

令和 5 年 4 月 4 日現在

機関番号：11301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2017～2021
 課題番号：17K17584
 研究課題名(和文) 過敏性腸症候群における、症状出現トリガーと口腔-腸内細菌叢ネットワークの解明

 研究課題名(英文) Omics Profiles of Fecal Microbiota Change in Irritable Bowel Syndrome Patients with Diarrhea and Symptom Exacerbation

 研究代表者
 田中 由佳里 (Tanaka, Yukari)

 東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

 研究者番号：50721453
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：過敏性腸症候群(IBS) は繰り返す腹痛と排便異常を呈する機能的消化管疾患である。近年腸内細菌との関連も指摘されるも疾患に一定した傾向は議論がある。また IBS は視床下部-下垂体-副腎皮質軸の反応性が健常者と異なるとされる。唾液コルチゾールはストレスと関連するが、IBS の口腔内環境の報告は殆どない。申請者らは IBS 患者は症状出現時と、非出現時の口腔、便の細菌叢、代謝について検証した。IBS 患者のうち腹部症状出現時は、便細菌叢ならびに短鎖脂肪酸や神経伝達物質代謝が変化していることが示された。一方、便細菌叢変化について、健常者群と IBS の通常排便時で有意差を認めなかったが、歯垢では有意な菌を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 今回、IBS 患者と健常者間、更に IBS の通常排便時と腹部症状出現時比較により、消化管細菌叢のみならず、短鎖脂肪酸や神経伝達物質代謝の変化を明らかにした。これまで申請者らは IBS 患者の大腸伸展刺激時の局所脳活動変化を報告してきた。IBS は中枢神経と消化管神経叢間での双方向の情報伝達関連が示唆されるものの、IBS の腹部症状出現タイミングの予測が困難なため研究手法が限られていた。本研究のように侵襲が少ない細菌叢をターゲットとし、同一被験者について複数回の検体採取、並びに縦走オミクス解析を行うことで、今後 IBS の症状出現時の消化管環境メカニズムの解明に寄与できる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Irritable bowel syndrome (IBS) is a disorder of gut-brain interaction. However, the role of gastrointestinal microbiota during IBS symptom exacerbation remains unclear. We tested the hypothesis that the fecal microbial composition are altered during the exacerbation of IBS symptoms. Fecal samples were collected from 43 men with IBS with diarrhea (IBS-D) and 40 healthy control (HC) men. Samples in the IBS-D patients were also collected during symptom exacerbation. The composition of the fecal microbiota was determined by analyzing the 16S rRNA gene and metabolites. The fecal microbiota during IBS symptom exacerbation exhibited significant differences in the phylogenetic pattern and short-chain fatty acid compared to without symptom exacerbation. Although there were no significant differences in the phylogenetic pattern of fecal microbiota abundance between HCs and IBS-D patients. Our findings suggest that fecal microbiome are altered in IBS-D patients during exacerbation of symptoms.

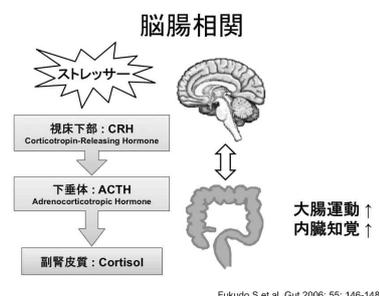
研究分野：過敏性腸症候群

キーワード：過敏性腸症候群 腸内細菌 口腔細菌 縦走オミクス

1. 研究開始当初の背景

過敏性腸症候群(Irritable Bowel Syndrome:IBS)は腹痛・便症状を主症状とし、若年成人の約15%程度にみられる。うつや不安など心理社会的因子が密接に関与しており、脳腸相関の解明がIBS克服の鍵とされている(Tanaka Y. J Neurogastroenterol Motil 2011)。腸内細菌の異常と宿主応答が、IBSの病態生理に関連していると考えられている。しかし、特にIBSの腹部症状出現時に関する腸内細菌叢の役割は、未だ解明されていない。

申請者は、IBS患者において、ストレスの鍵物質である副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン存在下で、大腸知覚—自律神経—脳扁桃体ネットワークの応答が健常者と異なることを見出した(Tanaka Y. PLoS One 2016)。腸内細菌が腸管神経叢並びに中枢神経のストレス情報処理への影響が示唆されてきている。申請者らのチームは、IBS患者便の16SリボソームRNA(16SrRNA)定量で、LactobacillusとVeillonellaの増加を見出し、高速液体クロマトグラフィーを用いて菌叢代謝物である短鎖脂肪酸量の差異を見出した(Tana C. Neurogastroenterol Motil 2010)。中でも酪酸は交感神経にも受容体が存在しており、脳扁桃体やストレス関連ペプチドへの影響も示唆されている。しかし腹部症状出現時に特異的に変化する細菌叢ならびに代謝産物は不明であった。



近年、特定の細菌叢の増殖動態から病状評価が可能となり(Korem T. Science 2015)、病態機能に関連する細菌叢を絞込むことで、症状出現トリガー解明が重要となってきている。一方で、腸内細菌は非常に多様な菌種からなり、環境要因や個人差が大きく、解析への影響が示唆されている。口腔内プラークを用いた口腔内細菌叢は臨床現場で便よりも採取しやすく、申請者の共同研究者らは環境影響も比較的受けにくい事を報告した(Sato Y. PLoS One 2015)。口腔内細菌叢が動脈硬化や自己免疫疾患などの全身疾患に関連することが示唆されている。また腸内と口腔内細菌叢が疾患特異的に重複し、更に治療後に部分的に変化することが示された(Zhang X. Nat Med 2015)。ストレス自覚時に唾液中コルチゾールが上昇するなど、口腔内環境はストレスとも密接な関係にある。よってIBSの腹部症状出現時に口腔内細菌叢が変化する可能性が考えられるが、これまでにほとんど報告はない。

2. 研究の目的

申請者は、ストレス関連神経ペプチドがIBS患者の内臓刺激時脳機能や自律神経機能に影響を及ぼすことを見出した。近年、腸内細菌叢のみならず口腔内細菌叢とストレス関連ペプチドを介した神経応答が示唆されている。本研究では、IBS症状出現時に特異的に変化する口腔内、腸内細菌叢と短鎖脂肪酸代謝物の変化を調べる。

3. 研究の方法

健常者、下痢型IBS患者(全員男性)を対象とした。消化器内科医が身体診察、血液検査を行い、歯科医師が歯や歯周病など口腔環境を診察した。除外基準は、器質的疾患、アレルギー疾患、高脂血症、炎症性腸疾患を有するもの、またBMIが25.0以上または18.5未満の者とした。下痢型IBS患者は全員、Rome III基準に従って診断された。健常者は、採血、身体診察後、便、歯垢、唾液を1回採取し、IBS患者は非症状出現時、症状出現時に便、歯垢、唾液を採取した。尚、便の採取は貯蔵水のコンタミネーションを防ぐキットを使用した。

共同研究者らは口腔内プラークを用いたDNA抽出技法、ならびに次世代シーケンサー(Illumina Miseq)による細菌叢解析の系を確立している(Yamagishi J. PLoS ONE 2016)。口腔内プラークのサンプリング条件について、時間や食事の影響なども検証が済んでいる。便、歯垢、唾液からDNAを抽出し、細菌・菌類に特異的なプライマーを用いて精製したPCR産物をIllumina Miseqを用いて配列決定を行った。アンプリコン生成は16SrRNA遺伝子のV3およびV4領域を用い、データ解析にはQIIME1データ解析パッケージを使用した。

更に、便、唾液検体を用いて短鎖脂肪酸と神経伝達物質をターゲットとして質量分析計(GC-MS/MS; 島津製作所製TQ-8040)を用いた代謝物(メタボローム)解析を実施した。更に腸管粘膜免疫や神経叢刺激に関連する胆汁酸、トリプトファンからアミノ酸、アドレナリンなど神経内分泌に関連する物質代謝も測定した。

共同研究者らがガスクロマトグラフィー三連四重極型質量分析計(GC-MS/MS)を用いた数百種のメタボロームを一斉に分析する手法を開発しており、データ処理、定量化、ピークアノテーションにはMasterHandsを使用した。

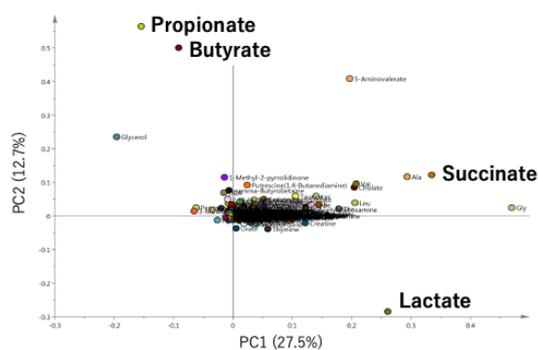
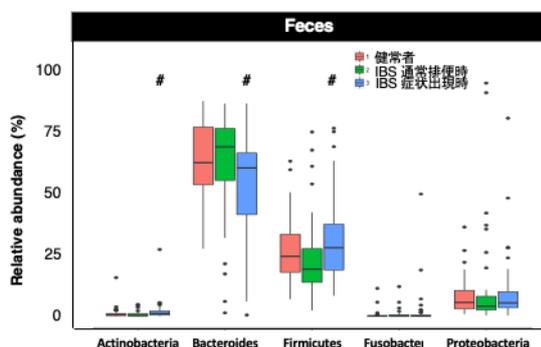
尚、本研究は東北大学病院臨床研究倫理委員会ならびに東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を受け実施した。

4. 研究成果

本研究では、IBS-D 男性患者 43 名（年齢 平均±標準偏差、21.8±1.7 歳）および健常男性対照として 40 名（22.1±1.3 歳）が参加した。

便細菌叢の α 多様性は健常群と IBS 通常排便時群の比較で有意差を示し ($P = 0.02$)、また IBS 群内通常排便時と腹部症状出現比較においても有意差を認めた ($P < 0.01$)。門レベル解析では、健常群と IBS 群通常排便時では有意差を認めなかった。一方、IBS 群内比較では、症状出現時は通常排便時に比して Actinobacteria ($P < 0.01$)、Firmicutes ($P = 0.01$) が有意に増加し、Bacteroides ($P = 0.01$) が有意に減少していた。(右上図) これらのうち科レベルでは Bacilli ($P = 0.04$)、Clostridia ($P = 0.03$)、Erysipelotrichia ($P < 0.01$) で有意な増加を示し、Bacteroidia ($P = 0.01$) は有意に減少していた。更に種レベルでは Bifidobacterium longum が有意に増加していた ($P < 0.01$)。

次にメタボローム解析を施行した。便中代謝物質は、健常者群、通常排便時、腹部症状出現時を含む IBS 群検体の短鎖脂肪酸に関する PCA 解析ではプロピオン酸、酪酸、乳酸、コハク酸が識別可能であった。(右下図) IBS 群内比較では腹部症状出現時は通常排便時に比べて、乳酸 ($P < 0.01$)、コハク酸 ($P < 0.01$) が有意に増加しており、プロピオン酸 ($P < 0.05$) が有意に減少していた。神経伝達物質代謝の検討において、IBS 群腹部症状出現時は通常排便時と比較して、グルタミン酸/GABA-グルタミン回路のうちグルタミン ($P < 0.01$) とグルタミン酸 ($P = 0.02$) が有意に増加しており、一方で GABA は両群間では有意差を認めなかった。セロトニン合成経路では、トリプトファンが IBS 群腹部症状出現時で通常排便時と比べて有意に増加していた ($P < 0.01$)。またメラトニンは、IBS 群間で有意差を認めなかったが、健常者群に比べて IBS 群腹部症状出現時では有意に上昇していた ($P < 0.01$)。



口腔内細菌叢について、歯垢検体では、健常群と比べて IBS 群通常排便時では、門レベルで Fusobacteria ($P = 0.03$) の有意増加と、Proteobacteria の有意減少を認め ($P = 0.01$)、唾液では Firmicutes の増加を認めた ($P = 0.01$)。更にこれらのうち、属レベルでの比較では Leptotrichia が有意に増加していた ($P < 0.01$)。唾液検体では、門レベルでは Firmicutes ($P = 0.01$) が健常者群にくらべて IBS 群通常排便時は有意に低下していたが、下位レベルでは有意な菌はみられなかった。便細菌叢で有意に増加していた菌について、歯垢と唾液では有意な変化を呈さなかった。

唾液検体について、短鎖脂肪酸の PCA 解析では、特にプロピオン酸、酪酸、乳酸が識別された。しかし、これらの健常者群、通常排便時、腹部症状出現時の群別比較ではそれぞれの群間で有意差を認めなかった。同様に、神経系代謝物についてもこれらの群間で有意差はみられなかった。

以上より、IBS 患者のうち特に腹部症状出現時は、口腔・便細菌叢ならびに短鎖脂肪酸や神経伝達物質代謝が変化していることが示された。便細菌叢変化について、健常者群と IBS の通常排便時で有意差を認めなかったが、歯垢では有意な菌を認めた。これらは IBS のバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tanaka Yukari, Kanazawa Motoyori, Kano Michiko, Tashiro Manabu, Fukudo Shin	4. 巻 13, e0199698
2. 論文標題 Relationship between sympathoadrenal and pituitary-adrenal response during colorectal distention in the presence of corticotropin-releasing hormone in patients with irritable bowel syndrome and healthy controls	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1, 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0199698	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 Kano Michiko, Muratsubaki Tomohiko, Van Oudenhove Lukas, Morishita Joe, Yoshizawa Makoto, Kohno Keiji, Yagihashi Mao, Tanaka Yukari, Mugikura Shunji, Dupont Patrick, Ly Huynh Giao, Takase Kei, Kanazawa Motoyori, Fukudo Shin	4. 巻 7
2. 論文標題 Altered brain and gut responses to corticotropin-releasing hormone (CRH) in patients with irritable bowel syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-09635-x	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 該当する
1. 著者名 Tanaka Yukari, Kanazawa Motoyori, Palsson Olafur S, Tilburg Miranda A Van, Gangarosa Lisa M, Fukudo Shin, Drossman Douglas A, Whitehead William E	4. 巻 24
2. 論文標題 Increased Postprandial Colonic Motility and Autonomic Nervous System Activity in Patients With Irritable Bowel Syndrome: A Prospective Study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurogastroenterol Motil	6. 最初と最後の頁 87 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5056/jnm16216	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 該当する
1. 著者名 Yagihashi M, Kano M, Muratsubaki T, Morishita J, Kono K, Tanaka Y, Kanazawa M, Fukudo S.	4. 巻 168
2. 論文標題 Concordant pattern of the HPA axis response to visceral stimulation and CRH administration.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurosci Res	6. 最初と最後の頁 32-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.03.004.	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5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田中 由佳里
2. 発表標題 過敏性腸症候群の症状出現時の口腔 腸内細菌叢ならびに代謝物の変化
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中由佳里
2. 発表標題 過敏性腸症候群の症状出現時の口腔 腸内細菌叢の変化
3. 学会等名 JDDW
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukari Tanaka
2. 発表標題 Changes in Oral and Fecal Microbiota during the Exacerbation of Symptoms Accompanying Irritable Bowel Syndrome with Diarrhea
3. 学会等名 3rd Meeting of the Federation of Neurogastroenterology and Motility (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukari Tanaka
2. 発表標題 Searching for biological factors in a biopsychosocial model of irritable bowel syndrome
3. 学会等名 UEGW2018 (欧州消化器病学会) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------