw4P, Boston Scientific, MA, USA) または粘膜擦過 (Roth net, US Endoscopy, OH, USA) を採取した。粘膜サンプル採取の前に小腸液を内視鏡の吸引により採取した。検査の前日に唾液と糞便を採取した。

DNA 抽出用に生検サンプルは TE10 (10mM Tris-HCl, 10mM EDTA) バッファーに入れ -80°C の冷凍庫で解析まで保存した。粘膜擦過と小腸液は遠心分離してから、ペレットを TE10 バッファーで懸濁し -80°C の冷凍庫で保存した。細菌培養用に生検サンプルは 20% glycerol/PBS に入れ、液体窒素で急速冷凍してから -80°C の冷凍庫で保存した。粘膜擦過と小腸液は遠心分離してから、ペレットを 20% glycerol/PBS で懸濁し、液体窒素で急速冷凍してから -80°C の冷凍庫で保存した。

本研究は本学倫理審査委員会の承認を得て (第臨 A18-変 003), 全ての被験者から署名による説明と同意を得て、ヘルシンキ宣言に則り行われた。

サンプルからの DNA 抽出と 16S rRNA メタ解析

冷凍保存されたサンプルを融解後に遠心分離を行い、そのペレットを RNase A (最終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Invitrogen, MA, USA) と lysozyme (最終濃度 15 mg/mL , Sigma, St. Louis, MO, USA) を含む 800 μL の TE10 バッファーで懸濁した。懸濁液は 37°C で 1 時間振盪しながらインキュベートした。次に Achromopeptidase (最終濃度 2,000 unit/mL, 富士フイルム和光純薬, 大阪) を加え 37°C で 30 分インキュベートした。さらに sodium dodecyl sulfate (最終濃度 1%) と proteinase K (最終濃度 1 mg/mL , Roche, Basel, Switzerland) を加え、 55°C で 1 時間インキュベートした。phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) により高分子量 DNA を抽出し、NaOAc と isopropanol により沈殿させ、ペレットを 75% ethanol で洗浄し、50 μL の TE バッファーで溶解した。16S rRNA gene の V1-V2 の増幅のため 27Fmod 5'-AGRGTTTGATYMTGGCTCAG-3' と 338R 5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3' のプライマーを用いて PCR を行った。それぞれのアンプリコン (~330 bp) は AMPure XP (Beckman Coulter,

CA, USA)で精製した。DNA 濃度は Quant-iT Picogreen dsDNA assay kit (Invitrogen)で定量した。16S メタゲノムシーケンスは MiSeq を用いて Illumina 社のプロトコールにより行った。重なり合う 2 つの paired-end reads は fastq-join program により融合させた。平均クオリティ値が 25 未満の reads と両方の universal primer を有しない reads は除外した。これらのフィルターを通過した read は primer 領域をトリミングされた後に解析に用いた。それぞれのサンプルに対し、クオリティー値の上位 3,000 reads を抽出し、UCLUST program version 5.2.32 (<https://www.drive5.com>)を用いて 97% pairwise-identity cutoff の条件で operational taxonomic units (OTU)を作成した。RDP と National Center for Biotechnology Information (NCBI)の遺伝子データベースと GLSEARCH program を用いて、それぞれの OTU に対して類似配列検索を行うことにより細菌分類を行った。

細菌の単離培養

細菌の単離目的に、冷凍保存されたサンプルを融解し、リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS)で段階希釈して非選択培地と選択培地 (好気培養は TS, 嫌気培養は EG, BHK, MRS and CM619+SR107)に塗布した。好気培養は 37°C・24 時間、嫌気培養(80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂)は嫌気チャンバー (Coy Laboratory Products) を用いて 37°C・2~4 日間で行った。それぞれのコロニーを採取し、16S rRNA 遺伝子領域を universal primer (27Fmod: 5'-AGRGTTTGATYMTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3')を用いて増幅した。単離された細菌は 16S rRNA 遺伝子による系統樹を作成し、類似度 98%以上の場合には菌株 (strain)としてまとめた。各菌株の 16S rRNA 遺伝子配列は NCBI の遺伝子データベースまたは本研究の 16S rRNA メタ解析の OTU リストに対して Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)で検索することにより最近縁の細菌種と責任 OTU を決定した。Enterobacteriaceae 科に属する菌株の同定については TSI 斜面培地(BD, NJ, USA), LIM 培地, SIM 培地 (栄研化学, 東京), API 20E システム(BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France)を用いて同定した。

サンプルの細菌量測定のために、冷凍保存されたサンプルを融解し PBS で段階希釈した。Schaefer agar に塗布しアネロパック嫌気 (三菱ガス化学, 東京) または嫌気チャンバーで 37°C・2~4 日間培養し、サンプルあたりの colony forming unit として算出した。

ノトバイオートマウスの作出

クローン病関連 adherent-invasive *E. coli* (AIEC) LF82 株はクローン病患者の回腸粘膜から単離されたもので¹², *E. coli* K-12 に属する MG1655 株は保存培養のものを使用した。その他の菌株は本研究においてクローン病の小腸粘膜サンプルから単離した。菌液の調製のために、*R. gnavus* 131A1 株は EG plate で嫌気培養しコロニーをスクレーパーで回収して EG broth に懸濁した。*E. coli* の菌株 (35A1 株, LF82, MG1655 株) は TS broth で好気培養し、残りの 7 株は EG broth で嫌気培養した。同量の菌液を混合して投与液とした。無菌マウス (C57BL/6, 7-14 週齢) にゾンデを用いて経口的に菌液を投与し、定着は糞便の Gram

染色で確認した。菌液の種類毎に異なるビニルアイソレーター内で12時間毎の明暗サイクルで飼育し、投与から3週間後に解析を行った。無菌マウスは日本クレア（東京）から購入または慶應義塾大学で自家繁殖したものを使用した。全ての動物実験は慶應義塾動物実験委員会の承認を得て慶應義塾大学で行った。

腸管粘膜固有層のリンパ球抽出とフローサイトメトリー

マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、大腸および小腸を採取した。長軸方向に切開しPBSで洗浄して内容物を除去した。腸上皮細胞の除去のため5 mM EDTA 入り 20 ml Hanks' balanced salt solution (HBSS)に入れ、37°Cの水槽で振盪させながら20分間インキュベートした。腸上皮細胞を除去後、ピンセットを用いて筋層と腸間膜脂肪組織を手動的に除去した。得られた粘膜固有層はハサミで小切片とし、4% fetal bovine serum, 0.5 mg/ml collagenase D (Roche), 0.5 mg/ml dispase (Gibco), 40 µg/ml DNase I (Roche)入り 10 ml RPMI1640 に入れ、37°Cの水槽で振盪させながら40分間インキュベートした。酵素消化された組織は5 mM EDTA 入り 10 ml HBSS で洗浄し、5 ml 40% Percoll (GE Healthcare, IL, USA)に懸濁し、2.5 ml 80% Percoll を下層に静置し、遠心分離（900g, 30分間, 25°C）で密度勾配分離を行った。リンパ球を含む40%/80%の境界層を10% FBS 入り RPMI1640 に回収した。サイトカイン刺激のために、50 ng/ml PMA, 750 ng/ml ionomycin (いずれも Sigma), GolgiStop (BD)入りの10% FBS 入り RPMI1640 で培養した（37°C, 3.5時間）。Ghost Dye 780 (Tonbo Biosciences, CA, USA)でラベリング後、Foxp3/Transcription Factor Fix/Perm (Tonbo Biosciences)で固定および透過処理し、下記の標識抗体で一晩染色した：anti-TCRβ (BV605; Biolegend, California, USA), anti-CD4 (BV510; Biolegend), anti-TCRγδ (BV421; Biolegend), anti-IFN-γ (FITC; Biolegend), anti-IL-17A (PerCP-Cy5.5; eBioscience), anti-TNF-α (PE/Cy7; Biolegend), anti-RORγt (APC; eBioscience), anti-DR3 (PE; Biolegend). BD FACS Aria IIIu (BD Biosciences)によりデータを獲得し、Flowjo software (TreeStar)で解析した。TCRβ 陽性かつ CD4 陽性の生細胞を CD4 陽性 T 細胞, IFN-γ 産生性 CD4 陽性 T 細胞を TH1 細胞, IL-17 産生性 CD4 陽性 T 細胞を TH17 細胞とした。

統計学的解析

統計学的解析は GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, CA, USA)と R software (version 3.6.1, package vegan と package phyloseq)を用いた。2群間比較には対応のないスチューデントの t 検定, 3群間以上の比較には Ordinary one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post hoc test, 2種類の群を持つデータでは 2 way-ANOVA with Bonferroni's post hoc test, 2変数の比較にはカイ二乗検定を行なった。2群間の多重検定には Multiple t-tests with False Discovery Rate (FDR) approach (two-stage step-up method of Benjamini, Krieger and Yekutieli)および LEfSe (linear discriminant analysis effect size)を行った¹⁶。Bray-Curtis distance に基づく non-metric multidimensional scaling (NMDS)プロットの作成と permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) with pairwise multilevel comparison は R software を用いた。P 値または q 値 0.05 未満を有意差ありとした。

結果 1：小腸細菌叢解析の基礎的検討

1. 採取方法による細菌叢の違いについて

これまでにダブルバルーン小腸内視鏡で採取されたサンプルを用いた小腸細菌叢解析はほとんどなされていないことから採取方法の解析を行った。これまでに大腸では粘膜生検（粘膜細菌叢）と腸液（管腔細菌叢）の比較が行われている¹⁷。これに準じて小腸粘膜サンプルと腸液の比較を行った。

本研究に参加したクローン病 27 症例、非クローン病 17 症例の小腸から得られた粘膜サンプル 44 個（生検 22 個，擦過 22 個），およびこの 44 症例から無作為に採取した小腸液サンプル 22 個の合計 66 サンプルについて 16S rRNA メタ解析を行い，3,149 の operational taxonomic units (OTUs) が得られた。

まず，このデータを用いて α 多様性の比較を行った。 α 多様性は種の豊富さ（richness）と均等度（evenness）により基づく概念で，その多様度指数として Abundance-based Coverage Estimator (ACE，種数の推定量)，Chao1（richness の指標），Shannon index（evenness の指標）などがある。小腸の粘膜細菌叢と腸液細菌叢の間には多様性の差は見られなかった（図 1）。

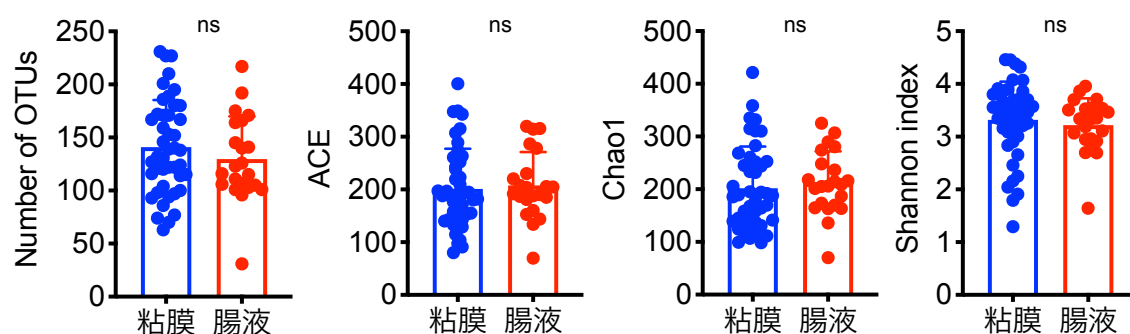


図 1 小腸における採取方法別の多様度指数。シンボルは各サンプル，bar は平均値（range は標準偏差）を示す。ns; not significant ($P > 0.05$), one-way ANOVA with Turkey's post hoc test.

一方，細菌叢構成の比較ために，サンプル間の非類似度の指標である Bray-Curtis distance に基づいたプロットを作成したところ，粘膜と腸液で細菌叢構成が有意に異なっていた（図 2）．

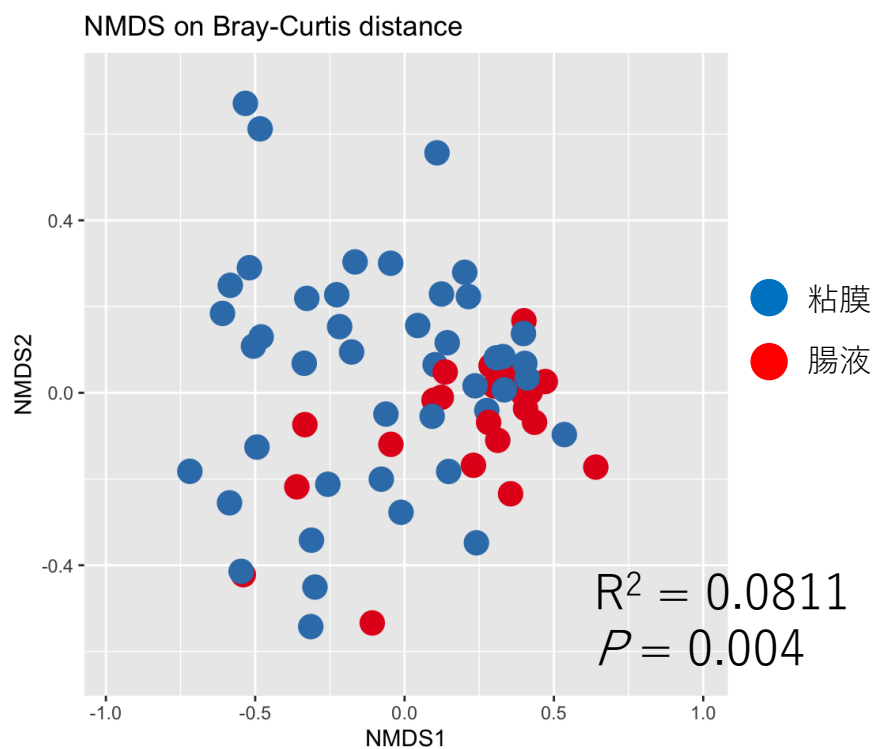


図 2 小腸サンプルの採取方法別の細菌叢構成. Bray-Curtis distance に基づく non-metric multidimensional scaling (NMDS) プロット. シンボルは各サンプル. 統計値は PERMANOVA.

2. 挿入経路による影響について

小腸に対してダブルバルーン内視鏡を行う場合、病変の部位や臨床状況に応じて経口的挿入と経肛門的挿入が使い分けられる。経肛門的挿入を行う場合は腸管洗浄が必須であるが、これまでに腸管洗浄は糞便細菌叢に影響を与えることが報告されている¹⁸。腸管洗浄の小腸細菌叢への影響の解析は臨床診療で行うことは困難であるが、挿入経路別の比較を行うことで間接的にその影響を解析することができると考えられた。

同一入院時に経口的挿入と経肛門的挿入を行った5症例、計17サンプルを対象に解析を行った（クローン病3例、非クローン病2例。全ての症例で経口的挿入と経肛門的挿入は異なる日に行われた）。同一症例の同経路のサンプル（同時に採取した粘膜サンプルと腸液）は Bray-Curtis distance が小さい、すなわち細菌叢が似ていた（図3）。同一症例の別経路のサンプルはそれよりも有意に Bray-Curtis distance が大きかったことから、個人内で小腸細菌叢を比較する場合（例えば治療前後の比較など）は同一経路からサンプルを採取する必要があると考えられた。

一方、個人間での比較の場合は、同経路から得られたサンプルでも Bray-Curtis distance が 0.904 (上限 1.0) と細菌叢の違いが大きく、別経路から得られたサンプルとほぼ同等であった（図3）。

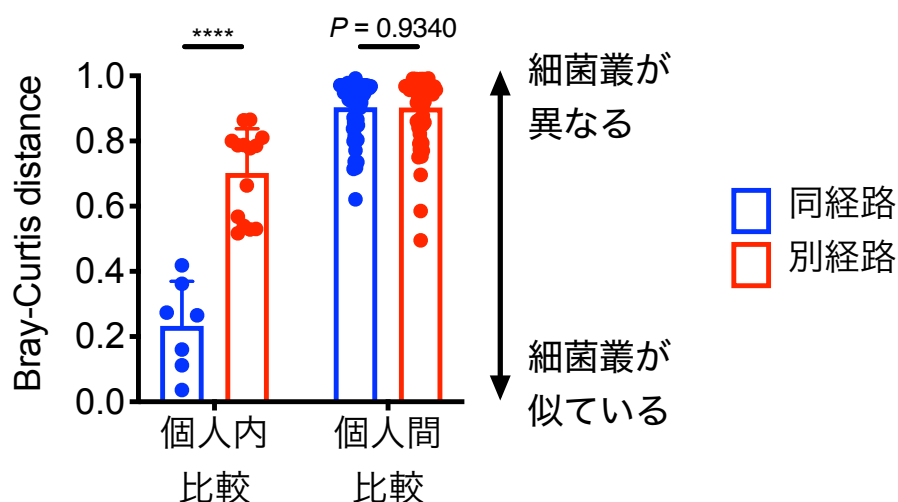


図3 挿入経路の違いによる Bray-Curtis distance の比較。シンボルは各サンプル、bar は平均値（range は標準偏差）を示す。**** $P < 0.0001$, スチューデントの t 検定。

3. 小括

小腸では粘膜関連細菌と管腔内細菌の菌叢構成が異なっていた。

個人内での細菌叢を比較する場合には挿入経路が強く影響することから同一経路での比較が必要であるが、個人間の比較では挿入経路による差は見られなかった。

結果 2：比較解析によるクローン病関連菌の同定

1. クローン病の小腸細菌叢の解析

クローン病の小腸細菌叢の解析のため、クローン病 27 症例、非クローン病 17 症例から小腸粘膜サンプル（粘膜生検または粘膜擦過）を採取した（表 1）。クローン病 27 症例のうち 23 例が狭窄型で、19 例は抗 TNF α 抗体製剤による治療中であり、全症例が非活動期であった。挿入経路とサンプル採取方法は患者背景により選択された。採取された合計 44 個の小腸粘膜サンプルの 16S rRNA メタ解析を行い 2,660 OTUs が抽出された。

	クローン病症例 (n = 27)	非クローン病症例 (n = 17)	P value
年齢 (歳)	42.6 (± 10.5)	51.1 (± 17.5)	0.0503
性別 (女性, %)	14.8	64.7	0.0011
挿入経路 (経口的 / 経肛門的)	4 / 23	12 / 5	0.0003
サンプルの種類 (粘膜生検 / 粘膜擦過)	14 / 13	8 / 9	> 0.9999
罹病期間 (年)	14.1 (± 10.6)		
Montreal分類 (%)			
L1 / L2 / L3	74.1 / 0 / 25.9		
B1 / B2 / B3	14.8 / 81.5 / 3.7		
腸管手術歴 (%)	33.3		
白血球数 (μL)	5,826 ($\pm 2,057$)	4,694 ($\pm 1,070$)	0.0426
赤血球数 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	454.7 (± 52.3)	436.5 (± 68.8)	0.3248
ヘモグロビン (g/dL)	13.5 (± 1.4)	13.1 (± 2.3)	0.4251
CRP (mg/dL)	0.3 (± 0.5)	0.0 (± 0.1)	0.1536
治療内容 (%)			
5-アミノサリチル酸製剤	88.9%	0%	< 0.0001
抗TNF- α 抗体	70.4%	0%	< 0.0001
免疫調節薬	40.7%	0%	0.0029
ステロイド	3.7%	0%	> 0.9999
成分栄養剤	81.5%	0%	< 0.0001
整腸剤	55.6%	5.9%	0.001
非クローン病症例の背景疾患		小腸外疾患 (n = 6) Peutz-Jeghers症候群 (n = 4) 腸管閉塞の既往 (n = 3) GIST (n = 2) 悪性リンパ腫 (n = 2) 非顕性小腸出血 (n = 2) 家族性大腸腺腫症 (n = 1) 虚血性小腸炎 (n = 1)	

データは平均値 (\pm 標準偏差), 解析には Unpaired Student's t test または Fisher's exact test を用いた.
 Montreal分類: L1 = 小腸型, L2 = 大腸型, L3 = 小腸大腸型, B1 = 非狭窄・非穿通型, B2 = 狭窄型, B3 = 穿通型

表 1 患者背景

まず多様性を比較したところ、クローン病と非クローン病でいずれの多様度指数にも差は認めなかったが（図 4A），Bray-Curtis distance による解析ではクローン病と非クローン病の菌叢は有意に異なっていた（図 4B）。

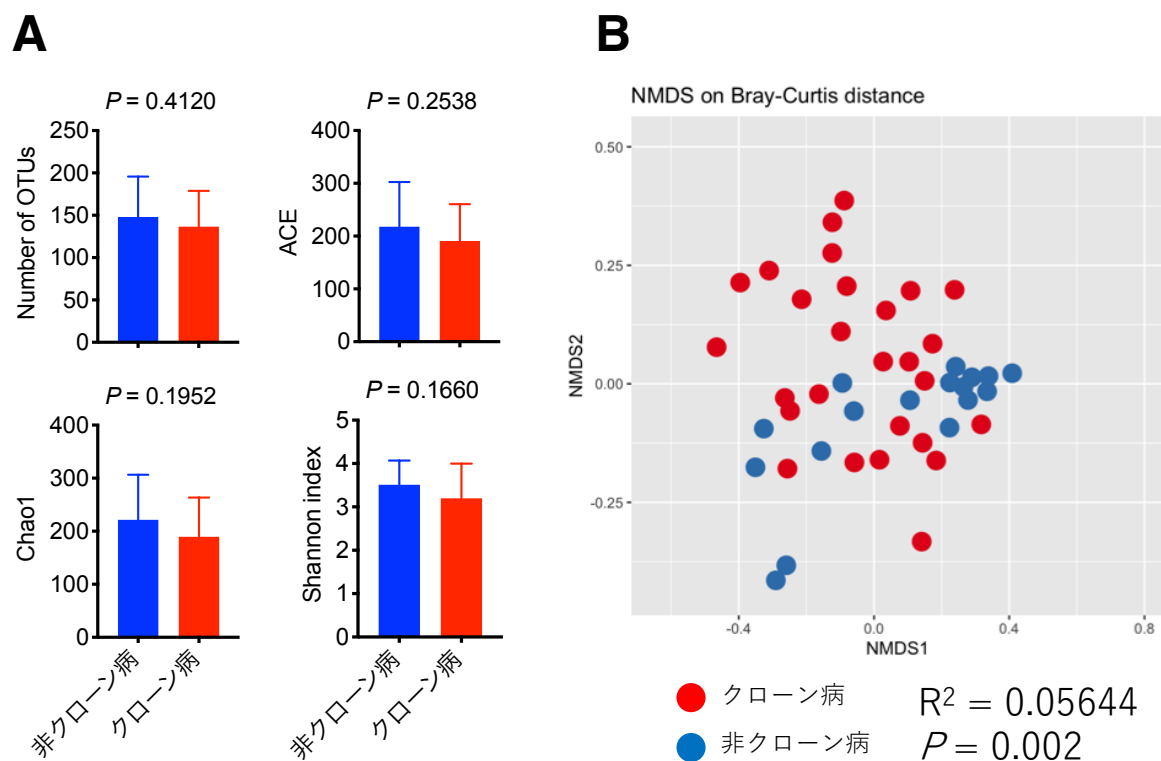


図 4 クローン病の有無による小腸細菌叢の多様度指数と細菌叢構成. (A) 多様度指数. (B) Bray-Curtis distance に基づいた NMDS プロット. シンボルは各サンプル, A の bar は平均値 (range は標準偏差). 統計値はスチューデントの t 検定(A), PERMANOVA (B).

次に OTU の塩基配列を遺伝子データベースに照合し、得られた門 (Phylum) , 科 (Family) データについて比較した. 門レベルの比較では Proteobacteria 門と Bacteroidetes 門に含まれる細菌がクローン病で増加していた (図 5A) . また, 科レベルの比較では Enterobacteriaceae 科, Ruminococcaceae 科, Bacteroidaceae 科に含まれる菌がクローン病で増加していた (図 5B) .

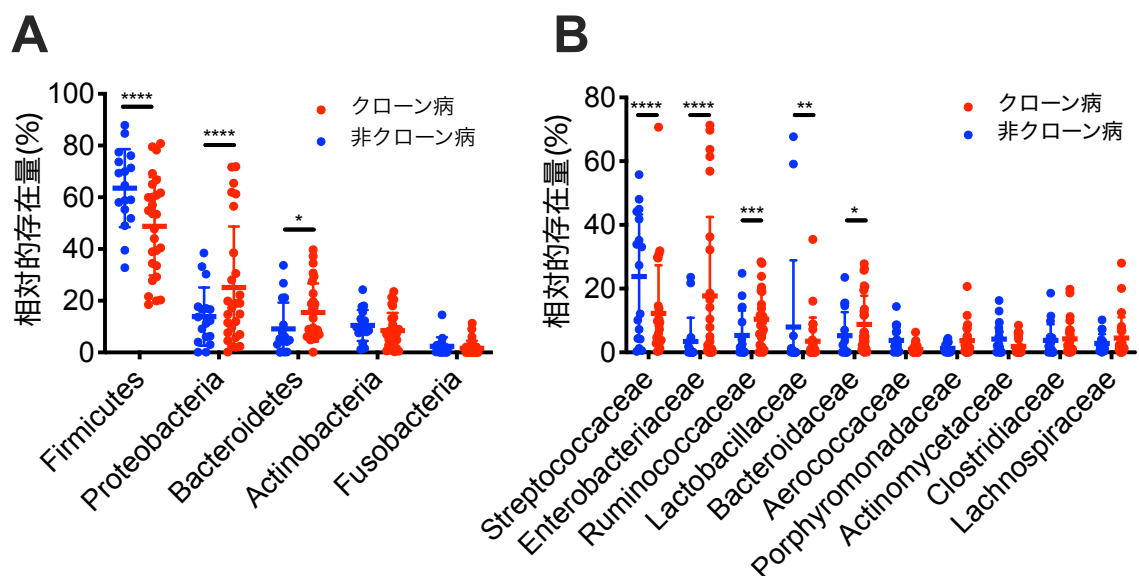


図 5 クローン病の有無による小腸粘膜細菌叢の門・科レベルの比較. (A) 門レベル, (B) 科レベル. シンボルは各サンプル, line は平均値 (range は標準偏差). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, Multiple t-tests with FDR approach.

2. クローン病関連菌の同定

クローン病の病態に関わる細菌を明らかにするため OTU（菌種または菌株）レベルでの比較を行った。解析方法として、multiple t-tests with FDR approach に加えて、細菌叢解析で広く用いられている LEfSe を組み合わせることによってクローン病関連菌の抽出を行った。multiple t-tests では 14 個の OTU がクローン病患者の小腸粘膜で有意に多く（図 6A）、LEfSe では 6 個の OTU が有意に多かった（図 6B）。2 つの解析により 18 菌種がクローン病患者の小腸粘膜で多く、共通して抽出されたものは *Escherichia coli* と *Ruminococcus gnavus* の 2 菌種であった（図 6C, 7, 表 2）。また、*E. coli* と *R. gnavus* に加えて、*Bacteroides dorei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pasteurianus*, *Parabacteroides merdae*, *Parabacteroides distasonis* はクローン病患者小腸粘膜での存在量が 1%以上かつ非クローン病と比較して 2 倍以上の存在量を示していた（図 6C）。

逆にクローン病患者の小腸粘膜で少なかったのは 25 菌種であり、2 つの解析で共通して抽出されたものは *Streptococcus mitis*, *Abiotrophia para-adiacens*, *Gemella sanguinis* の 3 菌種であった（図 6A, B, 7A）。

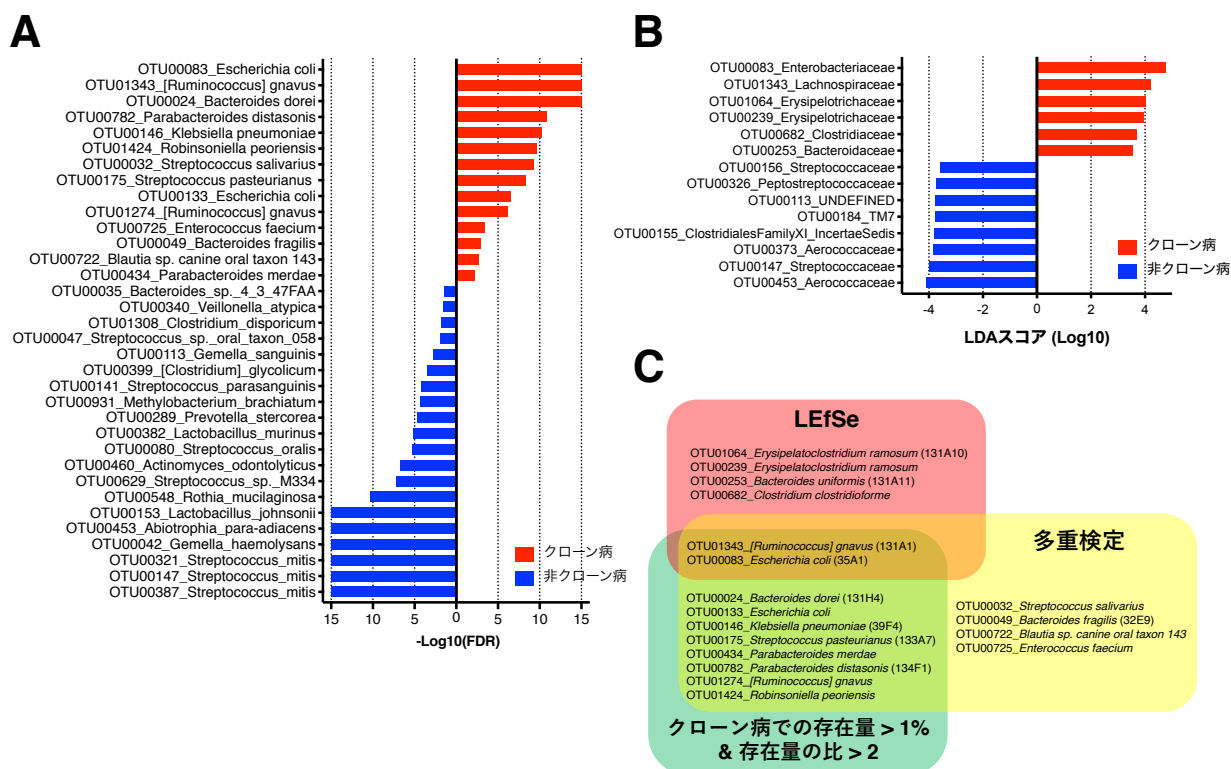


図 6 クローン病の有無による小腸粘膜細菌叢の OTU レベルの比較。multiple t-tests with FDR approach (A), LEfSe (B)および存在量を加味した解析(C).

相対的存在量が0.1%を超えるものを保有ありとした場合、クローン病における *E. coli* や *R. gnavus* の保有率は70%以上を示し、いずれもクローン病に多い傾向であった（図7B, 表2）。

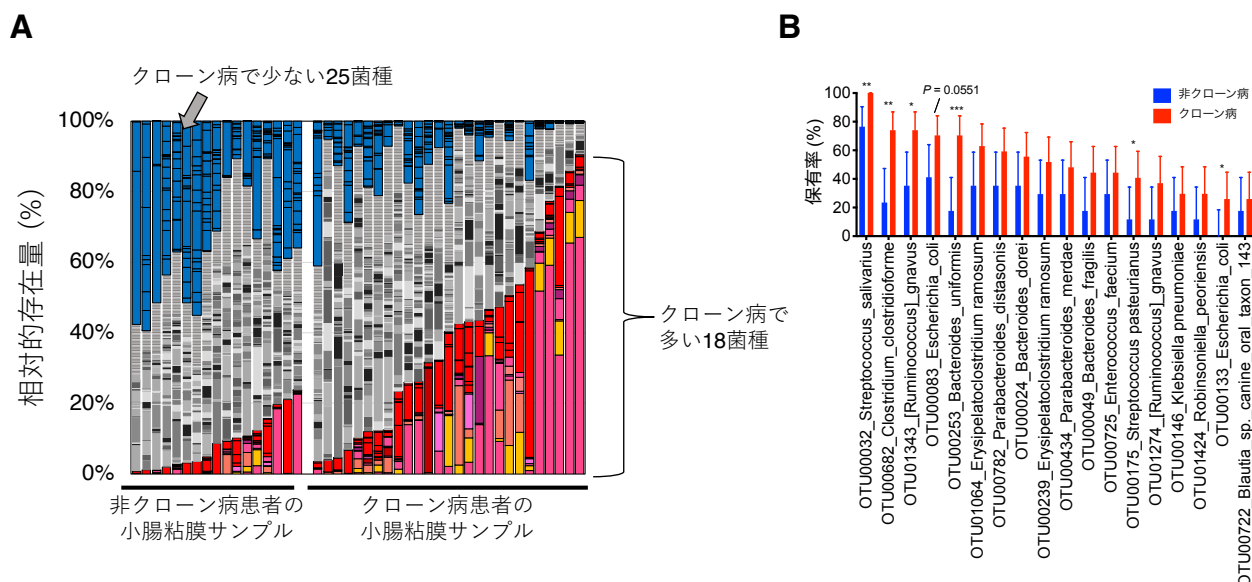


図7 クローン病関連18菌種の存在量と保有率. (A) OTU レベルの存在量. (B) 保有率. 相対的存在量が0.1%を超えるものを保有ありとして算出. AのBarは各サンプル, BのBarは平均値 (rangeは標準偏差). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, カイ二乗検定 (B)

OTU ID	近縁菌種	類似度	菌株ID	相対的存在量 (%)			保有率 (%)		
				非クローン病	クローン病	比	非クローン病	クローン病	比
OTU00024	<i>Bacteroides dorei</i>	99.68	131H4	0.69	2.88	4.1	35.3	55.6	1.6
OTU00049	<i>Bacteroides fragilis</i>	97.77	32E9	0.15	0.90	6.2	17.6	44.4	2.5
OTU00253	<i>Bacteroides uniformis</i>	99.68	131A11	0.18	0.48	2.6	17.6	70.4	4.0
OTU00722	<i>Blautia sp. canine oral taxon 143</i>	99.69		0.07	0.80	11.7	17.6	25.9	1.5
OTU00682	<i>Clostridium clostridioforme</i>	99.69		0.15	0.71	4.7	23.5	74.1	3.1
OTU00725	<i>Enterococcus faecium</i>	98.78		0.14	0.94	6.8	29.4	44.4	1.5
OTU01064	<i>Erysipelatoclostridium ramosum</i>	99.77	131A10	0.10	0.53	5.5	35.3	63.0	1.8
OTU00239	<i>Erysipelatoclostridium ramosum</i>	98.68		0.05	0.26	5.6	29.4	51.9	1.8
OTU00083	<i>Escherichia coli</i>	99.23	Ec-35A1	2.66	14.02	5.3	41.2	70.4	1.7
OTU00133	<i>Escherichia coli</i>	98.71		0.00	1.03	525.7	0	25.9	-
OTU00146	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99.63	39F4	0.05	1.31	26.6	17.6	29.6	1.7
OTU00782	<i>Parabacteroides distasonis</i>	100	134F1	0.29	1.58	5.5	35.3	59.3	1.7
OTU00434	<i>Parabacteroides merdae</i>	100		0.47	1.16	2.5	29.4	48.1	1.6
OTU01424	<i>Robinsoniella peoriensis</i>	94.44		0.13	1.35	10.4	11.8	29.6	2.5
OTU01343	<i>[Ruminococcus] gnavus</i>	99.65	Rg-131A1	0.45	3.78	8.4	35.3	74.1	2.1
OTU01274	<i>[Ruminococcus] gnavus</i>	98.15		0.10	1.10	10.8	11.8	37.0	3.1
OTU00175	<i>Streptococcus pasteurianus</i>	100	133A7	0.08	1.23	14.9	11.8	40.7	3.5
OTU00032	<i>Streptococcus salivarius</i>	99.68		3.11	4.31	1.4	76.5	100.0	1.3

表2 小腸細菌叢におけるクローン病関連18菌種

E. coli と *R. gnavus* がクローン病患者の小腸粘膜で多いのとは異なり、小腸液ではこの2菌種はクローン病と非クローン病間で有意差を認めなかったことから、*E. coli* と *R. gnavus* は粘液層に存在するか腸上皮細胞に接着していることが推測された（図 8A, B）。

また、クローン病患者の中でも、小腸狭窄を有する症例や抗 TNF α 抗体製剤で治療中の症例は *E. coli* を含む Enterobacteriaceae 科の細菌が多い結果であった（図 8C, D）。

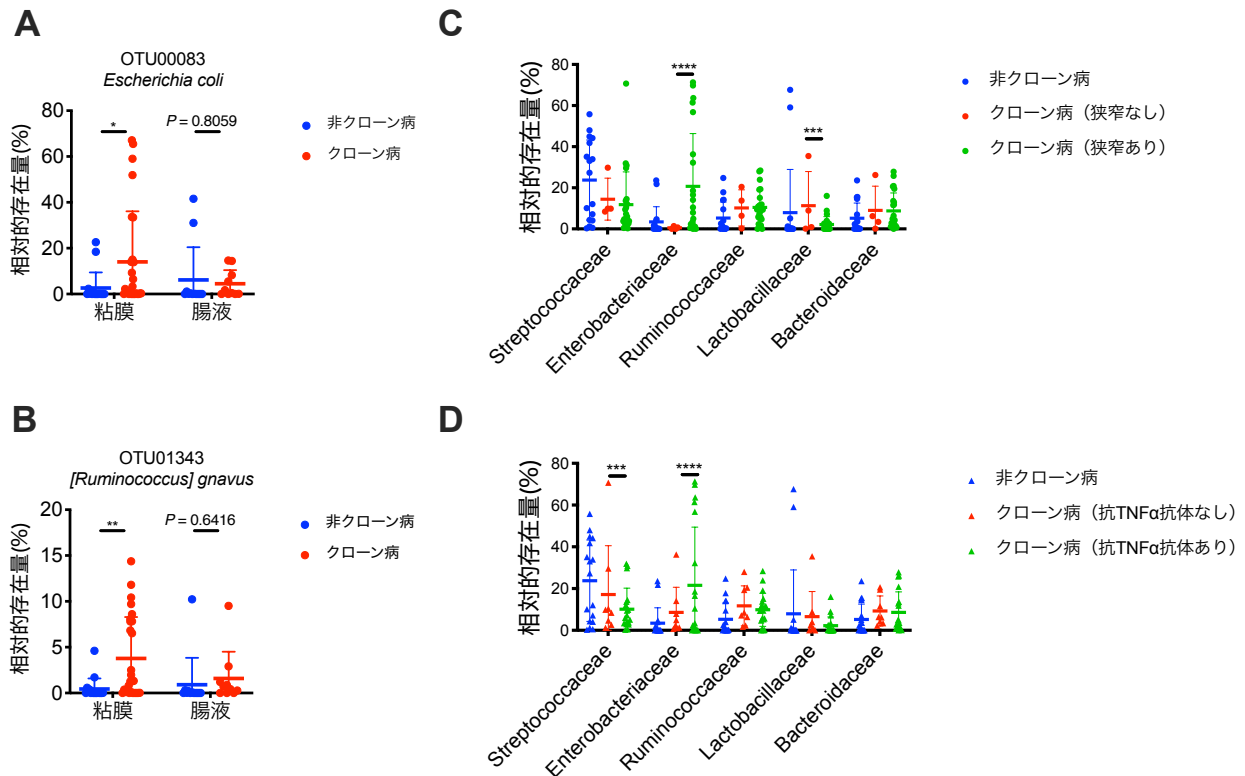


図 8 小腸細菌叢における *Escherichia coli* と *Ruminococcus gnavus* の存在量. (A, B) *E. coli* (A)と *R. gnavus* (B)の小腸粘膜と小腸液における存在量. (C) 小腸狭窄の有無による科レベルの比較. 狭窄の有無での比較. (D) 抗 TNF α 抗体製剤の有無による科レベルの比較. 抗 TNF α 抗体製剤の有無での比較. シンボルは各サンプル, bar は平均値 (range は標準偏差) を示す. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, スチューデントの t 検定(A, B), Multiple t-tests with FDR approach (C, D).

次に、解剖学的部位による菌叢比較を行ったところ、小腸細菌叢は糞便や唾液細菌叢とは異なる菌叢構成を示していた（図 9）。既報と同様に^{19,20}、クローン病患者の糞便では多様度指数の低下が認められ、小腸細菌叢とは異なる傾向であった（図 10）。

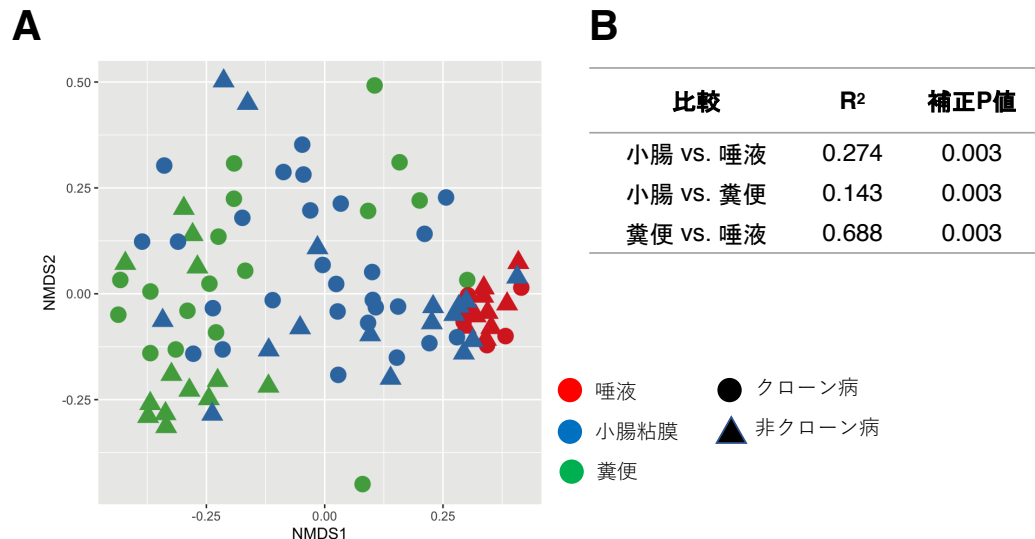


図 9 唾液・小腸・糞便細菌叢の比較. (A) Bray-Curtis distance に基づいた NMDS プロット. クローン病と非クローン病を含む. (B) PERMANOVA. シンボルは各サンプル.

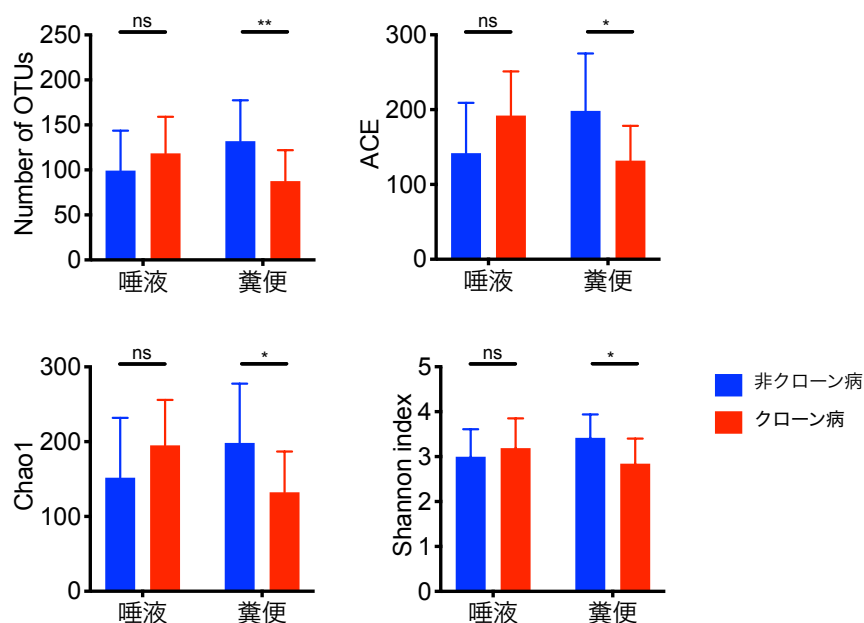


図 10 クローン病の有無による唾液・糞便細菌叢の多様度指数. シンボルは各サンプル, bar は平均値 (range は標準偏差). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns; not significant ($P > 0.05$), スチューデントの t 検定.

既報と同様に^{9,10}, *F. prausnitzii* はクローン病患者の糞便で低下していたが (図 11A, B), 小腸粘膜サンプルでは *F. prausnitzii* の存在量に有意差は認めなかった (図 11B). 一方, クローン病患者の小腸粘膜で多かった *E. coli* と *R. gnavus* に関しては糞便サンプルでは有意差を認めなかった (図 12A, B).

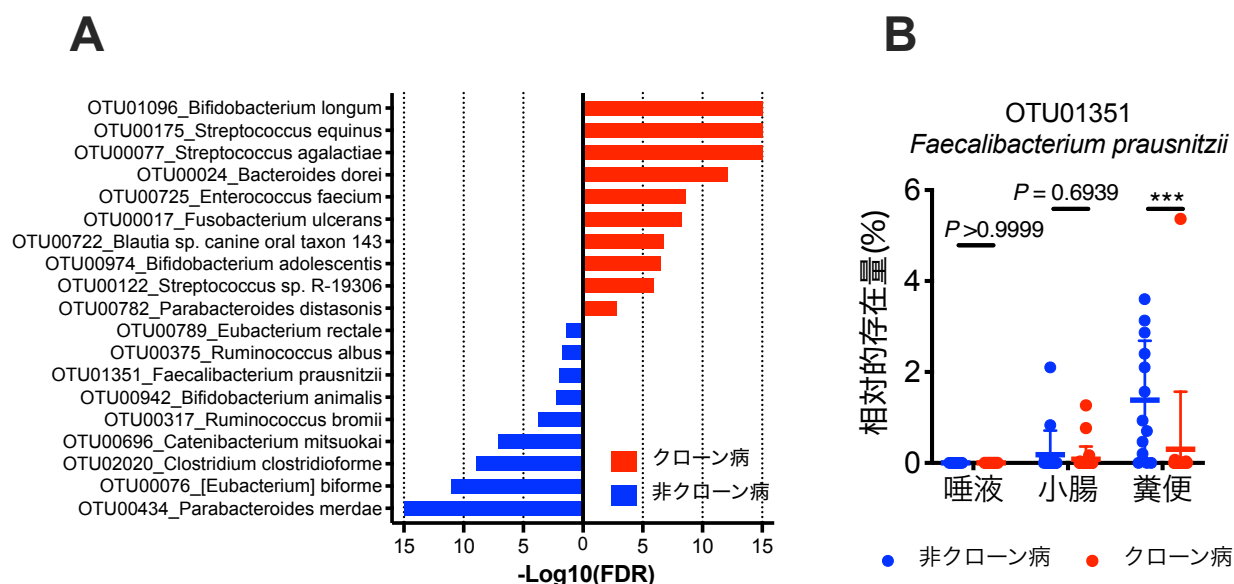


図 11 糞便サンプルの OTU レベルの比較と部位別の *Faecalibacterium prausnitzii* の存在量. (A) Multiple t-tests with FDR approach. (B) 唾液・小腸粘膜・糞便別の *F. prausnitzii* の存在量. B のシンボルは各サンプル, bar と line は平均値 (range は標準偏差). *** $P < 0.001$, スチューデントの t 検定.

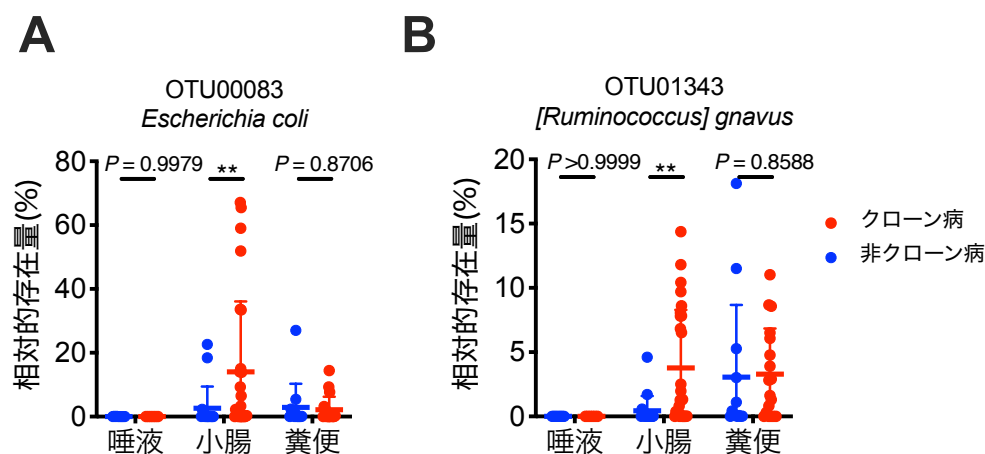


図 12 唾液・小腸・糞便細菌叢における *Escherichia coli* (A) と *Ruminococcus gnavus* (B) の存在量. シンボルは各サンプル, bar は平均値 (range は標準偏差). ** $P < 0.01$, スチューデントの t 検定.

3. 小括

クローン病と非クローン病患者から得られた小腸粘膜細菌叢の比較を行ったところ、糞便細菌叢と異なり小腸細菌叢では α 多様性の減少は認めなかったが、Bray-Curtis distance を用いた菌叢構成比較や、門・科レベルの比較ではクローン病と非クローン病の小腸細菌叢は異なっていた。

小腸粘膜細菌叢の OTU レベルでの比較解析によりクローン病関連菌として 18 菌種が抽出された。そのうち *E. coli* と *R. gnavus* の 2 菌種が強い関連を示し、小腸液よりも小腸粘膜サンプルで多く見られた。さらに *E. coli* を含む Enterobacteriaceae 科の細菌は小腸狭窄や抗 TNF α 抗体製剤との関連を認めた。

結果 3：クローン病関連菌による腸管免疫細胞への影響

1. クローン病関連菌の腸管免疫細胞への影響

クローン病の病態には腸管免疫細胞が重要な役割を果たしており、腸内細菌がそれに影響すると推測されている。そこで、まず小腸粘膜サンプルから複数の培地で好気培養・嫌気培養することにより合計 80 株の菌株を単離した。この 80 菌株のうち 9 菌株が菌叢解析で示されたクローン病関連 18 菌種に含まれていた（表 3）。

OTU ID	近縁菌種	類似度(%)	菌株ID
OTU00253	<i>Bacteroides uniformis</i>	97.49	131A11
OTU01064	<i>Erysipelatoclostridium ramosum</i>	99.77	131A10
OTU00049	<i>Bacteroides fragilis</i>	99.89	32E9
OTU00175	<i>Streptococcus pasteurianus</i>	100	133A7
OTU00146	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99.63	39F4
OTU00782	<i>Parabacteroides distasonis</i>	98.31	134F1
OTU00024	<i>Bacteroides dorei</i>	100	131H4
OTU01343	<i>[Ruminococcus] gnavus</i>	99.65	131A1
OTU00083	<i>Escherichia coli</i>	99.23	35A1

表 3 単離したクローン病関連菌 9 株

これらのクローン病関連 9 菌株の免疫細胞への影響を解析するために無菌マウスを用いた実験を行った。まず個別に培養した 9 菌株を混合し、その菌液を無菌の C57BL/6 マウスに経口投与し 9 菌株のノトバイオートマウスを作出した。その後ビニルアイソレーターで 3 週間飼育した後に、小腸と大腸の粘膜固有層からリンパ球を抽出してフローサイトメトリーで解析した（図 13）。

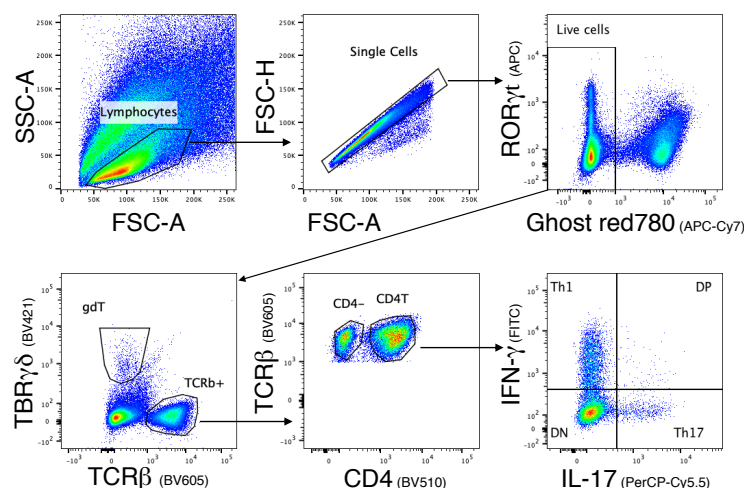


図 13 フローサイトメトリーのゲーティング方法. (A, B) はじめにリンパ球分画およびシングル細胞をゲートした. (C) 次に生細胞をゲートした. (D, E) CD4 陽性 T 細胞は TCRβ 陽性かつ CD4 陽性分画でゲートした細胞とした. (F) CD4 陽性 T 細胞のサイトカインプロット. IFN-γ 産生性 CD4 陽性 T 細胞を TH1 細胞, IL-17 産生性 CD4 陽性 T 細胞を TH17 細胞とした.

クローン病関連 9 菌株 (9-mix) による小腸粘膜固有層のリンパ球への影響は弱いものの、大腸粘膜固有層において強い TH1 細胞誘導能を認め、これは SPF 環境飼育マウスと同等の誘導能であった (図 14A, B) . 大腸の TH17 細胞についても無菌マウスを比べて若干の誘導を認めた (図 14B) .

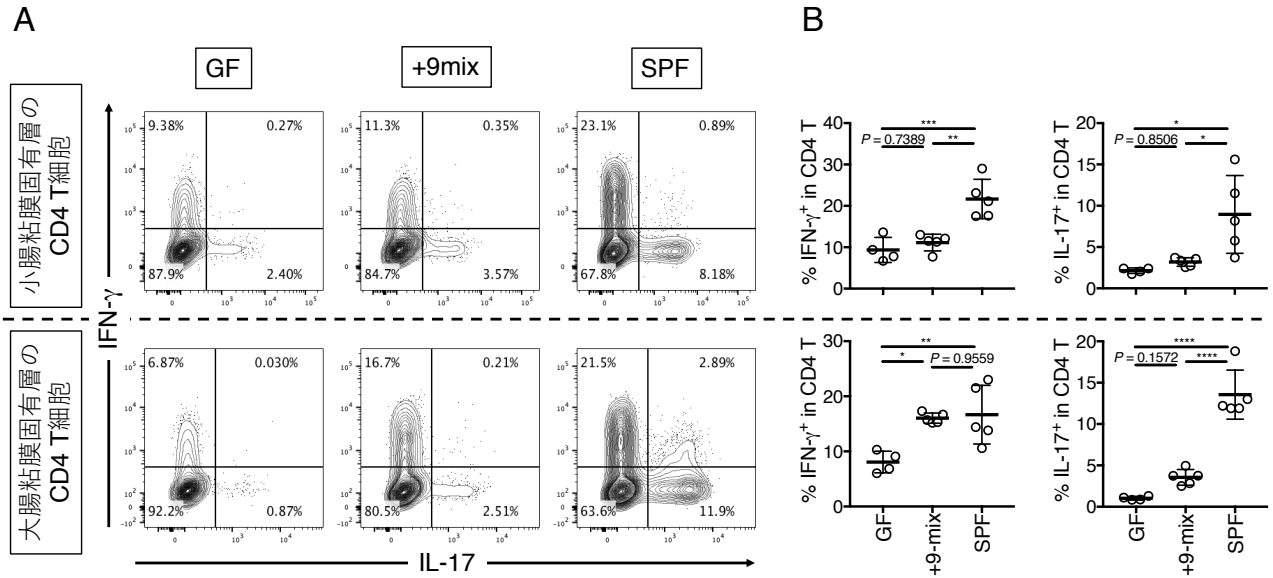


図 14 クローン病関連 9 菌株のマウス腸管 TH1 および TH17 細胞への影響. (A) 代表的フローサイトメトリープロット. 上段が小腸粘膜固有層・下段が大腸粘膜固有層の CD4 陽性 T リンパ球にゲートしたもの. (B) CD4 陽性 T 細胞中の TH1 および TH17 細胞の存在割合. B のシンボルは各サンプル, line は平均値 (range は標準偏差) . * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, one-way ANOVA with Turkey's post hoc test (B)

また、誘導された TH1 および TH17 細胞はクローン病の感受性遺伝子の一つである TNFSF15 のレセプターである death receptor 3 (DR3)を発現していた (図 15A, B) .

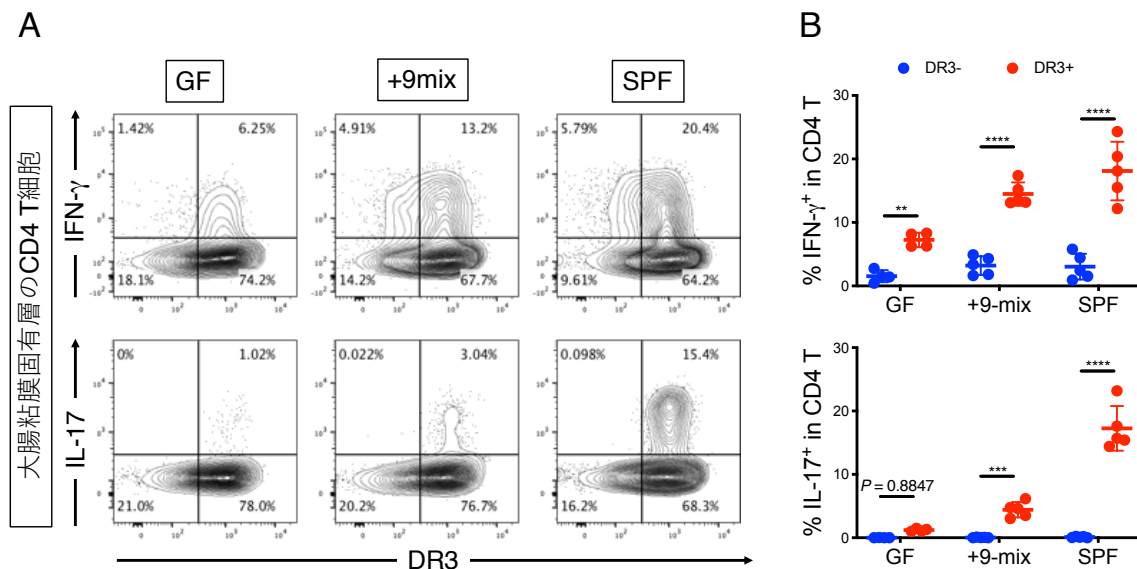


図 15 マウス大腸粘膜 TH1 細胞および TH17 細胞の death receptor 3 (DR3)発現. (A) 代表的フローサイトメトリープロット. 大腸粘膜固有層の CD4 陽性 T リンパ球にゲートしたもの. (B) CD4 陽性 T 細胞中の DR3 発現別の TH1 および TH17 細胞の存在割合. DR3 陽性●, DR3 陰性○. B のシンボルは各サンプル, line は平均値 (range は標準偏差). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, 2 way-ANOVA with Bonferroni's post hoc test (B)

2. クローン病関連 *E. coli* と *R. gnavus* の腸管免疫細胞への影響

次にクローン病関連 9 菌株のうち、統計学的解析で強い関連を認めた *E. coli* 35A1 と *R. gnavus* 131A1 について、2 菌株を混合した 2-mix とそれぞれの単菌株のノトバイオートマウスを作出して解析した。2-mix と *E. coli* 35A1 は大腸粘膜固有層において 9-mix と同等の TH1 細胞誘導能を認めた (図 16A, B)。一方、*R. gnavus* 131A1 による TH1 細胞誘導は弱かった。このことから *E. coli* 35A1 が TH1 細胞誘導における重要な役割を果たしていると考えられた。また、2-mix と *E. coli* 35A1 は 9-mix と同等の TH17 細胞の誘導能を示したが、SPF マウスよりは弱いものであった (図 16A, B)。

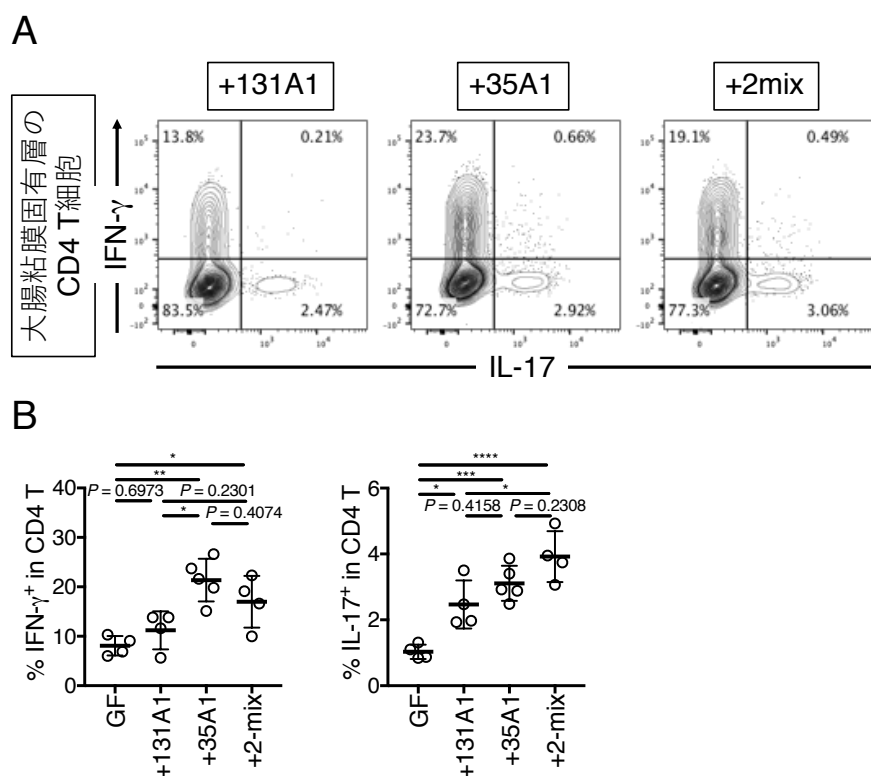


図 16 クローン病関連 *Escherichia coli* と *Ruminococcus gnavus* のマウス大腸粘膜 TH1 細胞および TH17 細胞への影響. (A) 代表的フローサイトメトリープロット. 大腸粘膜固有層の CD4 陽性 T リンパ球にゲートしたもの. (B) CD4 陽性 T 細胞中の TH1 および TH17 細胞の存在割合. B のシンボルは各サンプル, line は平均値 (range は標準偏差). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, one-way ANOVA with Turkey's post hoc test (B)

最後に *E. coli* 35A1 による TH1 および TH17 細胞の誘導能が菌種または菌株によるものを明らかにするために、クローン病関連大腸菌として知られている adherent-invasive *E. coli* LF82 株¹²、および実験用大腸菌として使用される *E. coli* MG1655 株 (*E. coli* K-12 由来株) と比較した。35A1 株と比べ、LF82 株と MG1655 株の大腸粘膜固有層における TH1 誘導能は有意に弱いものであった (図 17A, B)。

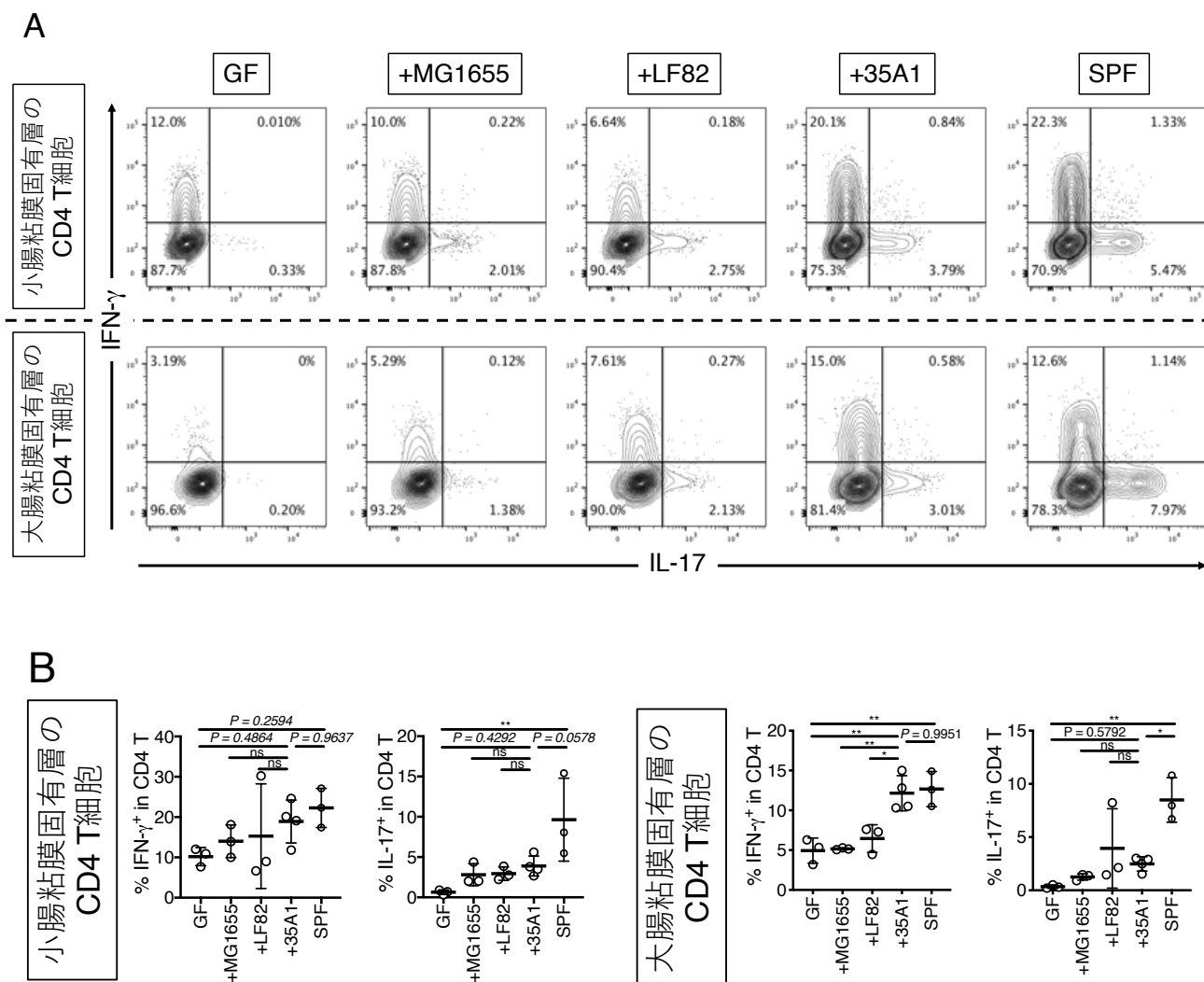


図 17 *Escherichia coli* 菌株別のマウス腸管 TH1 細胞および TH17 細胞への影響. (A) 代表的フローサイトメトリプロット. 上段が小腸粘膜固有層・下段が大腸粘膜固有層の CD4 陽性 T リンパ球にゲートしたもの. (B, C) CD4 陽性 T 細胞中の TH1 (B) および TH17 細胞 (C) の存在割合. B, C のシンボルは各サンプル, line は平均値 (range は標準偏差). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, one-way ANOVA with Turkey's post hoc test (B, C)

3. 小括

小腸粘膜細菌叢の統計学的解析で抽出されたクローン病関連菌による腸管免疫細胞への影響について、無菌マウスを用いて解析を行った。クローン病関連 18 菌種のうち単離できた 9 菌株のノトバイオートマウスでは小腸粘膜固有層のリンパ球への影響は弱かったが、大腸粘膜固有層において強い TH1 細胞の誘導を認めた。この 9 菌株の中でクローン病関連 *E. coli* 35A1 が TH1 細胞誘導に重要な役割を果たしていることが示された。また、*E. coli* 35A1 と比べて、adherent-invasive *E. coli* LF82 株や *E. coli* MG1655 株などの異なる大腸菌株では TH1 細胞誘導能が弱いことから、この誘導能は菌株依存的なメカニズムによるものと考えられた。

考察

1. 小腸粘膜細菌叢の解析について

これまでにダブルバルーン小腸内視鏡で採取されたサンプルを用いた小腸細菌叢解析はほとんどなされていない。腸内細菌は解剖学的部位（長軸方向）により異なることに加えて、管腔中と粘膜上に存在する細菌叢も異なることが知られている^{17,21,22}。腸内細菌の多くは管腔内に存在しているが、腸上皮間の niche や腸上皮直上の粘液層に定着しうる細菌が存在する。これには粘液分解能や腸上皮付着能、酸素嗜好性などの因子が関係している。これらは粘膜関連細菌（mucosa-associated microbiota; MAM）と呼称され、宿主への影響や疾患との関連が示唆されている^{23,24}。本研究により小腸細菌叢でも粘膜サンプルと管腔サンプルで異なることが示された。これまでに粘膜に付着する細菌が宿主腸管免疫に影響することが報告されていることから²⁴⁻²⁶、クローン病の細菌叢解析には粘膜サンプルを用いた。

経肛門的挿入時の前処置（腸管洗浄）は糞便菌叢へ影響することから^{18,27}、同様に小腸細菌叢への影響も懸念された。本研究では前処置の有無を直接比較することは困難であったが、経肛門的挿入と前処置を要しない経口的挿入を比較することにより前処置の影響を間接的に解析した。その結果、同一症例においては挿入経路による細菌叢への影響が見られ、その理由として経肛門的挿入時の腸管洗浄の影響や採取部位が厳密には異なるためと考えられた。一方、異なる症例では挿入経路による差は認められなかった。これは挿入経路による差以上に個人間の細菌叢の差が大きいことによるためと推測された。このことから個人間比較を主たる目的とする本研究ではいずれの挿入経路も対象に含めて解析を行なった。

2. クローン病関連菌と腸管免疫

これまでにクローン病と腸内細菌叢の関連について、多様性の減少や *F. prausnitzii* など防御的細菌の減少、炎症誘導性の細菌の増加などが報告されている^{11,20}。しかし、クローン病関連菌の宿主免疫への影響に関する研究は多くはない。本研究ではこれまでの方法と異なり、糞便ではなく小腸粘膜サンプルを採取することにより小腸細菌叢の解析を行った。さらにクローン病患者の小腸粘膜から 80 株の細菌を単離し、クローン病関連 *E. coli* がマウス大腸において強い TH1 細胞誘導能を有することを示した。

これまでにクローン病関連 *E. coli* として LF82 株が知られており¹²、腸上皮細胞への接着能・侵入能およびマクロファージ内での増殖能を有することから adherent-invasive *E. coli* (AIEC) と呼称されている^{28,29}。さらに LF82 株では Vat-AIEC による粘液分解や、1 型線毛と宿主腸上皮表面分子の CEACAM6 の接着、鞭毛による TLR5 の活性化などの機能・メカニズムが報告されている³⁰⁻³⁴。今回、クローン病患者の小腸粘膜から単離された *E. coli* 35A1 は LF82 株を比較して、より強力に TH1 細胞を誘導することが示された。このメカニズムは不明であるが、*E. coli* 35A1 が固有の病原因子を有することが示唆された。

クローン病関連菌がマウスの大腸粘膜固有層の TH1 細胞を誘導したのに対し、小腸においては TH1 細胞の誘導が見られなかった。 *E. coli* 35A1 株はクローン病患者の小腸粘膜だけではなく大腸粘膜にも存在していたことから（データ未掲載）、大腸粘膜に親和性を有することで免疫細胞を誘導したと推測される。小腸での誘導が見られなかった原因については、ヒトとマウスの違いによって細菌の定着が影響を受けた可能性がある。例えば AIEC LF82 株は上述のようにヒトの腸上皮細胞表面に発現する CEACAM6 に接着するが³¹、本分子はマウスには認めない。また、マウス常在の segmented filamentous bacteria (SFB) はマウス小腸において TH17 細胞を誘導し、ラット常在の SFB はラット小腸の TH17 細胞を誘導するが、ラット常在の SFB はマウス小腸の TH17 細胞を誘導しない³⁵。これらは宿主生物種の違いが細菌の腸管への定着や免疫細胞誘導に影響を与える可能性があることを示唆している。

小腸細菌叢解析でクローン病関連菌として抽出された *R. gnavus* は、これまでもクローン病との関連が報告されていることから病態との関連が示唆される。*R. gnavus* は少なくとも 2 つの群に分けられ、一つはクローン病に多く認められることが報告されている³⁶。このクローン病関連 *R. gnavus* は炎症性多糖を産生し、TLR4 を介して樹状細胞からの TNF- α の分泌を誘導する³⁷。今回の *R. gnavus* 131A1 は宿主免疫に対する影響は弱かったものの、*R. gnavus* は粘液分解能やシアル酸産生能を有することから、他のクローン病関連菌の腸上皮接着やシアル酸利用菌の増殖などを促進する役割を有している可能性がある^{38,39}。*E. coli* と *R. gnavus* の単菌定着マウスよりも、2mix や 9-mix 定着マウスの方が TH17 細胞が誘導される傾向にあったことは、*R. gnavus* の支持的作用を示唆していると考えられた。

3. 本研究の限界

本研究は比較的少数の対象者によるもので、コントロール群の背景疾患が多様であることから性別や挿入経路（それにとまなう前処置の有無）などに差があるなど、いくつかの限界を有する。また、マウスを用いた免疫細胞の解析はヒトと異なる可能性もある。

クローン病患者の 55.6% が整腸剤を内服していたのに対し、非クローン病患者で整腸剤を内服していたのは 5.9% であったことから、整腸剤による腸内細菌叢への影響は完全に否定はできない。しかしながら、*Clostridium butyricum*（ミヤ BM，ミヤリサン製薬，長野）や *Bifidobacterium bifidum*（ビオフェルミン，ビオフェルミン製薬，神戸）などは小腸粘膜検体と糞便とで検出されなかった。また，*Bifidobacterium longum*（ラックビー，興和，東京）は，小腸粘膜では非クローン病群 0.2%，クローン病 0.6%（うち服用者 1.5%），糞便では非クローン病群 1.3%，クローン病 4.0%（うち服用者 2.3%）という存在量であった。

まとめ

本研究はダブルバルーン内視鏡を用いることによって、これまでほとんど明らかとなっていないクローン病の小腸粘膜細菌叢を解析した。小腸粘膜は糞便とは異なる細菌叢を有しており、統計学的解析により 18 種のクローン病関連菌が抽出された。無菌マウスを用いた実験により、これらのクローン病関連菌は腸管の TH1 細胞を誘導し、そのうちクローン病関連 *E. coli* が特に強い TH1 細胞誘導能を有することが示された。この誘導能は他の *E. coli* 株では認められなかったことから、菌株依存的なメカニズムが存在することが示唆された。以上により、クローン病関連 *E. coli* をはじめとするクローン病特有の炎症細胞誘導性の細菌は新規治療につながる有望なターゲットになりうると考えられた。

参考文献

1. Torres, J., S. Mehandru, J.-F. Colombel and L. Peyrin-Biroulet. Crohn's disease. *The Lancet* 389(10080): 1741-1755, 2017.
2. Franke, A., D. P. McGovern, J. C. Barrett, K. Wang, G. L. Radford-Smith, T. Ahmad, C. W. Lees, T. Balschun, J. Lee, R. Roberts, C. A. Anderson, J. C. Bis, S. Bumpstead, D. Ellinghaus, E. M. Festen, M. Georges, T. Green, T. Haritunians, L. Jostins, A. Latiano, C. G. Mathew, G. W. Montgomery, N. J. Prescott, S. Raychaudhuri, J. I. Rotter, P. Schumm, Y. Sharma, L. A. Simms, K. D. Taylor, D. Whiteman, C. Wijmenga, R. N. Baldassano, M. Barclay, T. M. Bayless, S. Brand, C. Buning, A. Cohen, J. F. Colombel, M. Cottone, L. Stronati, T. Denson, M. De Vos, R. D'Inca, M. Dubinsky, C. Edwards, T. Florin, D. Franchimont, R. Gearry, J. Glas, A. Van Gossom, S. L. Guthery, J. Halfvarson, H. W. Verspaget, J. P. Hugot, A. Karban, D. Laukens, I. Lawrance, M. Lemann, A. Levine, C. Libioulle, E. Louis, C. Mowat, W. Newman, J. Panes, A. Phillips, D. D. Proctor, M. Regueiro, R. Russell, P. Rutgeerts, J. Sanderson, M. Sans, F. Seibold, A. H. Steinhart, P. C. Stokkers, L. Torkvist, G. Kullak-Ublick, D. Wilson, T. Walters, S. R. Targan, S. R. Brant, J. D. Rioux, M. D'Amato, R. K. Weersma, S. Kugathasan, A. M. Griffiths, J. C. Mansfield, S. Vermeire, R. H. Duerr, M. S. Silverberg, J. Satsangi, S. Schreiber, J. H. Cho, V. Annese, H. Hakonarson, M. J. Daly and M. Parkes. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 42(12): 1118-1125, 2010.
3. Liu, J. Z., S. van Sommeren, H. Huang, S. C. Ng, R. Alberts, A. Takahashi, S. Ripke, J. C. Lee, L. Jostins, T. Shah, S. Abedian, J. H. Cheon, J. Cho, N. E. Dayani, L. Franke, Y. Fuyuno, A. Hart, R. C. Juyal, G. Juyal, W. H. Kim, A. P. Morris, H. Poustchi, W. G. Newman, V. Midha, T. R. Orchard, H. Vahedi, A. Sood, J. Y. Sung, R. Malekzadeh, H. J. Westra, K. Yamazaki, S. K. Yang, C. International Multiple Sclerosis Genetics, I. B. D. G. C. International, J. C. Barrett, B. Z. Alizadeh, M. Parkes, T. Bk, M. J. Daly, M. Kubo, C. A. Anderson and R. K. Weersma. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet* 47(9): 979-986, 2015.
4. Sartor, R. B. and G. D. Wu. Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology* 152(2): 327-339 e324, 2017.
5. Honda, K. and D. R. Littman. The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu Rev Immunol* 30: 759-795, 2012.
6. Sartor, R. B.. Intestinal microflora in human and experimental inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 17(4): 324-330, 2001.
7. Kostic, A. D., R. J. Xavier and D. Gevers. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* 146(6): 1489-1499, 2014.
8. Pascale, A., N. Marchesi, C. Marelli, A. Coppola, L. Luzi, S. Govoni, A. Giustina and C. Gazzaruso. Microbiota and metabolic diseases. *Endocrine* 61(3): 357-371, 2018.

9. Wright, E. K., M. A. Kamm, S. M. Teo, M. Inouye, J. Wagner and C. D. Kirkwood. Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome in Crohn's disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis* 21(6): 1219-1228, 2015.
10. Rajca, S., V. Grondin, E. Louis, G. Vernier-Massouille, J. C. Grimaud, Y. Bouhnik, D. Laharie, J. L. Dupas, H. Pillant, L. Picon, M. Veyrac, M. Flamant, G. Savoye, R. Jian, M. Devos, G. Paintaud, E. Piver, M. Allez, J. Y. Mary, H. Sokol, J. F. Colombel and P. Seksik. Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 20(6): 978-986, 2014.
11. Sokol, H., B. Pigneur, L. Watterlot, O. Lakhdari, L. G. Bermudez-Humaran, J. J. Gratadoux, S. Blugeon, C. Bridonneau, J. P. Furet, G. Corthier, C. Grangette, N. Vasquez, P. Pochart, G. Trugnan, G. Thomas, H. M. Blottiere, J. Dore, P. Marteau, P. Seksik and P. Langella. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(43): 16731-16736, 2008.
12. Darfeuille-Michaud, A., C. Neut, N. Barnich, E. Lederman, P. Di Martino, P. Desreumaux, L. Gambiez, B. Joly, A. Cortot and J. F. Colombel. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115(6): 1405-1413, 1998.
13. Palmela, C., C. Chevarin, Z. Xu, J. Torres, G. Sevrin, R. Hirten, N. Barnich, S. C. Ng and J. F. Colombel. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut* 67(3): 574-587, 2018.
14. Yamamoto, H. and K. Sugano. A new method of enteroscopy--the double-balloon method. *Can J Gastroenterol* 17(4): 273-274, 2003.
15. Sunada, K., S. Shinozaki, M. Nagayama, T. Yano, T. Takezawa, Y. Ino, H. Sakamoto, Y. Miura, Y. Hayashi, H. Sato, A. K. Lefor and H. Yamamoto. Long-term Outcomes in Patients with Small Intestinal Strictures Secondary to Crohn's Disease After Double-balloon Endoscopy-assisted Balloon Dilation. *Inflamm Bowel Dis* 22(2): 380-386, 2016.
16. Segata, N., J. Izard, L. Waldron, D. Gevers, L. Miropolsky, W. S. Garrett and C. Huttenhower. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 12(6): R60, 2011.
17. Watt, E., M. R. Gemmell, S. Berry, M. Glaire, F. Farquharson, P. Louis, G. I. Murray, E. El-Omar and G. L. Hold. Extending colonic mucosal microbiome analysis--assessment of colonic lavage as a proxy for endoscopic colonic biopsies. *Microbiome* 4(1): 61, 2016.
18. Jalanka, J., A. Salonen, J. Salojarvi, J. Ritari, O. Immonen, L. Marciani, P. Gowland, C. Hoad, K. Garsed, C. Lam, A. Palva, R. C. Spiller and W. M. de Vos. Effects of bowel cleansing on the intestinal microbiota. *Gut* 64(10): 1562-1568, 2015.
19. Tamboli, C. P., C. Neut, P. Desreumaux and J. F. Colombel. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 53(1): 1-4, 2004.
20. Nishida, A., R. Inoue, O. Inatomi, S. Bamba, Y. Naito and A. Andoh. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol* 11(1): 1-10, 2018.
21. Durban, A., J. J. Abellan, N. Jimenez-Hernandez, M. Ponce, J. Ponce, T. Sala, G. D'Auria, A.

- Latorre and A. Moya. Assessing gut microbial diversity from feces and rectal mucosa. *Microb Ecol* 61(1): 123-133, 2011.
- Fung, T. C., D. Artis and G. F. Sonnenberg. Anatomical localization of commensal bacteria in immune cell homeostasis and disease. *Immunol Rev* 260(1): 35-49, 2014.
22. Ringel, Y., N. Maharshak, T. Ringel-Kulka, E. A. Wolber, R. B. Sartor and I. M. Carroll. High throughput sequencing reveals distinct microbial populations within the mucosal and luminal niches in healthy individuals. *Gut Microbes* 6(3): 173-181, 2015.
 23. Fung, T. C., D. Artis and G. F. Sonnenberg. Anatomical localization of commensal bacteria in immune cell homeostasis and disease. *Immunol Rev* 260(1): 35-49, 2014.
 24. Assa, A., J. Butcher, J. Li, A. Elkadri, P. M. Sherman, A. M. Muise, A. Stintzi and D. Mack. Mucosa-Associated Ileal Microbiota in New-Onset Pediatric Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 22(7): 1533-1539, 2016.
 25. Gevers, D., S. Kugathasan, L. A. Denson, Y. Vazquez-Baeza, W. Van Treuren, B. Ren, E. Schwager, D. Knights, S. J. Song, M. Yassour, X. C. Morgan, A. D. Kostic, C. Luo, A. Gonzalez, D. McDonald, Y. Haberman, T. Walters, S. Baker, J. Rosh, M. Stephens, M. Heyman, J. Markowitz, R. Baldassano, A. Griffiths, F. Sylvester, D. Mack, S. Kim, W. Crandall, J. Hyams, C. Huttenhower, R. Knight and R. J. Xavier. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* 15(3): 382-392, 2014.
 26. Johansson, M. E. Mucus layers in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 20(11): 2124-2131, 2014.
 27. Drago, L., M. Toscano, R. De Grandi, V. Casini and F. Pace. Persisting changes of intestinal microbiota after bowel lavage and colonoscopy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 28(5): 532-537, 2016.
 28. Boudeau, J., A. L. Glasser, E. Masseret, B. Joly and A. Darfeuille-Michaud. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* 67(9): 4499-4509, 1999.
 29. Darfeuille-Michaud, A., J. Boudeau, P. Bulois, C. Neut, A. L. Glasser, N. Barnich, M. A. Bringer, A. Swidsinski, L. Beaugerie and J. F. Colombel. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127(2): 412-421, 2004.
 30. Gibold, L., E. Garenaux, G. Dalmasso, C. Gallucci, D. Cia, B. Mottet-Auselo, T. Fais, A. Darfeuille-Michaud, H. T. Nguyen, N. Barnich, R. Bonnet and J. Delmas. The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 18(5): 617-631, 2016.
 31. Barnich, N., F. A. Carvalho, A. L. Glasser, C. Darcha, P. Jantscheff, M. Allez, H. Peeters, G. Bommelaer, P. Desreumaux, J. F. Colombel and A. Darfeuille-Michaud. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 117(6): 1566-1574, 2007.
 32. Carvalho, F. A., N. Barnich, A. Sivignon, C. Darcha, C. H. Chan, C. P. Stanners and A. Darfeuille-Michaud. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* 206(10): 2179-2189,

2009.

33. Dreux, N., J. Denizot, M. Martinez-Medina, A. Mellmann, M. Billig, D. Kisiela, S. Chattopadhyay, E. Sokurenko, C. Neut, C. Gower-Rousseau, J. F. Colombel, R. Bonnet, A. Darfeuille-Michaud and N. Barnich. Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathog* 9(1): e1003141, 2013.
34. Carvalho, F. A., N. Barnich, P. Sauvanet, C. Darcha, A. Gelot and A. Darfeuille-Michaud. Crohn's disease-associated *Escherichia coli* LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin. *Inflamm Bowel Dis* 14(8): 1051-1060, 2008.
35. Atarashi, K., Tanoue, T., Ando, M., Kamada, N., Nagano, Y., Narushima, S., Suda, W., Imaoka, A., Setoyama, H., Nagamori, T., Ishikawa, E., Shima, T., Hara, T., Kado, S., Jinnohara, T., Ohno, H., Kondo, T., Toyooka, K., Watanabe, E., Yokoyama, S., Tokoro, S., Mori, H., Noguchi, Y., Morita, H., Ivanov, I.I., Sugiyama, T., Nuñez, G., Camp, J.G., Hattori, M., Umesaki, Y. and Honda, K. Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* 163(2):367-380, 2015.
36. Hall, A. B., M. Yassour, J. Sauk, A. Garner, X. Jiang, T. Arthur, G. K. Lagoudas, T. Vatanen, N. Fornelos, R. Wilson, M. Bertha, M. Cohen, J. Garber, H. Khalili, D. Gevers, A. N. Ananthakrishnan, S. Kugathasan, E. S. Lander, P. Blainey, H. Vlamakis, R. J. Xavier and C. Huttenhower. A novel *Ruminococcus gnavus* clade enriched in inflammatory bowel disease patients. *Genome Med* 9(1): 103, 2017.
37. Henke, M. T., D. J. Kenny, C. D. Cassilly, H. Vlamakis, R. J. Xavier and J. Clardy. *Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(26): 12672-12677, 2019.
38. Bell, A., J. Brunt, E. Crost, L. Vaux, R. Nepravishta, C. D. Owen, D. Latousakis, A. Xiao, W. Li, X. Chen, M. A. Walsh, J. Claesen, J. Angulo, G. H. Thomas and N. Juge. Elucidation of a sialic acid metabolism pathway in mucus-foraging *Ruminococcus gnavus* unravels mechanisms of bacterial adaptation to the gut. *Nat Microbiol* 4(12): 2393-2404, 2019.
39. Ng, K. M., J. A. Ferreyra, S. K. Higginbottom, J. B. Lynch, P. C. Kashyap, S. Gopinath, N. Naidu, B. Choudhury, B. C. Weimer, D. M. Monack and J. L. Sonnenburg. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* 502(7469): 96-99, 2013.