

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K15779

研究課題名（和文）メタゲノム解析を用いた膵線維化と腸内細菌叢の関連の探索

研究課題名（英文）Association between pancreatic fibrosis and gut microbiota using metagenomic analysis.

研究代表者

藤本 剛英 (Takehide, Fujimoto)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90792820

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌のリスク因子として慢性膵炎が挙げられる。慢性膵炎は膵臓に線維化・細胞浸潤・実質の脱落などの慢性変化が生じ、進行するにつれて膵外分泌・内分泌機能が低下する病態である。近年、腸内細菌叢バランスの破綻が炎症性腸疾患のみならず肥満や肝疾患など様々な病態に深く関与していることが明らかになり、慢性膵炎においても口腔内細菌、小腸内細菌異常増殖と関連することが報告されている。本研究では健康者、早期慢性膵炎患者、慢性膵炎患者、膵癌患者の便中DNAを用いて腸内細菌叢の変化を明らかにすることを目的とした。健康者やその他の疾患の便が収集できたため、今後腸内細菌叢について検討予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康者、早期慢性膵炎患者、慢性膵炎患者、膵癌患者の便中DNAを用いて腸内細菌叢の変化を明らかにし、さらに腸内細菌が膵線維化に関連した細胞（膵筋線維芽細胞）、生体に及ぼす影響を検証することを目的とする。本研究は膵線維化の病態解明の一助となり、慢性膵炎増悪・膵癌発症の早期発見のための検査や新規治療薬の開発に貢献するものである。今後それぞれの患者の腸内細菌叢について解析を追加する予定としている。

研究成果の概要（英文）：Chronic pancreatitis is a risk factor for pancreatic cancer. Chronic pancreatitis is a condition in which the pancreas undergoes chronic changes such as fibrosis, cellular infiltration and parenchymal desquamation, and as the disease progresses, pancreatic exocrine and endocrine functions decline. Recently, it has been reported that disruption of the intestinal microbiota balance is associated with abnormal oral and small intestinal bacterial growth in chronic pancreatitis. The aim of this study was to identify changes in the gut microbiota using stool DNA from healthy subjects, patients with early chronic pancreatitis, patients with chronic pancreatitis and patients with pancreatic cancer. As stool samples from healthy subjects and other diseases were collected, the intestinal microbiota will be examined in the future.

研究分野：消化器

キーワード：慢性膵炎 腸内細菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌による死亡者数は増加している。早期発見が困難で、罹患率と死亡者数がほぼ同数の難治癌である。膵癌早期発見のため、膵癌を疑う症状あるいは危険因子をもつ集団には積極的なスクリーニング検査を施行することが薦められているが、ステージ 膵癌は膵癌全体の 10%程度で、30年前と比較しても著変はない。早期診断・早期治療介入が予後の向上に結び付くため、リスクの高い集団をひろいあげることが重要である。膵癌のリスク因子として慢性膵炎が挙げられる。慢性膵炎は膵臓に線維化・細胞浸潤・実質の脱落などの慢性変化が生じ、進行するにつれて膵外分泌・内分泌機能が低下する病態である。「厚生労働省難治性膵疾患に関する調査研究班」の 2013年の報告で、慢性膵炎患者 506 例を対象とした経過観察中（観察期間中央値 5.6 年）に 19 例（3.8%）に膵癌を認めた。しかしながら慢性膵炎は早期診断の方法が確立されておらず、診断時には不可逆性の進行例であることが多い。そこで本邦では、2009 年に改訂された「慢性膵炎臨床診断基準 2009」では世界に先駆けて「早期慢性膵炎」が提唱された。非可逆性と考えられてきた慢性膵炎を早期発見し、早期治療介入を行うことで、予後の改善が期待される。慢性膵炎の原因はアルコール性が最も多いが、女性では約半数が特発性とその機序は未だ不明な点も多い。慢性膵炎では口腔内常在菌・腸内細菌叢が変化し、小腸内細菌過剰繁殖症（small intestinal bacterial overgrowth: SIBO）が起こり、腸内細菌と病態との関連が示唆されている。近年腸内細菌に関する研究の進展は著しく、腸内細菌叢バランスの破綻は炎症性腸疾患（以下 IBD）のみならず肥満や肝疾患、精神疾患などさまざまな病態に深く関与していることが明らかにされてきた。慢性膵炎においては外分泌機能が低下し、腸内細菌叢が変化することが予測されているが、十分な検討は行われておらず、詳細な機序は不明である。

また膵臓の線維化には膵筋線維芽細胞が関連していることが明らかとなっており、これまで我々の教室からもその機能を検討してきた。腸内細菌が膵筋線維芽細胞に及ぼす変化を検討することは慢性膵炎増悪・膵癌発症の病態解明につながり、新規治療法開発の足掛かりとなりうる可能性があると考えている。さらに慢性膵炎モデルマウスに腸内細菌を投与し、膵炎の程度・線維化に関連するサイトカインを mRNA、DNA レベルで解析することにより、その機能についてさらに詳細に検討が可能となる。

そこで本研究では慢性膵炎に加えて、いまだ病態が解明されていない早期慢性膵炎にも着目し、腸内細菌叢の変化の解析を行い、その中で着目すべき腸内細菌を同定し、膵線維化に関連する膵筋線維芽細胞に及ぼす影響について検討することとした。さらにその腸内細菌を慢性膵炎モデルマウスに投与し、膵炎に与える影響について検討することにより、腸内細菌が膵線維化に及ぼす影響について検討する。早期慢性膵炎を対象とした腸内細菌叢の報告はなく、未だ明らかとされていない早期慢性膵炎と腸内細菌叢の関連を検討することにより、腸内細菌叢の変化を捉えることが膵癌発症高リスク群の拾い上げの新たな指標となり、慢性膵炎への移行・膵癌発症の予防を目的とした新規治療開発の足掛かりとなり得る可能性がある。

### 2. 研究の目的

- 早期慢性膵炎・慢性膵炎の腸内細菌叢の変化を明らかにすること
- 腸内細菌叢が膵線維化に関わる膵筋線維芽細胞に及ぼす影響を検討すること
- 腸内細菌が膵炎モデルマウスに及ぼす影響を検討すること

### 3. 研究の方法

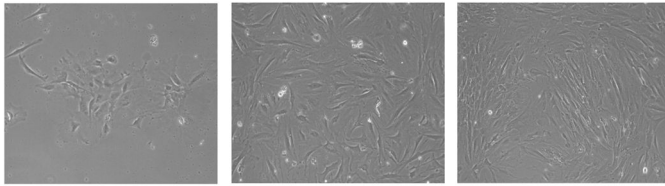
健常者、慢性膵炎、膵癌患者から採便し、便中 DNA を採取した。

膵切除標本から collagenase、dispase を用いてヒト筋繊維芽細胞(myofibroblast)の単離培養を行った。

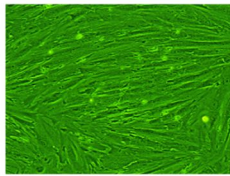
C57BL6 マウスにセルレインを反復投与して膵繊維化モデルマウスを作成した。

### 4. 研究成果

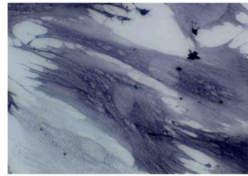
ヒト筋繊維芽細胞(myofibroblast)の単離培養を行った。



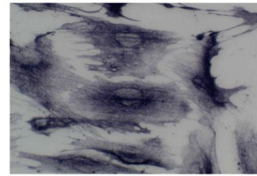
Phase-contrast light microscopic observation of mouse pancreatic stellate cells on day 4,7,10, isolated using collagenase 4 and dispase1.



Myofibroblast (x40)

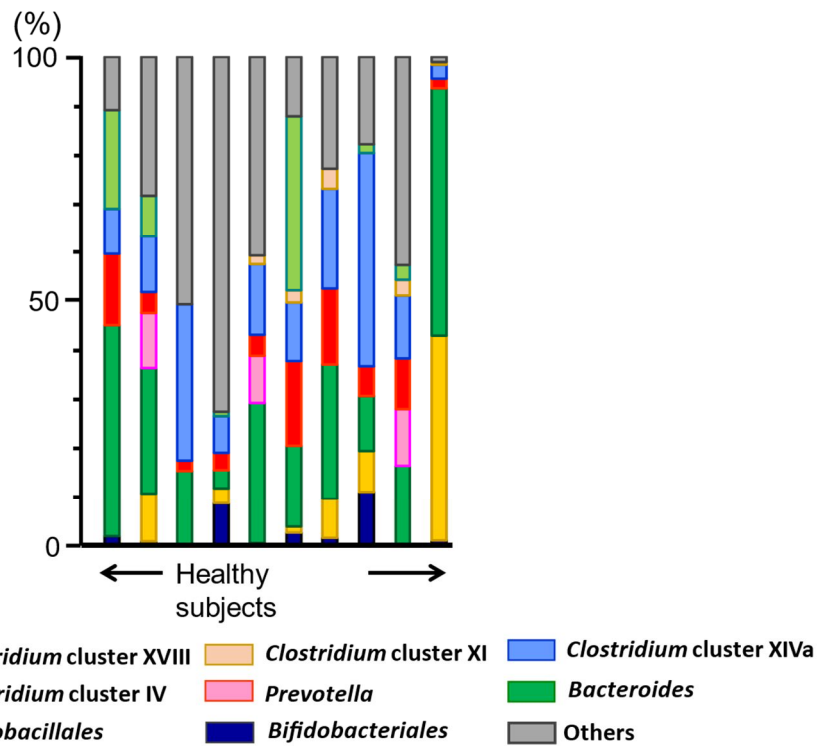


$\alpha$ -SMA (x200)



Vimentin (x200)

便を採便し、便中 DNA を抽出した。さらに抽出した検体で TRFLP を施行した。



今後はさらに検体採取を進め、慢性膵炎、早期慢性膵炎患者の便との比較を行い、次世代シーケンサーでの解析を追加する予定である。さらにその結果により、筋繊維芽細胞、膵炎モデルマウスを用いた検討を行う。

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

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