

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08611

研究課題名(和文) 内因性抗菌タンパクの潰瘍性大腸炎・回腸囊炎への病態関与およびバイオマーカーの検討

研究課題名(英文) Assessment of expression level of intestinal antibacterial peptides in ulcerative colitis as a biomarker for pouchitis

研究代表者

渡辺 和宏 (Watanabe, Kazuhiro)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30569588

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)：潰瘍性大腸炎(UC)、家族性大腸腺腫症(FAP)の大腸全摘・回腸囊肛門吻合術症例を対象に回腸囊粘膜を採取し、内因性抗菌タンパク/ペプチドであるRELM-、hBD1、HD5についてのmRNAの定量をRT-PCR法にて行った。UCとFAPで発現量に有意差は認めなかったが、人工肛門閉鎖後1年以内、1-2年の症例と比べ、2年以上の症例でRELM-とhBD1の発現量が有意に低下した。回腸囊炎の有無で明らかな差は認めなかった。16SrRNAシーケンス法にて腸内細菌叢の検討を行い、Weighted Unifrac解析では人工肛門閉鎖後にUC回腸囊の細菌叢が経時的に健常人の細菌叢に近づく傾向を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎の大腸全摘・回腸囊肛門吻合術後の合併症として回腸囊炎があり、術後管理の大きな問題となっている。回腸囊炎の原因は不明であるが、抗菌剤が著効することから腸内細菌叢との関連が示唆されている。今回、腸管から分泌される内因性抗菌タンパク/ペプチド(AMPs)に着目し検討を行い、経時的にAMPsの発現量が変化することを示した。腸内細菌は、経時的に健常人の細菌叢に近づく傾向を認める一方で、潰瘍性大腸炎ではPrevotella属の増加などの特徴を認めており、これらが回腸囊炎の発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mucosal samples of ileal pouch in patients with ulcerative colitis (UC) and familial adenomatous polyposis (FAP) who underwent total colectomy and ileal pouch anal anastomosis were collected. The quantification of mRNA for intestinal-derived antibacterial proteins/peptides (Resistin-like molecule (RELM-), Human defensin 1 (hBD1), and Human defensin 5 (HD5)) was performed by the RT-PCR method. There was no significant difference in the expression levels between UC and FAP, but the expression levels of RELM- and hBD1 were significantly reduced in cases of 2 years or more compared to within 1 year after stoma closure ( $p=0.04$ ,  $p=0.02$ ). Similarly, the expression levels of RELM- and hBD1 were significantly reduced in cases 2 years or more compared to cases 1-2 years after stoma closure ( $p=0.04$ ,  $p=0.02$ ). There was no clear difference between the presence and absence of pouchitis.

研究分野：消化器外科

キーワード：潰瘍性大腸炎 家族性大腸腺腫症 回腸囊炎 抗菌ペプチド 腸内細菌 短鎖脂肪酸 有機酸 大腸全摘

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis; 以下、UC) の大腸全摘・回腸囊肛門吻合 (IPAA) 術後には回腸囊炎が 20-50% と高頻度にかかることが知られている。同じ IPAA の術式を行う家族性大腸腺腫症 (Familial adenomatous polyposis; 以下、FAP) では回腸囊炎はほとんど起きないため、回腸囊炎は UC に特徴的な素因・病態を背景に顕在化する現象と考えられた。また、回腸囊炎は抗菌剤の投与が著効することが多く、回腸囊炎の発症には回腸囊における腸内細菌が関与している可能性が考えられた。

(2) 仮説として、回腸囊内の環境は経時的に「大腸化」し、これに伴い UC と同様の発症機序により慢性粘膜炎症が顕在化し回腸囊炎を発症するのではないかと着想した。すなわち「回腸囊炎は回腸囊における UC の再発ではないか」と着想した。

(3) IPAA 術後の腸内環境の具体的な変化は未知の部分が多く、腸内環境の変化を詳細に検討することで、UC と FAP との違い、回腸囊炎の有無での違いなどが、明確にできる可能性を想起した。

### 2. 研究の目的

本研究は、UC および FAP における IPAA 術後の経時的な腸内環境の変化 (とくに回腸囊における腸内細菌叢、内因性抗菌タンパク/ペプチド、短鎖脂肪酸、pH、ナトリウム濃度に関する変化) を明らかにすることで、腸管順応の過程を明らかにするとともに、回腸囊炎を発症した症例と発症しない症例での違い、UC 症例と FAP 症例での違いなどを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 東北大学病院総合外科に通院中の 15 歳以上 80 歳以下の症例で、UC または FAP の診断で IPAA を施行予定、または、施行された症例を対象とした。抗菌剤やプロバイオティクスなどの薬物治療を行っていない健常人をコントロールとした。

(2) UC および FAP 症例においては、単回または経時的に血液採取、糞便採取、内視鏡下生検での回腸囊粘膜採集を行った。健常人からは糞便を 1 度のみ採取した。上記サンプルを用いて、糞便メタゲノム解析、細菌叢の系統樹解析、PICRUST2 を用いた機能プロファイル予測、糞便中の有機酸 (短鎖脂肪酸) 測定、糞便の pH 測定、糞便のナトリウム濃度測定、回腸囊粘膜から mRNA を抽出して抗菌タンパク/ペプチドの mRNA の定量をおこなった。

### 4. 研究成果

(1) 腸内細菌叢に関して、綱レベルでは、健常人に比べ、UC 人工肛門症例は Bacteroidia が少なく、Gammaproteobacteria が多い傾向にあった。回腸囊症例は人工肛門症例に比べ、Bacteroidia が増え、Gammaproteobacteria が減っており、健常人に近づく傾向がみられた。健常人や人工肛門症例で少なかった Negativicutes は回腸囊症例では多い傾向であった。人工肛門閉鎖後の経過期間で分類したところ、Bacteroidia は増加傾向で Negativicutes は減少傾向であった。回腸囊炎の有無で検討した大きな変化はみられないが、Negativicutes と Bacroidia が回腸囊炎ではやや多く、Clostridia と Bacilli がやや少なかった。

(2) 腸内細菌叢に関して、属レベルでは、UC 回腸囊症例において回腸囊炎の症例で Prevotella 属が多い傾向にあった。人工肛門閉鎖後の経過期間で分けて検討したところ、Prevotella 属が術後に経時的に増える傾向にあり、UC 人工肛門閉鎖後 2 年以上経過した UC 回腸囊症例は人工肛門症例に比べ、Prevotella 属が有意に多かった。

(3) Jaccard 距離解析を用いて、細菌叢の機能の類似性を比較したところ、健常人と UC 人工肛門症例、UC 回腸囊症例、FAP 回腸囊症例は有意に異なっていた。UC 回腸囊症例は UC 人工肛門症例より健常人に近づく傾向がみられた。単回採取の症例群について人工肛門閉鎖後の経過期間で分類し、PICRUST2 を用いて腸内細菌叢の変化から、その機能の変化を予測したところ、独立栄養生物の炭素固定の中でも不完全な還元的 TCA サイクルの代謝系が UC 回腸囊症例で経時的に上昇傾向であり、UC 人工肛門症例と比べ人工肛門閉鎖後 2 年以上経過した UC 回腸囊症例で有意に上昇していた。

(4) 糞便中のナトリウム濃度に関しては、単回採取した症例群で検討したところ、健常人に比べ、UC 人工肛門の症例や人工肛門閉鎖術後の UC 症例・FAP 症例では有意に糞便中の Na 濃度が高値であった (UC 人工肛門症例 vs. 健常人;  $p < 0.001$ 、UC 回腸囊症例 vs. 健常人;  $p < 0.001$ 、FAP 回腸囊症例 vs. 健常人;  $p < 0.001$ )。また、人工肛門閉鎖後 2 年以上経過した症例は人工肛門症例より有意 Na 濃度が低値となっており ( $p = 0.04$ )、術後経過で低下する傾向が示唆された。回腸囊炎症例と非回腸囊炎症例の比較で糞便中 Na 濃度に明らかな差は認めなかった。

(5) 糞便中の pH に関しては、単回採取群において、人工肛門の症例よりも人工肛門閉鎖後 1 ~ 2 年経過した症例で有意に pH が低値となっていた ( $p=0.02$ )。人工肛門閉鎖前から経時的に複数回検体を採取した症例群 (UC 5 例) の検討でも人工肛門閉鎖前と比較し、人工肛門閉鎖後 1 年経過した時点の pH が有意に低下していた ( $p=0.02$ )。単回採取群において、健常人と人工肛門症例、UC と FAP 回腸嚢症例で糞便 pH に有意差は認められなかった。回腸嚢炎症例と非回腸嚢炎症例の比較で糞便の pH に明らかな差は認めなかった。

(6) 発現量を調べた抗菌ペプチド (RELM-、hBD1、HD5) は同時に測定した  $\beta$ -actin の発現量で除して、補正した。いずれの抗菌ペプチドも  $\beta$ -actin に比べて発現量が少なく、常用対数に変換し、検討した。単回採取した症例群で検討したところ、どの抗菌ペプチドでも UC と FAP で発現量に有意差は認められなかった。人工肛門閉鎖後の経過期間で分類して検討したところ、人工肛門閉鎖後 1 年以内と比べ 2 年以上経過した症例に関して RELM- と hBD1 の発現量が有意に少なかった (それぞれ  $p=0.04$ 、 $p=0.02$ )。同様に人工肛門閉鎖後 1-2 年の症例と比較し 2 年以上経過した症例でも RELM- と hBD1 の発現量が有意に低下していた (それぞれ  $p=0.04$ 、 $p=0.02$ )。回腸嚢炎症例と非回腸嚢炎症例の比較で抗菌ペプチドの発現に明らかな差は認めなかった。

(7) 上記結果からは、Weighted Unifrac 解析では人工肛門閉鎖後に UC 回腸嚢の細菌叢が経時的に健常人の細菌叢に近づく傾向を認めるなど、「大腸化」を示唆する所見を認める一方で、具体的な菌株は健常人とは異なっているなど、「大腸化ではない」変化も同時に認めていた。これらの変化の差異が、UC と FAP での腸内環境の差異、回腸嚢炎の有無での腸内環境の差異をもたらしていることが示唆された。とくに、潰瘍性大腸炎では *Prevotella* 属の増加などの特徴を認めており、これらが回腸嚢炎の発症に関与している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Watanabe Kazuhiro, Itoh Kikuji, Park Sang-Hee, Kaku Mitsuo, Ishii Keiko, Sasano Hironobu, Naitoh Takeshi, Unno Michiaki, Fukushima Kouhei	4. 巻 50
2. 論文標題 Resistin-like molecule beta, a colonic epithelial protein, exhibits antimicrobial activity against Staphylococcus aureus including methicillin-resistant strains	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 920 ~ 930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-020-01974-z	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 Watanabe Kazuhiro, Kohyama Atsushi, Suzuki Hideyuki, Kajiwara Taiki, Karasawa Hideaki, Ohnuma Shinobu, Kamei Takashi, Unno Michiaki	4. 巻 63
2. 論文標題 Slug Method: A Technique for Stoma Prolapse Reduction Using High Osmolality of the 50% Glucose Solution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diseases of the Colon & Rectum	6. 最初と最後の頁 e565 ~ e565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/DCR.0000000000001798	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 Watanabe Kazuhiro, Nagao Munenori, Suzuki Hideyuki, Karasawa Hideaki, Ohnuma Shinobu, Musha Hiroaki, Funayama Yuji, Kamei Takashi, Naitoh Takeshi, Unno Michiaki	4. 巻 48
2. 論文標題 The functional outcome and factors influencing the quality of life after ileal pouch anal anastomosis in patients with ulcerative colitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 455 ~ 461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-017-1613-8	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 Watanabe Kazuhiro, Kurachi Kiyotaka, Mizushima Tsunekazu, Kameyama Hitoshi, Sasaki Iwao, Sugita Akira, Nezu Riichiro, Funayama Yuji, Fukushima Kouhei, Naitoh Takeshi, Unno Michiaki, Futami Kitaro	4. 巻 71
2. 論文標題 The Current Trend of Anorectal Cancer Surveillance in Patients with Crohn's Disease: A Questionnaire Survey of Japanese Specialists	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nippon Daicho Komonbyo Gakkai Zasshi	6. 最初と最後の頁 283 ~ 290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3862/jcoloproctology.71.283	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺和宏、神山篤史、鈴木秀幸、梶原大輝、唐澤秀明、大沼忍、井本博文、山村明寛、青木豪、田中直樹、武者宏昭、元井冬彦、石田孝宣、亀井尚、内藤剛、海野倫明
2. 発表標題 クローン病に対する狭窄形成術および新吻合法の手術手技と術式選択
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 渡辺和宏、内藤剛、亀井尚、海野倫明	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 234
3. 書名 消化管吻合法バイブル [Web動画付]	

1. 著者名 渡辺和宏、内藤剛、海野倫明	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 172
3. 書名 尿路変向・再建術	

〔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
研究協力者	小野 翼  (ONO Tasuku)	東北大学  (11301)	

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