

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08020

研究課題名(和文) 過敏性腸症候群の病態に関連する粘膜細菌叢およびバクテリオファージの検討

研究課題名(英文) Mucosa-associated microbiota and bacteriophage in the pathophysiology of irritable bowel syndrome (IBS)

研究代表者

塩谷 昭子 (Shiotani, Akiko)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80275354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腸管粘膜ムチン層に局在する粘膜細菌叢(MAM)は、腸管免疫の制御に直接関わり、宿主との相互作用に重要な役割を果たしているが、過敏性腸症候群( IBS ) MAMの研究は少なく、一定の見解が得られていない。便秘型IBS-Cと下痢型IBS-D患者のMAMを比較検討する目的で、大腸内視鏡検査時にブラッシング法を用いて回腸・大腸粘膜に付着した粘液を採取し、16S rRNA系統解析により細菌叢を評価した。PICRUSt解析により機能解析を追加した。IBS患者において健常者と比較して細菌多様性は低下し、酪酸産生菌がIBSで有意に少く、IBS-CとIBS-D間で細菌構成比および機能解析に差を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、酪酸産生菌が過敏性腸症候群( IBS )で有意に少く、便秘型IBS-Cと下痢型IBS-D間で粘膜細菌叢(MAM)の細菌構成比および機能解析に差を認めることを報告した。酪酸は、腸管上皮のアポトーシス抑制やバリア強化に関わり、過剰な免疫応答を抑制し、腸管免疫系の形成に重要な役割を果たすことが報告されている。しかしIBSサブタイプ別にMAMに注目し、検討した報告はほとんどなく、細菌代謝産物を治療に応用した報告はない。MAM代謝産物と病態あるいは重症度との関連性をさらに確認し、それらの効果を動物モデルで確認することにより、IBS新規治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the MAM in IBS patients including the difference in subtypes of IBS, namely, diarrhea-predominant IBS (IBS-D) and constipation-predominant IBS (IBS-C). Endoscopic brush samples were taken from terminal ileum and sigmoid colon of patients with IBS (17 IBS-D patients and 7 IBS-C patients) and 10 healthy controls. The MAM of samples was profiled by 16S rRNA gene amplicon sequencing. Potential changes in the MAM at the functional level were evaluated using PICRUSt software and the KEGG database. The abundance of 4 genera in the sigmoid colon and 7 genera in the terminal ileum were significantly different among the 3 groups. In addition, the proportion of genes at the functional level differed between the IBS-D group and the IBS-C group. Dysbiosis pattern and the function of the microbiome seem to be different among subtypes of IBS, and MAM may play a crucial role in IBS symptom generation.

研究分野：消化管内科

キーワード：粘膜細菌叢 過敏性腸症候群 酪酸産生菌

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 (irritable bowel syndrome: IBS) の病態として、心理社会的要因、消化管運動機能異常、内臓知覚異常を中心とした脳腸相関の悪循環に加え、腸内細菌叢が関与する脳-腸-微生物相関が想定されている。宿主と腸内細菌の相互作用には、腸管粘膜ムチン層に局在する粘膜細菌叢(MAM)が重要な役割を果たしている。制御性T細胞が、IgA抗体の産生を介して、腸内細菌叢のバランスを制御する一方で、腸管における制御性T細胞の誘導や腸管免疫系の形成に腸内細菌が重要な役割を果たすことが報告されている。特定の細菌群が特定のT細胞サブセットの分化を誘導することも示されている。特に粘膜細菌叢は、腸管免疫の制御に直接関わっている可能性が高い。

IBSの腸内細菌叢に関する最近のreviewでは、健常者との相違が報告されているが、糞便細菌叢の検討がほとんどで、IBS-CとIBS-D間で比較している研究は少なく、一定の見解が得られていない<sup>1)</sup>。

## 2. 研究の目的

回腸および大腸の粘膜細菌叢をIBS群と健常対照群で解析し、さらに便秘型および下痢型のサブタイプ別に比較検討した。さらにPICRUS<sub>t</sub>解析により機能解析を追加し、両群間で比較した。

## 3. 研究の方法

大腸内視鏡検査の際に、ポリエチレングリコールを用いた前処置後に内視鏡下にブラシを用いて回腸、S状結腸粘膜の粘液を採取した。各サンプルからDNAを回収し、MiSeqによる16Sリボソーム遺伝子のV3-V4アンプリコンシーケンス解析を実施した。パイオインフォマティクス解析としてQIIME version 1.9.0, USEARCH version 9.2.4, UCHIME version 4.2.40, VSEARCH versionを用いて、微生物の属レベルまでの同定を行い、細菌構成比、 $\alpha$ および $\beta$ 多様性について検討した。機能レベルでの細菌叢の比較は、メタゲノム機能予測解析ソフト (PICRUS<sub>t</sub>) を用いてKEGG databaseに基づいて評価した。

## 4. 研究成果

### 1) 多様性の比較

IBS患者において健常者と比較して $\beta$ 多様性に差を認めず、IBS-C群、IBS-D群、健常者群の3群間においても差を認めなかった。S状結腸におけるMAMの、Shannon indexによる $\alpha$ 多様性は、IBS-C群およびIBS-D群は健常者群と比較して低下傾向を認めた(図1)。

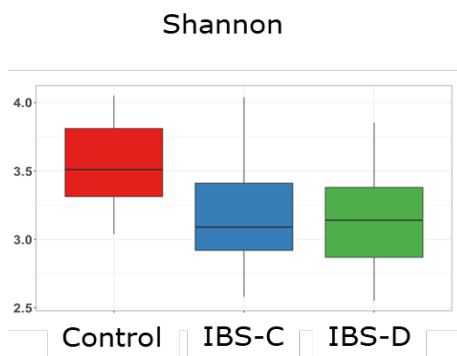


図1

### 2) 細菌構成比の比較

S状結腸では4つの属、回腸末端では7つの属に3群間で差を認めた。回腸末端では、健常者群と比較して*Ruminococcus*, *Oscillospira*属がIBS-D群で有意に少なく、*Dorea*属はIBS-C群で有意に多かった。*Klebsiella*属はIBS-D群で増加していたが、IBS-C群で認めなかった。S状結腸においては、*Haemophilus*属はIBS-D群とIBS-C群で有意に少なかった。*Butyricicoccus*属はIBS-C群で健常者群と比較して有意に少なかった(表1)。

腸内細菌が生産した酪酸が、T細胞のエピジェネティクス制御を介して制御性T細胞への分化を誘導していることが知られている。今回の検討で、IBS患者群で酪酸産生菌が有意に少いことから、酪酸の減少がIBSの病態に関与している可能性が示唆された。

表 1. 細菌構成比の健常者・IBS-D/IBS-C の 3 群の比較 (10X<sup>-3</sup>)

Bacteria	Controls	IBS-D	IBS-C	p <sup>a</sup> values	p <sup>b</sup> values		
	median(IQR)	median (IQR)	median (IQR)		Control vs IBS-D	Control vs IBS-C	IBS-D vs IBS-C
Terminal ileum							
f__Lachnospiraceae; g__Dorea	4.99 (3.49-15.4)	18.3 (2.66-43.8)	50.2 (28.7-129.5)	0.004	NS	0.002	NS
f__Ruminococcaceae; g__Oscillospira	9.15 (4.87-15.9)	2.38 (0.64-22.2)	5.98 (2.19-11.2)	0.021	0.017	NS	NS
f__Ruminococcaceae; g__Ruminococcus	24.6 (9.72-63.2)	4.81 (1.43-11.2)	25.9 (2.95-99.1)	0.018	0.021	NS	NS
Sigmoid colon							
f__Ruminococcaceae; g__Butyricicoccus	6.7 (2.24-7.62)	2.34 (0.35-4.38)	0.27 (0.00-15.9)	0.011	NS	0.009	NS

線形判別分析効果サイズ (LEfSe) 分析による IBS-D 群と IBS-C 群の 2 群の比較では、*Streptococcus*, *Acidaminococcus*, *Butyricicoccus*, *Parvimonas* 属が IBS-D 群で有意に多く ( $p < 0.05$ )、*Ruminococcus*, *Akkermansia*, *Butyrivibrio*, *Methylobacterium*, *Microbacterium* 属が IBS-D 群で有意に少なかった (図 2)。IBS-D と IBS-C で細菌構成比に差をみとめ、IBS-D 群で口腔内細菌叢が増加していた。

### 3 ) PICRUSt 機能解析の比較

IBS-D群とIBS-C群を機能解析の比較では、分泌系、LPS生成、タンパク質フォールディングおよび関連処理、グルタチオン代謝、およびトルエン分解はIBS-C群よりも IBS-D群において有意に高かった( $p < 0.05$ )。IBS-C群では、IBS-D群( $p < 0.05$ )に比べて、メタン代謝、リジン生成、酵素ファミリーを担う遺伝子の割合が有意に高かった(図 3)。

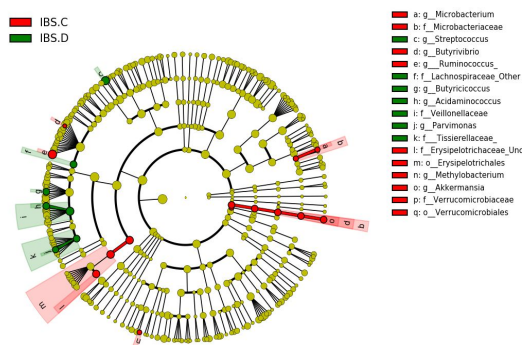


図 2

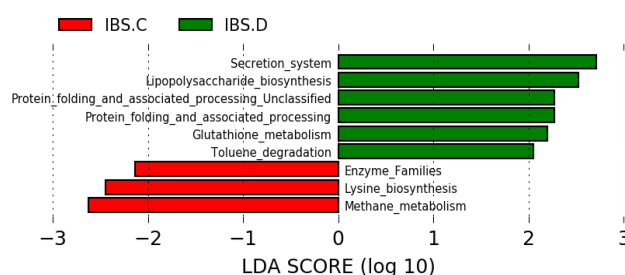


図 3

### 引用文献

1 . Pittayanon R, Lau JT, Yuan Y, Leontiadis GI, Tse F, Surette M, et al. Gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome-A systematic review. *Gastroenterology*. 2019; 157(1): 97–108.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Shiotani A, Fukushima S, Matsumoto H.	4. 巻 46
2. 論文標題 Carcinogenesis and Gut Microbiota	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gan To Kagaku Ryoho.	6. 最初と最後の頁 199-204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Matsumoto H, Kuroki Y, Higashi S, Goda K, Fukushima S, Katsumoto R, Oosawa M, Murao T, Ishii M, Oka K, Takahashi M, Osaki T, Kamiya S, Shiotani A.	4. 巻 65
2. 論文標題 Analysis of the colonic mucosa associated microbiota (MAM) using brushing samples during colonic endoscopic procedures.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr	6. 最初と最後の頁 132-137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbrn.19-3	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 Matsumoto H, Shiotani A, DY Graham	4. 巻 1149
2. 論文標題 Current and Future Treatment of Helicobacter pylori Infections	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 211-225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/5584_2019_367	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 Katsumata R, Shiotani A, Murao T, Ishii M, Fujita M, Matsumoto H, Haruma K.	4. 巻 62
2. 論文標題 The TPH1 rs211105 gene polymorphism affects abdominal symptoms and quality of life of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr.	6. 最初と最後の頁 270-276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbrn.17-76.	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 Katsumata R, Ishii M, Lee S, Handa Y, Murao T, Fujita M, Matsumoto H, Otsuki T, Shiotani A.	4. 巻 30
2. 論文標題 Cytokine Profile and Immunoglobulin E-mediated Serological Food Hypersensitivity in Patients With Irritable Bowel Syndrome With Diarrhea.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurogastroenterol Motil	6. 最初と最後の頁 415-421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5056/jnm1711	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 Matsumoto H, Shiotani A, Katsumata R, Fukushima S, Handa Y, Osawa M, Murao T, Handa O, Umegaki E, Inoue R, Naito Y.	4. 巻 102(1)
2. 論文標題 Mucosa-Associated Microbiota in Patients with Irritable Bowel Syndrome: A Comparison of Subtypes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 49-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000512167	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 Sugiyama T, Shiotani A	4. 巻 102(1)
2. 論文標題 The Cutting Edge Research of Functional Gastrointestinal Disorders in Japan: Review on JGA Core Symposium 2018-2020	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 6-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000510680	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 Kamiya T, Osaga S, Kubota E, Fukudo S, Motoya S, Murakami K, Nagahara A, Shiotani A, Sugimoto M, Suzuki H, Watanabe T, Yamaguchi S, Chan F K.L., Hahn Ki-B, Fock K M, Zhu Q.	4. 巻 102
2. 論文標題 Questionnaire-Based Survey on Epidemiology of Functional Gastrointestinal Disorders and Current Status of Gastrointestinal Motility Testing in Asian Countries	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 73 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000513292	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 Fukudo Shin, Okumura Toshikatsu, Inamori Masahiko, Okuyama Yusuke, Kanazawa Motoyori, Kamiya Takeshi, Sato Ken, Shiotani Akiko, Naito Yuji, Fujikawa Yoshiko, Hokari Ryota, Masaoka Tastuhiro, Fujimoto Kazuma, Kaneko Hiroshi, Torii Akira, Matsueda Kei, Miwa Hiroto, Enomoto Nobuyuki, Shimosegawa Tooru, Koike Kazuhiko	4. 巻 56
2. 論文標題 Evidence-based clinical practice guidelines for irritable bowel syndrome 2020	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 193 ~ 217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01746-z	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8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 松本啓志, 塩谷昭子
2. 発表標題 消化器領域における腸内細菌研究と臨床応用ブラシ法による腸粘膜関連マイクロバイオータ (mucosal associated microbiota : MAM) の解析
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 半田有紀子、勝又 諒、塩谷昭子
2. 発表標題 下痢型過敏性腸症候群粘膜における粘膜関連腸内細菌叢と食物アレルギー及び血清サイトカイン値の関係性
3. 学会等名 JDDW 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本啓志、塩谷昭子、勝又諒
2. 発表標題 過敏性腸症候群 (IBS) における腸粘膜細菌叢 (Mucosa-associated Microbiota: MAM) の解析
3. 学会等名 第16回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	Akiko Shiotani, Ryo Katsumata, Shinya Fukushima, Yukiko Handa, Kyosuke Goda, Motoyasu Oosawa, Takahisa Muroa, Osamu Handa, Hiroshi Matsumoto, Eiji Umegaki, Ryo Inoue, Yuji Naito
2. 発表標題	Mucosa-associated intestinal microbiota and serum cytokines in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome and IgE mediated hypersensitivity
3. 学会等名	Digestive Disease Week (DDW) 2020 米国シカゴ(国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Katsumata Ryo, Ishii Manabu, Muroa Takahisa, Fujita Minoru, Matsumoto Hiroshi, Shiotani Akiko
2. 発表標題	Cytokine profile and ige-mediated serological food hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome with diarrhea
3. 学会等名	Digestive Disease Week 2018(AGA)(国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Katsumata Ryo, Handa Yukiko, Gouda Kyosuke, Fukushima Shinya, Lee Suni, Ishii Manabu, Muroa Takahisa, Matsumoto Hiroshi, Otsuki Takemi, Shiotani Akiko
2. 発表標題	Serum Cytokine profile of Patients with Functional Dyspepsia
3. 学会等名	Asian Pacific Digestive Week 2018 (APDW 2018)(国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	"「消化管機能性疾患の新展開」過敏性腸症候群の分子病態と新展開 下痢型過敏性腸症候群と炎症性腸疾患における食物アレルギーの関与とサイトカインプロファイル"
2. 発表標題	勝又諒, 福嶋真弥, 半田有紀子, 合田杏佑, 石井学, 村尾高久, 李 順姫, 松本啓志, 大槻剛巳, 塩谷昭子
3. 学会等名	第15回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 Shiotani Akiko
2. 発表標題 "Current understanding of peptic ulcer disease GI bleeding in the era of direct oral anticoagulants"
3. 学会等名 Asian Pacific Digestive Week(APDW 2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 AKIKO SHIOTANI	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 201
3. 書名 Gastric cancer	

〔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)	

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
---------	---------