

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07933

研究課題名(和文)小腸細菌叢の解析による小腸粘膜障害・潰瘍性疾患発症機序の解明

研究課題名(英文)Role of gut microbiota for small intestinal ulcer diseases

研究代表者

中田 史子(Nakada, Ayako)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：70815448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤性小腸粘膜障害の病態解明のために、ヒト小腸検体の小腸細菌叢を解析した。患者から小腸粘膜検体を採取し、16SrRNA解析を施行した。小腸粘膜の細菌量は多く、Proteobacteriaが高率に認められた。これらの研究結果は細菌叢のdysbiosisと小腸粘膜障害の関連を示唆している。さらに小腸粘膜障害を模倣するマウスモデルの構築を行った。野生型マウスにジクロフェナク90mg/kgを腹腔内投与・経口投与を行い、小腸粘膜障害を生じるマウスモデルを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性疾患である小腸粘膜障害の病態は十分に解明されていない。近年の腸内細菌の研究により、細菌叢と小腸粘膜障害の関連の可能性が指摘されていた。本研究はその可能性がヒトの小腸粘膜組織においてその意義を検討したものである。本研究結果は、細菌叢のdysbiosisと小腸粘膜障害の関連を支持する有用な結果といえる。さらに、本研究においては、今後これらの病態解明や治療法の開発のために有用となるマウスモデルの構築も行うことができた。

研究成果の概要(英文)：To identify pathogenesis of small intestinal ulcer, we analyzed human small intestinal mucosal microbiota. In 16srRNA analyses, mean number of reads was 22027 (std 35447) and suggested high number of bacteria. In Beta analyses, proteobacteria was significantly identified in human small intestinal mucosa. These results suggested that dysbiosis was associated with human small intestinal diseases.

In addition, we developed a small intestinal ulcer disease mouse model. To develop the model, we used wild type mice that were administered intraperitoneal or oral 90mg/kg diclofenac. In immunohistochemical analyses demonstrated that these mucosal ulcers were occurred by apoptosis.

研究分野：消化器内科

キーワード：薬剤性小腸粘膜障害 腸内細菌 Fusobacterium マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小腸粘膜障害は現在でもその機序が不明であり、治療薬が存在せず難治性疾患である。小腸粘膜障害の原因としては Cox/PG 経路の機能不全と小腸細菌叢が協調して関与していると考えられている。しかし、その機序は不明であり病態解明が求められている。

2. 研究の目的

本研究ではヒト小腸検体の小腸細菌叢を解析し、粘膜障害の病態解明を行う。また、小腸粘膜障害を模倣するマウスモデルの構築を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト小腸検体の小腸細菌叢の解析

小腸内視鏡検査を用いたヒト小腸検体の採取を行い、16SrRNA メタゲノム解析を用いて小腸細菌叢の解析を行う。

(2) NSAIDs 投与によるマウスモデルを用いた解析

野生型マウスにジクロフェナク腹腔内投与、ジクロフェナク経口投与によるマウス小腸潰瘍モデルを作成し、小腸潰瘍の解析を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト小腸検体の小腸細菌叢の解析

17 検体の小腸粘膜障害と関連がある患者から小腸粘膜検体を採取し、16SrRNA メタゲノム解析を施行した。対照群として、8 検体（2 検体ヘリコバクターピロリ感染陰性患者、3 検体ヘリコバクターピロリ感染陽性患者、3 検体ヘリコバクターピロリ除菌後患者）から胃粘膜検体を採取し、同様に 16SrRNA メタゲノム解析を施行した。

小腸粘膜のリード数は平均 22027（標準偏差 35447）、胃粘膜のリード数は平均 13296（標準偏差 5022）であり、小腸粘膜における細菌量が多いことが示唆された。多様性解析において、Phylum レベルにおいては、小腸粘膜においては Proteobacteria が胃粘膜よりも高率に認められ、菌叢の違いも示唆された（図 1）。Genera レベルにおける解析では、小腸粘膜においては、Bacteroides、Serratia、Bifidobacterium、Prevotella、Leptotrichia、Streptococcus、

Fusobacterium、Ruminococcus、Faecalibacterium、Blautia が最も多く認められた菌種であった。胃癌や大腸癌との

関連が報告されている Fusobacterium 属が 82%（14/17 検体）に検出されたことは、小腸粘膜障害関連疾患が細菌叢と関連していることを示唆している。

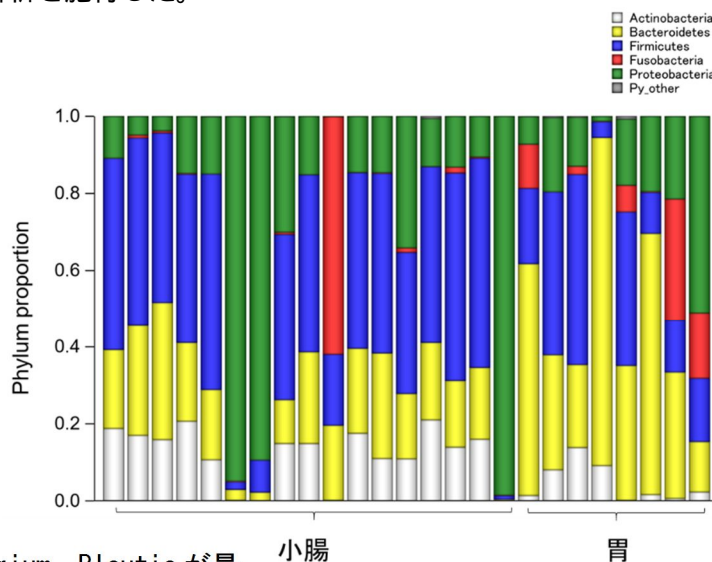


図1 小腸粘膜検体と胃粘膜検体における細菌叢

(2) NSAIDs 投与によるマウスモデルを用いた解析
野生型マウスにジクロフェナク 90mg/kg を内服または腹腔内投与を行い、12 時間、24 時間後に小腸を含む腸管の粘膜障害を評価した。小腸粘膜においては、内服群と腹腔内投与群において、粘膜障害の数は同程度認められた。12 時間投与後群の方が 24 時間投与後と比べて、粘膜障害の数が増加していた。一方、胃粘膜においては、内服群の方が腹腔内投与群と比べて、粘膜障害の数が増加していた。時間においては、12 時間投与群も 24 時間投与群も粘膜障害の数は同程度であった（図 2HE 染色：矢印：粘膜障害 A、B：腹腔内投与 12 時間後、C、D：腹腔内投与 24 時間後、E、F：経口投与 12 時間後、G、H：経口投与 24 時間後）。

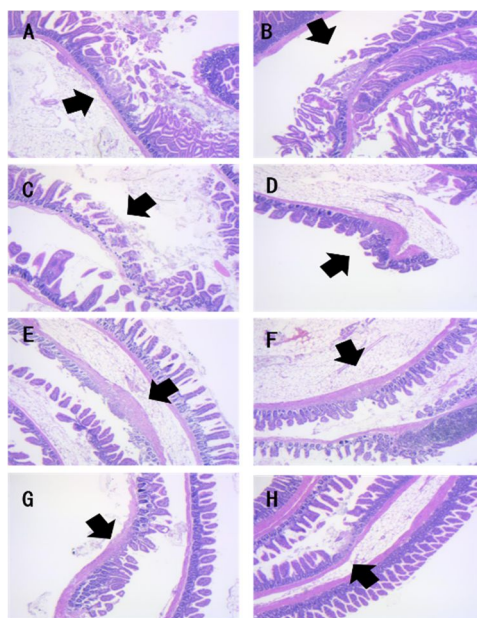


図2 マウス小腸潰瘍モデル

小腸粘膜障害部位において、免疫染色による検討を追加した。小腸粘膜障害部位は活性化された caspase3(cleaved caspase3)の染色の一部に陽性を認めた。cleaved caspase3 は、アポトーシス実行過程における中心的酵素であり、同マウスモデルが NSAIDs 粘膜障害モデルとして有用であることを明らかにした。

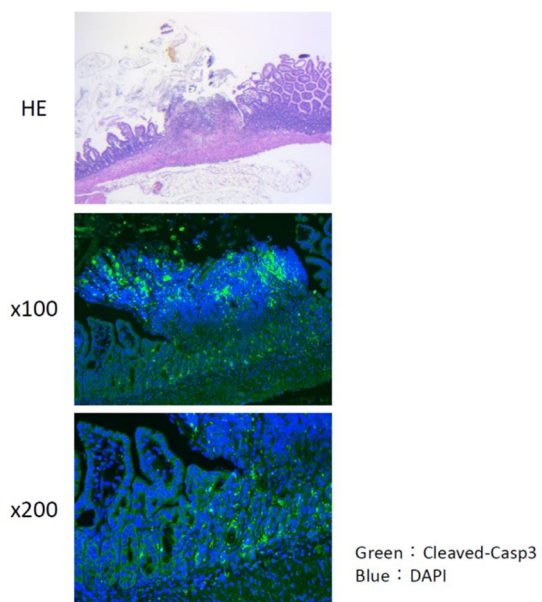


図3 マウス小腸潰瘍モデル免疫染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	早河 翼 (Hayakawa Yoku) (60777655)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	山田 篤生 (Yamada Atsuo) (80534932)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	新倉 量太 (Niikura Ryota) (90625609)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	

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