

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09358

研究課題名(和文)十二指腸粘膜バリアを標的とした機能性ディスペプシア治療薬開発に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa associated dysbiosis and the expression of tight junction protein in functional dyspepsia.

研究代表者

福居 顕文 (Fukui, Akifumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60725307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：機能性ディスペプシア(Functional dyspepsia: FD)は器質的異常を伴わない不快な上腹部症状を示す疾患である。患者Quality of lifeを損なうため、その病態解明、新規治療戦略開拓は重要な課題である。FD病態形成には、十二指腸粘膜バリア維持機構破綻・免疫異常の関与が示唆されているが、その機序は未だ明らかでない。我々は本研究課題において、十二指腸粘膜バリア維持機構と密に相関する十二指腸粘膜関連細菌叢解析を行い、FD患者口腔内、十二指腸粘膜ではStreptococcus属占有率が高いこと、両群Streptococcus属占有率とFD症状に相関があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管バリア機構が全身臓器と密接な相互関係の中で、免疫・炎症応答に関与していることが明らかになり、「臓器連関」というコンセプトを通じ、革新的な予防法・治療法の開発が期待されている。本研究課題において、本来口腔内細菌であるStreptococcus属がFD患者では十二指腸粘膜関連細菌叢(MAM)として定着していること、Streptococcus属占有率とFD症状に相関があることを明らかにし、研究成果を論文投稿、学会発表を通じ社会に発信した。

今後、MAMと十二指腸粘膜バリア維持機構破綻・免疫応答との関連をより明らかにし、口腔内細菌叢を標的とした新規FD治療戦略開拓に繋がる可能性があるものとする。

研究成果の概要(英文)：Functional dyspepsia (FD) is associated with poor health-related quality of life. Recent evidence suggests that the main pathogenesis suspect is the gut mucosa-associated microbiota (MAM). However, little is known about the MAM in FD subjects. The aim of this study was to clarify the relationship between upper gastrointestinal symptoms in FD and the characteristics of the gastrointestinal MAM. Between FD and healthy control subjects, only the phylum Firmicutes was increased in FD compared to healthy control subjects in all sites of the upper gut. At the genus level, Streptococcus was significantly increased in all sites in the upper gut in FD. The relative abundance of Streptococcus was positively correlated with upper gastrointestinal symptoms in each upper gut group. Taken together, these findings suggest that Streptococcus is a bacterium strongly correlated with upper gastrointestinal symptoms in FD.

研究分野：消化器内科学

キーワード：機能性ディスペプシア 腸内細菌叢 Streptococcus属 十二指腸粘膜 タイトジャンクション

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 機能性消化管障害の1つである機能性ディスぺプシア (Functional dyspepsia: FD) は、器質的異常を伴わない不快な上腹部症状を示し患者 Quality of life を著しく低下させる疾患であり、本邦では約 20%もの罹患率が推定されている。疾患概念が明確になるにつれて、2013年3月に FD という保険病名が本邦に誕生し、2014年4月には日本消化器病学会の FD 診療ガイドラインが発刊された。また、2016年5月には、10年ぶりの改訂版として Rome 基準が発刊され、近年、国内外を問わず機能性消化管障害の診断・治療に多くの注目が集まっている<sup>1,2)</sup>。

(2) FD の病態形成には、乳幼児期や成長期のストレス、遺伝子異常などを契機に、ストレス過剰応答性を獲得し、食生活や生活習慣の乱れ、酸分泌異常などの修飾が加わることにより、最終的に胃運動機能異常 (胃適応性弛緩障害ならびに胃排出能障害)、内臓知覚過敏が誘発されることが原因の一つと考えられている<sup>3)</sup>。近年、この FD 病態の責任部位として十二指腸 (粘膜) が重要であることが指摘されつつある。実際に、欧米人を対象とした臨床研究では、FD 患者の十二指腸粘膜内では好酸球、脂肪細胞、マクロファージが増加しており十二指腸粘膜の免疫異常が FD 発症に関与していること、FD 患者では十二指腸粘膜透過性が亢進していることが報告されている<sup>4)</sup>。

(3) しかしながら、FD 患者を対象とした十二指腸の粘膜免疫異常や粘膜バリア維持機構の破綻メカニズムに関しては十分には解明されておらず、透過性に関与する tight junction (TJ) 構成蛋白質との関連、また、我々が近年、基礎・臨床研究の軸としている粘膜関連細菌叢との関連については詳細な検討が必要となっており、新たな視点での FD 病態の機序解明ならびに予防・治療薬の創生につながる探索研究が必要である。

### 2. 研究の目的

(1) 消化管バリア維持機構を考慮した新規標的分子を探索研究するうえで、糞便中ではなく、粘膜上皮に近接し粘液中に存在する粘膜関連細菌叢ならびにその代謝物が重要視されている<sup>5)</sup>：消化管バリア機構が全身臓器と密接な相互関係の中で、免疫・炎症応答に関与していることが明らかになり、「臓器連関」というコンセプトを通じ、革新的な予防法・治療法の開発が期待されている。我々は、本研究を開始するにあたり、消化管粘膜における炎症・免疫応答と細菌叢との相互作用を解明するために、消化管 MAM 解析の重要性に着目し、世界標準となる内視鏡下採取検体を用いた 16S rRNA メタゲノム解析手法を確立した<sup>6)</sup>。

(2) 本研究の最終目的は、機能性消化管障害と考えられている FD 病態に、十二指腸粘膜における器質的異常が関与していることを明らかにするものである。3年間の基盤研究により、十二指腸粘膜における「粘膜関連細菌叢 - 腸管バリア維持機能・腸管粘膜免疫機構」という基軸をもとに革新的な FD の予防・治療法に発展するシーズ開発を目的とした。このため、バリア維持機能に関わる粘膜関連細菌叢解析を主体とした解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### 【研究計画】

【概要】腸管バリア維持機能に関与する粘膜関連細菌叢の解析手法の確立と研究データの統合的解析を行った。

#### 【研究方法】

(1) ヒト内視鏡下採取検体を利用した 16S rRNA メタゲノム解析方法を確立する。内視鏡下採取検体に適した保存液および粘膜組織の RNA の品質を落とさない RNA 抽出方法を確立する。研究グループ全体で手法を共有するだけでなく、内視鏡下採取検体の 16S rRNA メタゲノム解析における世界標準となるような手法提案を目指す。

(2) FD 患者の十二指腸粘膜関連細菌叢およびその細菌叢における代謝パスウェイを把握する。FD 患者と健常人との内視鏡下採取検体の 16S rRNA メタゲノム解析およびその細菌叢における代謝パスウェイ予測を行う。これにより FD 患者における異常を呈する細菌グループ、代謝パスウェイを詳細に把握し、疾患制御に繋がる新規代謝産物の選抜に役立てる。

#### 【実験方法】

Rome 基準を満たした *Helicobacter pylori* 陰性 FD 成人患者 11 例ならびに健常成人 9 例を対象に、口腔内、ならびに、上部内視鏡検査下に食道・胃・十二指腸の粘膜擦過粘液を、採取用ブラシを用いて採取した。検体は 16S リボソーム RNA 領域を増幅し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列を取得し、相同性検索および系統分類解析を実施した (図 1)。

また、得られたデータをもとに粘膜内細菌叢の分布を FD 患者と健常人とで比較検討し、FD 患者の症状スコアを出雲スケールならび改定 F スケールを用いて FD 症状と粘膜内細菌叢との関係性を評価した。本研究は、京都府立医科大学医学倫理審査委員会の承認 (ERB-C-839) を得て実施した (UMIN000033978)。

### 4. 研究成果

(1) 門レベルの比較において FD 患者では健常人と比較し、口腔内から十二指腸粘膜いずれにおいても Firmicutes が有意に高値であった (図 2)。

(2) 属レベルの検討でも FD 患者では健常人と比較し、口腔内から十二指腸粘膜いずれにおいても *Streptococcus* が有意に高値であった。

- (3) 改定 F スケール、出雲スケールを用いた FD 症状スコアと十二指腸粘膜内 *Streptococcus* には一定の相関が認められた(図 3)。
- (4) 種レベルの解析では、FD 症状と強い相関を示す細菌は *Streptococcus infantis* であった。
- (5) FD 発症の背景には上部消化管領域における Firmicutes 門 *Streptococcus* 属の関与が示唆された。また *Streptococcus* 属は FD 症状の増悪に関与している可能性が示唆された<sup>7)</sup>。

### 引用文献

1. 機能性消化管疾患診療ガイドライン 2014-機能性ディスぺプシア(FD). 日本消化器病学会編, 南江堂, 東京, 2014.
2. Stanghellini V, Chan FK, Hasler WL, Malagelada JR, Suzuki H, Tack J, Talley NJ. Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology*. 150(6):1380-92. 2016.
3. Tack J, Piessevaux H, Coulie B, et al. Role of impaired gastric accommodation to a meal in functional dyspepsia. *Gastroenterology*. 115:1346-52. 1998.
4. Vanheel H, Vicario M, Vanuytsel T, Van Oudenhove L, Martinez C, Keita AV, Pardon N, Santos J, Soderholm JD, Tack J, Farre R. Impaired duodenal mucosal integrity and low-grade inflammation in functional dyspepsia. *Gut*. 63:262-71. 2014.
5. McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 9(4):265-78. 2011.
6. Kashiwagi S, Naito Y, Inoue R, Takagi T, Fukui A, Itoh Y. et al. Mucosa-Associated Microbiota in the Gastrointestinal Tract of Healthy Japanese Subjects. *Digestion*. 101(2):107-20. 2020.
7. Fukui A, Takagi T, Naito Y, Inoue R, Handa O, Itoh Y, Nakagawa M. et al. Higher Levels of *Streptococcus* in Upper Gastrointestinal Mucosa Associated with Symptoms in Patients with Functional Dyspepsia. *Digestion*. 101(1):38-45. 2020.

### 【その他】

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/syokanai/reseaches/shokakan-02.html>

図 1：次世代シーケンサーを用いた腸内細菌 16S rRNA 解析

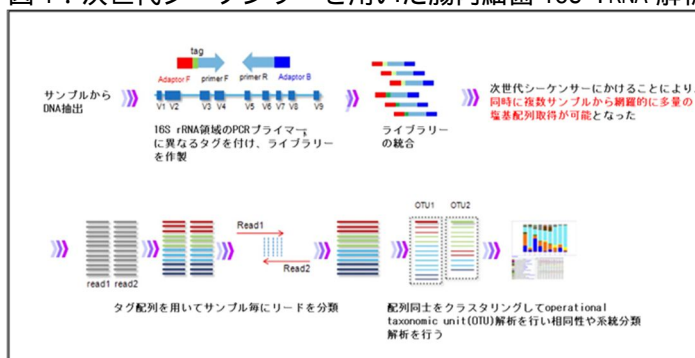


図 2: 口腔内、十二指腸粘膜 MAM 占有率 (門)

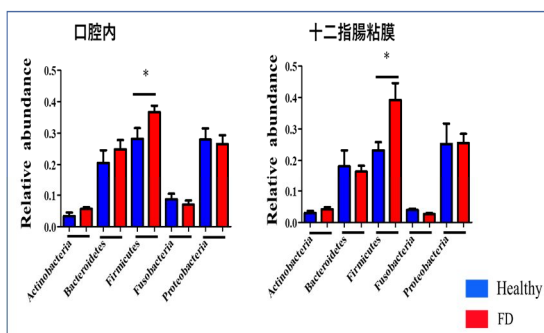
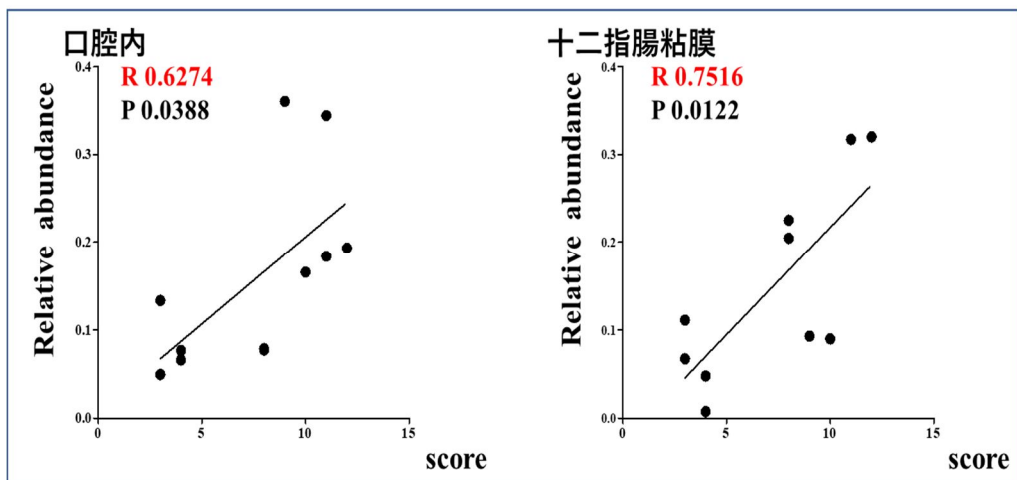


図 3: FD 症状スコアと口腔内、十二指腸膜 *Streptococcus* 属占有率との相関



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukui A, Takagi T, Naito Y, Inoue R, Kashiwagi S, Mizushima K, Inada Y, Inoue K, Harusato A, Dohi O, Okayama T, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Ishikawa T, Handa O, Itoh Y, Nakagawa M	4. 巻 101
2. 論文標題 Higher Levels of Streptococcus in Upper Gastrointestinal Mucosa Associated with Symptoms in Patients with Functional Dyspepsia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 38-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000504090.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kashiwagi S, Naito Y, Inoue R, Takagi T, Nakano T, Inada Y, Fukui A, Katada K, Mizushima K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Ishikawa T, Itoh Y.	4. 巻 1
2. 論文標題 Mucosa-Associated Microbiota in the Gastrointestinal Tract of Healthy Japanese Subjects.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000496102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Fukui A, Takagi T, Naito Y.
2. 発表標題 Higher abundance of streptococcus in upper gastrointestinal mucosa associated with symptoms in patients with functional dyspepsia.
3. 学会等名 第27回消化器関連学会週間 international session symposium4. デイスペプシアー病態と治療の最新知見ー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福居顕文、高木智久、内藤裕二、他
2. 発表標題 内視鏡下に採取した検体を用いた機能性ディスペプシア患者の粘膜関連細菌叢の検討
3. 学会等名 第5回Gut microbiota研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福居顕文、高木智久、内藤裕二
2. 発表標題 内視鏡下採取検体を用いた機能性ディスぺプシア患者の粘膜関連細菌叢と症状スコアとの関係性について
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会ワークショップ7「機能性消化管障害診療の科学的エビデンス」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福居顕文、高木智久、内藤裕二
2. 発表標題 内視鏡下採取検体を用いた機能性ディスぺプシア患者と健常人との粘膜内細菌叢の比較検討
3. 学会等名 第15回日本消化管学会総会学術集会ワークショップ4「微生物叢から見た消化管病態の新知見」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福居顕文、高木智久、半田 修、内藤裕二
2. 発表標題 内視鏡下採取検体を用いた機能性ディスぺプシア患者と健常人との粘膜内細菌叢の比較検討
3. 学会等名 日本消化器病学会近畿支部109回例会シンポジウム1「消化管診療の最前線」
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 内藤 裕二, 柏木 里織, 福居 顕文, 水島 かつら, 鎌田 和浩, 高木 智久	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本臨床	5. 総ページ数 1715 - 1719
3. 書名 【機能性消化管疾患:上部-最新の診断と治療-】 消化器症状と腸内細菌叢	

1. 著者名 福居 顕文	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Pharma Medica	5. 総ページ数 104 - 105
3. 書名 内視鏡下に採取した検体を用いた機能性ディスベプシア患者の粘膜関連細菌叢の検討	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	内藤 裕二  (Naito Yuji)  (00305575)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授   (24303)	
研究分担者	高木 智久  (Takagi Tomohisa)  (70405257)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授   (24303)	
研究分担者	半田 修  (Handa Osamu)  (90381970)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師   (24303)	