

令和 5 年 5 月 20 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05867

研究課題名（和文）プロバイオティクスによるアスピリン小腸粘膜傷害改善の病態解明

研究課題名（英文）Effects of probiotics on aspirin-induced small bowel injury

研究代表者

鈴木 孝良（Suzuki, Takayoshi）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：40287066

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的はアスピリン常用者にプロバイオティクスを服用させ腸内細菌叢の変化を検討することで、アスピリン粘膜障害の病態とプロバイオティクスによる粘膜障害低減効果における腸内細菌叢の役割を解明することである。プロバイオティクス摂取前後の α -diversityによる腸内細菌叢の全体構造比較では、プロバイオティクス摂取前においてコントロール群とアスピリン群間で有意な差を認めたと、プロバイオティクス摂取後にそれらの有意差は消失した。よってプロバイオティクス摂取は、アスピリン投与によって生じた腸管内細菌叢の変化にremodellingを生じさせ腸管粘膜傷害軽減に寄与した可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化が進む先進国において、動脈硬化性疾患である脳血管障害や心疾患の罹患率は高く血栓塞栓症の発症リスクを低減するための治療薬として低用量アスピリン（LDA）は広く用いられている。LDAは以前から消化管粘膜傷害を引き起こす薬剤として知られており、時に重篤な消化管出血により致命的な合併症きたすので、処方する懸念材料の一つであった。今回のLDAによる腸内細菌叢変化に対するプロバイオティクスのremodelling効果は、今後、LDA誘発小腸粘膜障害の予防と治療におけるプロバイオティクスの臨床応用に十分な可能性を提供したと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study aims to clarify the role of intestinal microbiota in the amelioration of mucosal injury by probiotics by comparing the microbiota of regular aspirin users and non-aspirin users. Comparison of the overall structure of the intestinal microbiota by α -diversity showed significant differences between the control and PPI groups and between the control and aspirin groups before probiotic intake, but these significant differences disappeared after probiotic intake. The results showed that probiotic intake may have contributed to the reduction of intestinal mucosal injury by remodeling the changes in the intestinal microbiota caused by aspirin.

研究分野：消化器病

キーワード：アスピリン 小腸粘膜傷害 プロバイオティクス 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

高齢化の進む本邦において、動脈硬化性疾患である脳血管障害や心疾患は増加傾向にあり、その予防に必要なアスピリン処方が増加している。その中で、アスピリン起因性消化管粘膜傷害の発生が近年消化器領域で問題となっており、その予防医学の確立は急務であると考えられる。胃粘膜傷害の発生機序は、これまで多くの研究がなされ、胃粘膜のプロスタグランジン(PG)合成酵素シクロオキシゲナーゼの阻害により、内因性プロスタグランジンの産生が低下することに起因することが明らかになった。このPGの産生低下により、胃粘膜血流、粘液や重炭酸分泌などの低下が起こり粘膜防御作用の破綻をきたす。アスピリン起因性胃潰瘍の治療法は、PG製剤をはじめとする粘膜保護剤とPPI(proton pump inhibitor)などの酸分泌抑制剤とアスピリン腸溶錠化によりほぼ確立した。一方、小腸・大腸におけるアスピリン粘膜傷害の頻度、発生機序および治療法についての検討はまだ少なく詳細は不明である。近年バルーン内視鏡(BE)やカプセル内視鏡(CE)の開発により、アスピリン起因性小腸粘膜傷害の実態が明らかになりつつある。われわれも小腸疾患におけるBEの有用性を報告し、小腸疾患の病態解明にきわめて有用な検査法であると考えている。さらに侵襲の少ないCEを使用することでアスピリン服用者の約9割に小腸粘膜傷害が発生していることも明らかとなった。その発生機序には小腸粘膜透過性亢進、COX-1阻害、iNOSの誘導、ラジカル産生、胆汁酸や腸内細菌の関与が考えられているが、そのほとんどが動物実験データである。また、胆汁酸を吸着し体外に排出するコレステラミンの経口投与が、インドメタシンによる小腸粘膜傷害を抑制することも動物実験で報告されており、これらは小腸粘膜傷害の発生において胆汁酸が重要な役割を演じていることを示唆するものである。

健康の維持増進に役立つ腸内乳酸菌(ビフィズス菌や乳酸菌)が市販されているが、その多くの機能は十分に解明されていない。近年、これらの腸内乳酸菌が胆汁酸をエネルギー依存的に細胞内に取り込み蓄積する機構が明らかになった。もしこの取り込みがヒトの腸管内で十分に機能した場合、糞便による胆汁酸の体外排泄が促進されるものと考えられ、小腸粘膜傷害改善に寄与する可能性がある。また、近年プロバイオティクスには病原微生物の腸管内定着阻止 酸や短鎖脂肪酸を産生し腸内環境を弱酸性に整え dysbiosis を改善 腸管上皮細胞の増殖促進 tight junction 機能維持や粘液産生促進による腸管バリアー強化 炎症性サイトカイン産生抑制や制御性T細胞活性化、NK細胞活性化、樹状細胞の成熟促進による免疫機構強化など多くの機能を有することが明らかとなり、さらなる研究の推進に期待が寄せられている。

われわれが行ったCEを用いた臨床検討(double blind randomized clinical trial)結果において、アスピリンを服用している患者の小腸粘膜傷害は6週間の乳酸菌添加ヨーグルト摂取で有意に改善していたばかりでなく、上下部消化器症状の改善にも寄与していた。そこで本研究は、アスピリン起因性小腸粘膜傷害とくに小腸糜爛・潰瘍に注目し、その発生機序解明とプロバイオティクスによる予防作用のメカニズム解明を目指したものであるが、ヒトによる小腸粘膜傷害の発生機序を検討した研究はほとんどない。摂取されたプロバイオティクスがどのような機序で効果を挙げているのかを検討した研究も少なく、その機序解明は今後の医療におけるプロバイオティクスと消化管の関連を探るうえで大きなインパクトを与えるものと思われる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CEやBEの開発により明らかになった最近急増しているアスピリン起因性小腸粘膜傷害による出血、貧血、狭窄などに対する予防策を考えるうえで重要な知見になることを

目標としている。その目的は、アスピリン起因性小腸粘膜傷害とくに小腸糜爛・潰瘍に注目し、その発生機序解明とプロバイオティクスによる予防の作用メカニズムをヒトで解明することである。これまで動物実験レベルでの小腸粘膜傷害の発生機序を検討した研究は存在するが、そのほとんどが急性の非ステロイド系消炎鎮痛剤(NSAIDs)大量投与モデルによるものである。アスピリン長期投与が本当に NSAIDs と同様の作用機序で粘膜傷害を発生させているかは不明である。さらに小規模臨床研究による胃粘膜保護剤やプロバイオティクスのアスピリン起因性小腸粘膜傷害に対する有用性の検討はなされているが、その発生機序解明と予防メカニズムをヒトで検討している論文は少ない。すなわち本研究の学術的独創性と創造性は、これまでアスピリン以外の NSAIDs を使用し動物実験で行われてきたアスピリン小腸粘膜傷害の作用機序を、アスピリン内服中のヒトで検討しその予防メカニズムも明らかとすることを目標としている点である。プロバイオティクスによるアスピリン起因性小腸粘膜傷害とくに小腸糜爛・潰瘍の発生予防が可能となれば、今後のアスピリン小腸粘膜病変の治療および予防医学に十分貢献できるものと思われる。アスピリン投与前に消化管粘膜傷害のリスク評価が可能性になり、予防措置を講ずる上での参考になる。

3. 研究方法

2021年10月から2022年3月までに東海大学八王子病院と東海大学病院に通院し大腸内視鏡検査施行予定の患者60名に文書による同意を得て行われた。その内訳は、アスピリンとPPI/P-CABのいずれも内服していないコントロール群20名、PPI/P-CABだけを内服しアスピリン内服のないPPI群20名、そしてPPI/P-CABとアスピリンを併用しているアスピリン群20名であった。患者は大腸内視鏡検査前に粘膜傷害の指標である便中カルプロテクチン検査と便中細菌叢解析のため採便検査を行い、大腸内視鏡検査ではスコープを回腸末端まで挿入した後に、同部を10ml生理食塩水にて洗浄後に回収し回腸内細菌叢解析を行った。その後、すべてのエントリー患者はプロバイオティクスである112mlの*Lactobacillus gasseri*/0LL2716(LG)を含むヨーグルトを朝夕1本ずつ6週間摂取した。LG摂取後に、再度、便中カルプロテクチン量と便中細菌叢解析をすることでプロバイオティクスの影響を検討した。また、プロバイオティクス摂取前後でGastrointestinal Symptom Rating Scale(GSRS)にて胃腸症状のアンケート調査を行った。Primary endpointはプロバイオティクス服用前後での便中細菌叢プロファイルの変化。Secondary endpointは、プロバイオティクス服用前の各群の回腸内での洗浄液を用いた細菌叢プロファイルの違い。プロバイオティクス服用前後での便中カルプロテクチン値やGSRSの変化。本研究は特定臨床研究として登録された。(No. jRCTs031200395)

除外基準は 登録前6か月以内に消炎鎮痛剤や抗生剤を投与された患者 他の乳酸菌製剤を常用している患者 乳製品にアレルギーを有する患者 重篤な肝腎障害 悪性腫瘍を有する患者 研究責任者または分担者が不適当と判断する者。

4. 研究成果

総数60名の患者が登録されたが、同意撤回やエントリー期間中の抗生剤の服用1名、アスピリンは内服していたがPPI/PCABを服用していなかった患者が4名、便サンプル量が不十分でDNA抽出できない患者1名が存在した。よって最終的にprimary endpointである便中細菌叢解析を行えた患者数はコントロール群18名、PPI群17名、アスピリン群16名であった。その3群の

患者背景では、年齢・性別・Hb・alb に有意差はないが、チャールソン併存疾患指数に有意差を認めた。

糞便による腸内細菌叢解析

LG 摂取前後において便サンプルの Observed-otus と shannon による α -diversity は、コントロール、PPI、アスピリンの 3 群間で統計学的有意差を認めなかった。各群の LG 摂取前と後における腸内細菌叢の全体構造比較は Bray-curtis と Jaccard index により算出された β -diversity indices により評価された。Bray-curtis index を用いた解析では、LG 摂取前は、コントロール群と PPI 群、コントロール群とアスピリン群間で有意差が認められたが、LG 摂取後にはそれぞれの群間有意差は消失した。PPI 群とアスピリン群の細菌叢構造は LG 摂取前摂取後のいずれにおいても差は認めなかった。Jaccard index を用いた解析では、LG 摂取前はコントロール群とアスピリン群の間に有意差が認められ、その有意差は LG 摂取後に消失した。LG 摂取前のコントロール群と PPI 群の細菌叢構造は異なる傾向を示したが、LG 摂取後にその傾向は全く見られなくなった。PPI 群とアスピリン群の細菌叢構造は LG 摂取前摂取後のいずれにおいても差は認めなかった。

LG 摂取前後における属レベルでの腸内細菌叢比較

A. LG 摂取前の 3 群間で有意差を認めていたが、LG 摂取後にその有意差が消失した菌

PPI 群における *Streptococcus* の abundance が LG 摂取前コントロール群に比し有意に増加していたが、LG 摂取後に有意差は消失した。LG 摂取前のアスピリン群における *Klebsiella* の abundance がコントロール群や PPI 群に比し有意に増加していたが、LG 摂取後に有意差は消失した。LG 摂取前にアスピリン群における *Gemella* の abundance がコントロール群に比し有意に増加していたが、LG 摂取後に有意差は消失した。

B. LG 摂取前にあった群間の有意差が LG 摂取後にも持続した菌

LG 摂取前にアスピリン群における *Slackia* の abundance が PPI 群に比し有意に増加していたが、LG 摂取後にもその有意差は持続した。LG 摂取前にアスピリン群における *Holdemania* の abundance がコントロール群や PPI 群に比し有意に増加していたが、LG 摂取後にもその増加は持続した。

C. LG 摂取前には群間の有意差を認めていなかったが、LG 摂取後に群間の有意差が新たに出現した菌

LG 摂取前の 3 群間で有意差を認めていないが、LG 摂取後に PPI 群とアスピリン群における *Actinomyces* の abundance はコントロール群に比し有意に増加した。また、LG 摂取後に PPI 群の *Agathobacter* はコントロール群に比し有意に低下した。LG 摂取後に PPI 群とアスピリン群の *Rothia* はコントロール群に比し有意に増加した。

D. その他

LG 摂取前に PPI 群における *Lactobacillus* の abundance はコントロール群に比し有意な増加を認めており、その有意差は LG 摂取後も残存した。さらに、LG 摂取後にはアスピリン群もコントロール群に比し abundance の有意な増加が出現した。*Lactobacillus* の占有率は高く腸管粘膜傷害改善に寄与している可能性がある。

各群内において LG 摂取前後で占有率が有意に変化した菌

コントロール群では、LG 摂取後 *Bacillus*, *Bacteroides*, *Butyricoccus*, *Romboutsia* の 4 種が有意に低下していた。PPI 群では、[*Ruminococcus*] *torques* group, *Unclassified Enterobacteriaceae* の 2 菌種が LG 摂取後有意に低下し、アスピリン群では病原菌として知られる *Turicibacter* が LG 摂取後有意に低下した。

回腸洗浄液による腸内細菌叢解析

回腸粘膜洗浄サンプルの Observed-otus と shannon による α -diversity は、コントロール、PPI、アスピリンの 3 群間で違いを認めなかった。

腸内細菌叢の全体構造比較は Bray-curtis と Jaccard index により算出された β -diversity により評価されたが、3 群間で差を認めなかった。

群間比較では、PPI 群における *Porphyromonas* の abundance がアスピリン群に比し有意に増加していた。一方で *Unclassified Ruminococcaceae* の abundance はアスピリン群が PPI 群に比し有意に増加していた。さらに、アスピリン群における *Holdemania* の abundance がコントロール群や PPI 群に比し有意に増加していた。

Fecal calprotectin (FC) 濃度

LG 服用前の FC 濃度は 3 群間で違いは認められなかった。また、各群内での LG 摂取前後の FC 濃度は有意な変化を認めなかった。

GSRs

3 群間の GSRs スコアは LG 摂取前で差はなく、LG 摂取後でも統計学的有意な差を認めなかった。一方、群内での LG 摂取前後の比較では、コントロール群とアスピリン群で明らかな改善を認めたが、PPI 群では差を認めなかった。

今回の検討では、FC がカプセル小腸内視鏡ほどアスピリン粘膜傷害を拾い上げる感度が高くなく、小腸粘膜傷害の回復とプロバイオティクスの関連を再現することはできなかったが、これまでの検討からプロバイオティクス摂取は、アスピリン投与によって生じた腸管内細菌叢の変化に remodelling を生じさせ腸管粘膜傷害軽減に寄与した可能性があると言える。今回の結果は、今後、LDA 誘発小腸粘膜障害の予防と治療におけるプロバイオティクスの臨床応用に十分な可能性を提供できたと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 鈴木孝良	4. 巻 46
2. 論文標題 プロバイオティクスによるアスピリン小腸粘膜傷害改善の病態解明.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 432-433
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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寺邑英里香、 張つぼみ、津田真吾、広瀬俊治、永田順子、松嶋成志、古賀泰裕、藤原慎、木村勝紀、鈴木孝良
2. 発表標題 アスピリンによる腸内細菌叢変化に対するプロバイオティクスの影響
3. 学会等名 日本消化器病学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺邑英里香、 張つぼみ、津田真吾、広瀬俊治、永田順子、松嶋成志、古賀泰裕、藤原慎、木村勝紀、鈴木孝良
2. 発表標題 PPIによる腸内細菌叢変化に対するプロバイオティクスの影響
3. 学会等名 日本小腸学会
4. 発表年 2022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
研究分担者	松嶋 成志 (Matsushima Masashi) (60280947)	東海大学・医学部・教授 (32644)	

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