

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15895

研究課題名(和文)過敏性腸症候群における腸管粘膜上皮表層細菌叢と病勢との相関解析

研究課題名(英文)The involvement of intestinal mucosa-associated microbiome in disease state of irritable bowel syndrome

研究代表者

井上 潤(Inoue, Jun)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：50631561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：過敏性腸症候群(IBS)の本邦での罹患率が高いが、その病態は不明である。IBS患者では糞便中の腸内細菌叢の構成が健常人と異なるが、粘膜表層においては腸内細菌叢の構成や病態への関与は不明である。

本研究の目的は、粘膜表層の腸内細菌叢の構成や基礎的な知識を得ること、さらにIBS病態への関与を解析することである。

本研究では、消化管内視鏡により採取した粘膜表層の細菌叢の解析方法を確立し、IBS患者の粘膜表層の細菌叢に関する基礎的知見を得ることができた。本研究により、粘膜表層の菌叢がIBS診断や病勢のバイオマーカーとなる可能性、腸内細菌を介したIBS病態研究への進展が見込まれ、社会的意義は大きい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過敏性腸症候群(IBS)において、腸管粘膜表層の細菌叢の構成や病態への関与はこれまでほとんど明らかとされていない。本研究では、消化管内視鏡により採取した粘膜表層の細菌叢の解析方法を確立し、IBS患者の腸管粘膜表層の細菌叢の解析を行った。本研究により、粘膜表層の菌叢の違いがIBS診断や病勢のバイオマーカーとなる可能性や、腸内細菌を介したIBS発病メカニズム研究への進展が見込まれ、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Irritable bowel syndrome (IBS) has a high prevalence in Japan, but its pathology is unknown. In IBS patients, the composition of intestinal flora in the mucosal layer and its involvement in the pathological condition are not clear.

The purpose of this study is to collect intestinal bacteria on the mucosal surface using a lower gastrointestinal endoscope and analyze their composition and involvement in pathological conditions. In this study, we established a method for analyzing the bacterial flora of the mucosal surface layer collected by gastrointestinal endoscopy, and obtained basic knowledge about the bacterial flora of the mucosal surface layer in IBS patients. From this study, the microbiota on the surface of the mucous membrane could serve as a biomarker for IBS diagnosis or disease status. The progress toward research on IBS pathology mediated via microbiome is expected which have great social significance.

研究分野：医学

キーワード：過敏性腸症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

【1. 研究開始当初の背景】

過敏性腸症候群 (IBS) は腹部不快感や腹痛を主症状とした内臓知覚異常を伴う下痢や便秘またはその混合の便通異常が慢性的に持続する病態であり、本邦でも罹患患者は全人口の 10 ~ 15% と極めて高率である (文献 1)。また、IBS の予後は健常人と比べ大きな差はないものの、IBS 患者の QOL は著しく低く (文献 2)、IBS 症状の治療は患者 QOL の改善には非常に重要と考えられる。IBS では下部消化管内視鏡的検査などの通常の検査では器質的疾患が検出されないが、顕微鏡的な検討では肥満細胞の浸潤を伴う微小な炎症病態や粘膜透過性の亢進が見られ、軽微な炎症が病態の首座にあると考えられている (文献 3)。また、IBS 患者では糞便中の腸内細菌叢の構成が健常人と異なり (文献 4)、さらに、プロバイオティクスや抗生剤など腸内細菌をターゲットとする治療の効果も報告されているため、腸内細菌が発病・増悪に関与している可能性が示唆される。腸内細菌は糞便中と粘膜表層とではその細菌叢の構成が異なることが知られる。しかしながら、IBS 患者における粘膜表層の腸内細菌叢の構成や病態への関与は明らかでない。

【2. 研究の目的】

本研究の目的は、下部消化管内視鏡を用いて粘膜表層の腸内細菌を採取し、その解析補法を確立し、IBS 患者の腸管粘膜上皮表面に存在する細菌叢構成の病態への関与を解析することである。

【3. 研究の方法】

粘膜上皮表面のムチン層に存在する細菌の標準的解析方法の確立

(a) 粘膜上皮表面サンプル (ムチン層) の採取法の条件検討

下部消化管内視鏡時に擦過細胞診ブラシを用い腸管粘膜表層の粘液を採取する。採取した粘液中に含まれる細菌の量、校正を生検サンプルのもと比較する。また採取部位の菌叢構成の違いを顕彰する目的に回腸末端、盲腸、横行結腸、S 状結腸、直腸の各部位での粘膜上皮表面の細菌量や細菌叢構成を検証する。

(b) 菌叢の解析方法 (次世代シーケンサー + QIIME)

サンプルより抽出した DNA をイルミナ社の次世代シーケンサー (MiSeq) を用いメタ 16S 解析を行う。細菌叢解析は QIIME を用いてクオリティーチェックおよび greengene データベースを参照し属レベルまでの同定とその後の解析を行う。

IBS 患者および健常人における粘膜上皮表面のムチン層内の細菌叢の解析

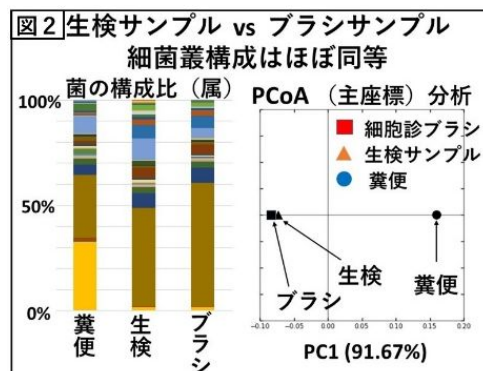
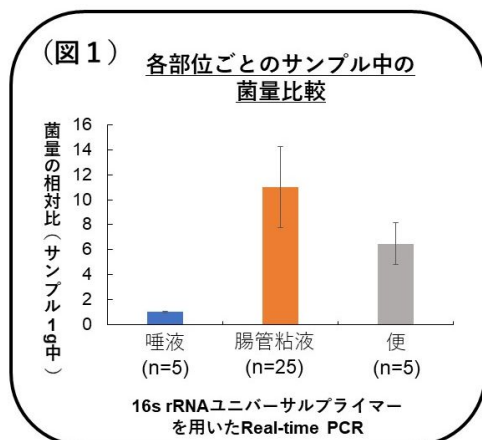
IBS 患者と健常人から採取した、糞便、粘膜表層中の細菌叢構成を比較解析する。病勢の評価、治療介入の有無での違いを検証する。

【4. 研究成果】

粘膜上皮表面のムチン層に存在する細菌の解析方法の検討

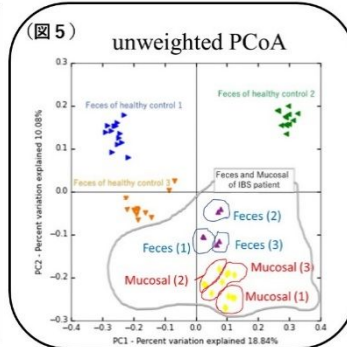
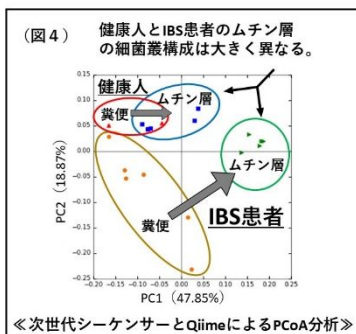
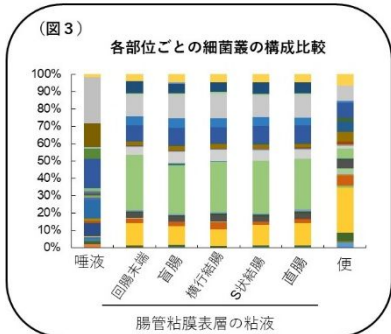
下部消化管内視鏡時に擦過細胞診ブラシを用いて採取した腸管粘膜表層の粘液、便、唾液から DNA を採取し、各部位に含まれている菌量を 16S rRNA のユニバーサルプライマーで定量解析した。その結果、同じ重量当たりの含有菌量は腸管粘膜表層の粘液、便、唾液の順に多いことが明らかとなった (図 1)。しかしながら、一度に採取できる粘液量は少ないため DNA 濃度が低く、メタ 16S 解析のためのライブラリー作成の PCR サイクルの条件検討を行う必要があった。便から抽出した DNA を用い、標準プロトコール通りの濃度およびサイクル数で作成したライブラリーと、同一 DNA を希釈して PCR サイクル数を増加して作成したライブラリーのシーケンスを行い、菌叢構成の比較を行い非特異的増幅がノイズとならない条件検討を行った。

得られた最適な条件を用い、内視鏡的に採取した粘液中の細菌と生検サンプル中の細菌の菌叢構成が異なるかを検証したところ、粘液と生検サンプルでは菌叢構成に大きな差はなかった (図 2)。以上の条件検討より得られた、内視鏡でのサンプル採取方法、粘液のメタ 16S 解析方法、を粘膜表層の細菌叢解析方法として用いることとした。



サンプルごと、腸管粘膜の部位ごとにおける菌叢構成、粘膜細菌の経時的動態の解析

サンプルごと（唾液、腸管粘液、糞便）、腸管粘膜の部位ごと（回腸末端～直腸）における細菌DNAのメタ16S解析を行い、菌叢構成の違いを比較した。その結果、唾液、腸管粘液、糞便での菌叢構成は著しく違うのに対し、回腸末端から直腸の粘膜の腸管粘液に関しては一個人内では非常に似通っていた（図3）。さらに個人間で便より粘液の方が菌叢構成の違いが大きかった（図4）。また、経時的に3回の下部内視鏡検査を行ったIBS患者の糞便および腸管粘膜表層の細菌叢のメタ16S解析を行い、主座標分析（PCoA）にて比較したところ、三回の経時的に採取した粘液関連細菌の経時的な構成変化は、糞便中の細菌叢構成の変化と同様に極めてその変動が少なかった（図5）。以上より、粘膜表層の細菌叢の基礎的な知見が得られた。

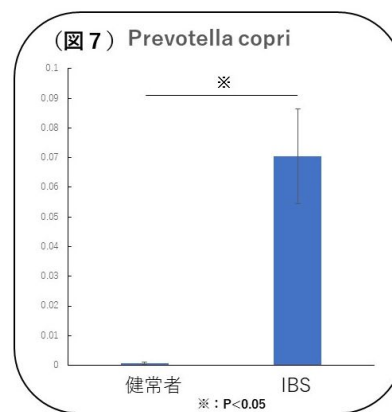
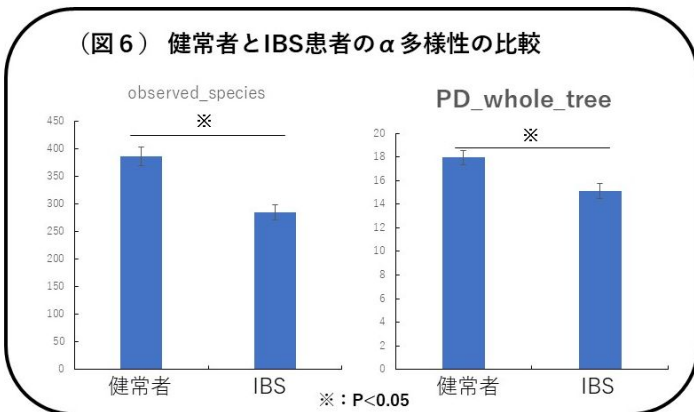


IBS患者および健康人における粘膜上皮表面のムチン層内の細菌叢の解析

健康者9人および健康者8名の菌叢解析を行った。IBS患者の腸管粘膜表層の細菌叢は健康人と比較し、多様性が優位に低い結果となった（図6）。さらにIBS患者と健康者の比較を行ったところ、IBS患者の粘膜表層の細菌叢のうち、*Prevotella copri*が優位に増加していた（図7）。また、重度のIBS患者では*Bacteroides uniformis*、*Prevotella copri*、*Lachnospira*属、*Ruminococcus bromii*が増加する傾向があった。治療介入群では*Bacteroides fragilis*が増加し、*Acidaminococcus*属が減少する傾向にあった。

*Prevotella copri*はこれまでにリウマチ患者などで増加が報告されている菌種であり、宿主の炎症を増悪させる因子として注目されている。IBSは通常の検査では器質的疾患が検出されないが、顕微鏡的な検討では肥満細胞の浸潤を伴う微小な炎症病態や粘膜透過性の亢進が見られ、軽微な炎症が病態の首座にあると考えられている（Spiller RC et al. Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2004;2:445-55）。特定の菌が粘膜表層の微小な炎症惹起の原因となりうれば、IBSの微小炎症病態のメカニズムにも関与している可能性が考察される。

本研究では、消化管内視鏡により採取した粘膜表層の細菌叢の解析方法を確立し、IBS患者の腸管粘膜表層の細菌叢の解析を行った。本研究により、粘膜表層の菌叢がIBS診断や病勢のバイオマーカーとなる可能性や、腸内細菌を介したIBS発病メカニズム研究への進展が見込まれる。



文献1 **Miwa H et.al. Patient Prefer Adherence 2008;2:143-147**
 文献2 **Kanazawa M et.al. Dig Dis Sci 2004;49:1046-1053**
 文献3 **Spiller RC et.al. Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2004;2:445-55**
 文献4 **Vijay shankar et.al. ISME Journal 2015;9:1899-1903**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasaki K, Inoue J, Sasaki D, Hoshi N, Shirai T, Fukuda I, Azuma T, Kondo A, Osawa R	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Construction of a Model Culture System of Human Colonic Microbiota to Detect Decreased Lachnospiraceae Abundance and Butyrogenesis in the Feces of Ulcerative Colitis Patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnology journal	6. 最初と最後の頁 e1800555
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/biot.201800555	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 1Yasutomi E, Hoshi N, Adachi S, Otsuka T, Kong L, Ku Y, Yamairi H, Inoue J, Ishida T, Watanabe D, Ooi M, Yoshida M, Tsukimi T, Fukuda S, Azuma T.	4. 巻 63
2. 論文標題 Proton Pump Inhibitors Increase the Susceptibility of Mice to Oral Infection with Enteropathogenic Bacteria.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dig Dis Sci.	6. 最初と最後の頁 881-889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10620-017-4905-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 2Adachi S, Hoshi N, Inoue J, Yasutomi E, Otsuka T, Dhakhwa R, Wang Z, Koo Y, Takamatsu T, Matsumura Y, Yamairi H, Watanabe D, Ooi M, Tanahashi T, Nishiumi S, Yoshida M, Azuma T.	4. 巻 173
2. 論文標題 Indigo Naturalis Ameliorates Oxazolone-Induced Dermatitis but Aggravates Colitis by Changing the Composition of Gut Microflora.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int Arch Allergy Immunol.	6. 最初と最後の頁 23-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000471923.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 1.Jun Inoue, Kengo Sasaki, Namiko Hoshi, Daisuke Sasaki, Itsuko Fukuda, Ken-ichi Yoshida, Takeshi Azuma, Akihiko Kondo, Ro Osawa
2. 発表標題 Successful detection of dysbiosis and altered short-chain-fatty acids levels in in vitro colonic microbiota culture system using fecal samples of ulcerative colitis.
3. 学会等名 European Crohn's and Colitis Organisation（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Inoue, Hiroki hayashi, Takuya Ikegawa, Osushi Tanaka, Shunta Tanaka, Yuzo Kodama
2. 発表標題 dynamics of mucosa-associate bacteria in Irritable Bowel Disease.
3. 学会等名 UEGW 2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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