

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08376

研究課題名（和文）腸内細菌叢からみた過敏性腸症候群の病態解明

研究課題名（英文）Pathophysiology of irritable bowel syndrome from the viewpoint of intestinal microbiota

研究代表者

鎌田 和浩（Kamada, Kazuhiro）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・客員講師

研究者番号：80616350

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、機能的消化管疾患の代表である過敏性腸症候群における腸内細菌叢の変化と、過敏性腸症候群の動物モデルである母子分離ストレスモデル、および拘束ストレスモデルのラットを使用し、その表現型と腸内細菌叢の関連について検討を行った。母子分離ストレスラットにおいて、ストレスにより腸管蠕動運動が通常ラットより過敏となること、母子分離ストレスラットと通常ラットでは腸内細菌叢が異なっていること、その腸内細菌の変化は生後8週ですでに完成されていることを明らかにした。またCRF投与による擬似ストレスによって起こる腸管蠕動亢進が、腸内細菌叢や腸管内の代謝物の変化によって効果が発現されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過敏性腸症候群は、現在のストレスの多様化とともに若年の生産年齢層を中心に発症頻度が高く、社会的問題となっている疾患群である。また、致命的な疾患ではないものの、罹患すると安静的な経過をたどり症状により社会生産性が低下することが問題となっている。本研究では過敏性腸症候群の動物モデルを使用し、ストレスによる消化管症状の発現が、腸内細菌叢の変化や腸内代謝産物の変化により引き起こされることを明らかにした。これにより、治療として腸内細菌叢をターゲットとしたプレバイオティクスやプロバイオティクスによる介入での症状改善の可能性が考慮される。

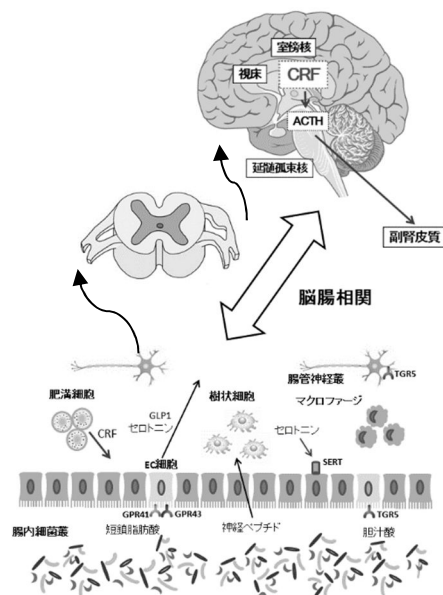
研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated changes in the intestinal microbiota in irritable bowel syndrome, a representative of functional gastrointestinal disorders, and the relationship with the phenotype of the intestinal microbiota using two animal models of irritable bowel syndrome, the mother-infant separation stress model and the restraint stress model rats. We found that the intestinal peristalsis of mother-infant stress rats was more irritable than that of normal rats, that the intestinal microbiota of mother-infant stress rats was different from that of normal rats, and that the intestinal microbiota changes were already completed at 8 weeks of age. We also revealed that the effect of increased intestinal peristalsis induced by pseudo-stress induced by CRF administration is manifested by changes in the intestinal microbiota and metabolites in the intestinal tract.

研究分野：機能的消化管疾患

キーワード：過敏性腸症候群 腸内細菌叢 母子分離ストレス コルチコトロピン放出ホルモン 腸管蠕動運動

1. 研究開始当初の背景

過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome: IBS) は腸管内に器質的な異常を認めないにもかかわらず、下痢や便秘が慢性的に持続する消化管運動機能異常である。社会的ストレスの多様化、増加に伴い、非びらん性胃食道逆流症 (non-erosive reflux disease: NERD) 機能性ディスペプシアとともにストレス関連の消化器疾患として、若年の社会生産の中心を担う世代の生活の質を大きく低下させる原因となっている。その発症機序に関しては、心理的、また身体的なストレス要因に加え、腸内細菌を含めた脳腸相関として内臓知覚過敏や消化管運動の障害がそれぞれ互いに影響し合っていると考えられており、その調節にコルチコトロピン放出ホルモン (corticotropin-releasing hormone: CRH) から始まる視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質軸を中心とした信号伝達経路の関与が注目されている(右図)。しかし、その複雑な病態生理から発症機序に関しては不明な点も多く、有効とされる治療もいまだ少ない現状である。腸管には中枢の脳神経と直接的なネットワークを持つ神経は少ないにもかかわらず、多くの神経細胞が存在し、これらは様々な食物の摂取に反応し、蠕動運動の調節、また胃や腸管よりのホルモンの分泌調整を行い、脳とは独立した指令系統である一方で、脳腸相関として主に自律神経を介し、密接につながっている。また、脳腸相関には腸内細菌叢などの腸内環境が大きく関与しており、それらの変化が脳にも作用することが知られているが、これらの信号伝達において何が重要であるかはいまだはっきりとした解答はない。



2. 研究の目的

当研究は、IBS 動物モデルとして広く使用されている拘束ストレスモデルと母子分離ストレスモデル、またストレスホルモンであるコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) 投与による急性ストレスモデルといったストレス負荷を行った動物モデルを使用し、ストレスに起因する消化管運動機能障害における、腸内細菌叢の変化と腸管局所、及び脊髄後根神経節における生理活性物質や代謝物質、腸管の粘膜透過性との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

当研究では 3 種類のストレス負荷動物のモデルを作成し、検討を行った

1. 拘束ストレスモデル

7 週齢の Wistar 雄性ラットを使用し、7 日間連続で 1 日 2 時間、拘束用ケージ内にラットを拘束し、ストレスモデルを作成した (拘束ストレス群)。ストレス負荷をしていないコントロール群のラットとともに、8 日目に犠死させ、小腸粘膜を採取し、粘膜内のタイトジャンクション蛋白の発現を RT-PCR で検討した。また、小腸組織を使用し、ussing chamber にて粘膜透過性の変化を検討した。

2. 母子分離ストレスモデル

Wistar 系雄性ラット使用し、通常飼育のラット (コントロール群) と、生後 2 日目から 14 日目まで、1 日 3 時間母親と分離飼育することにより、成体時にストレスモデルが成立する母子分離ストレスモデルラット (母子分離群) を使用した。両群の糞便を 4 週齢より経時的に採取し、16 s メタゲノム解析を使用し腸内細菌叢の変化を検討した。また、10 週齢で犠死させ、小腸粘膜を採取し、粘膜内のタイトジャンクション蛋白の発現を RT-PCR で検討した。

3. CRH 投与急性ストレス疑似モデル

ストレスホルモンと言われているコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) を投与することにより、急性ストレス負荷を疑似できることが知られている。強力な抗酸化活性と抗炎症活性を有するカロテノイドであるアスタキサンチンのストレスに対する効果を検討するために、Wistar 系雄性ラット使用しアスタキサンチン 0.02% 含有食を 4 週間摂取させた群 (アスタキサンチン群) と通常食を摂取させた群 (コントロール群) に分けた後、CRH を尾静脈より静脈内投与し、腸管運動亢進の指標として投与後 2 時間での排便個数を検討した。また、16 s メタゲノム解析を使用

し糞便中の腸内細菌叢、短鎖脂肪酸の変化を検討した。

4. 研究成果

検討1 拘束ストレスモデル

小腸粘膜でのタイトジャンクション蛋白は、occludin, claudin 1, claudin 2, claudin 3, claudin 4, claudin 6 の発現を検討したが、claudin 4 のみ拘束ストレス群で優位に発現が上昇していた。しかし、Ussing chamber の検討では、小腸の組織の透過性は、コントロール群と拘束ストレス群では有意差を認めなかった。拘束ストレスにより、小腸粘膜のタイトジャンクション発現には影響したが、実際の粘膜透過性の変化までは認めず、腸管局所の透過性に関しては、拘束ストレスでは大きく変化を与えない結果であった。

検討2 母子分離ストレスモデル

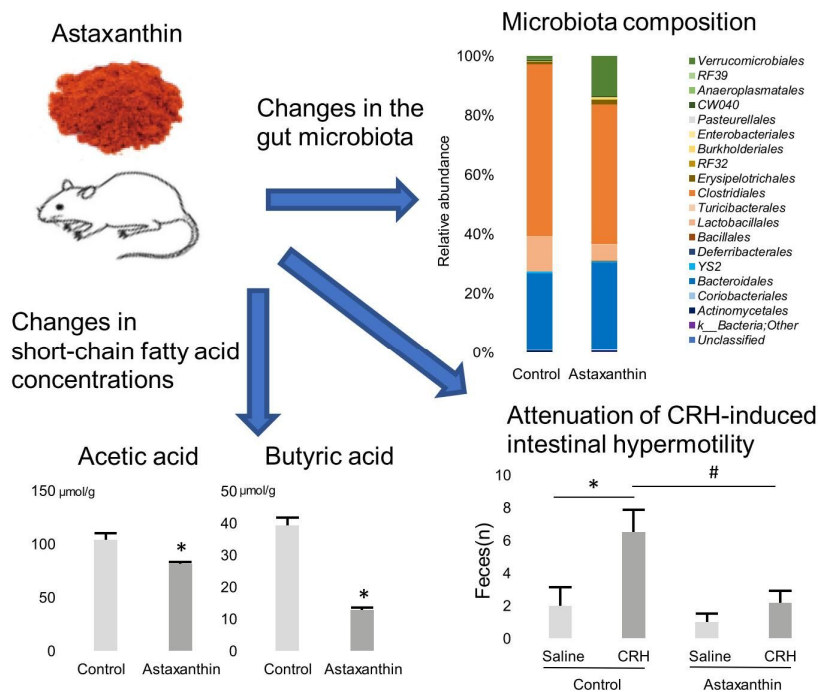
ストレスの評価として、オープンフィールド試験、及び高価式十字迷路試験を行ったところ、オープンフィールド試験では立ち上がり回数が母子分離群で減少し、高価式十字迷路試験では open arm への立ち入り回数や滞在時間が母子分離群ではコントロール群に比し、減少を認め、母子分離群へのストレス負荷がかかっていることが確認された。

8週齢での糞便内の腸内細菌叢の検討では、コントロール群と母子分離群では主座標分析において有意にその構成は異なっていた。しかし、経時的な変化の検討では、糞便採取を開始した4週齢においてすでに腸内細菌叢の変化はほぼ完成されており、変化は4週齢以前に起こっていることが判明した。

小腸粘膜のタイトジャンクション蛋白の検討では、コントロール群と比較し、母子分離群で occludin, JAM, claudin 1, claudin 2 に有意な低下を認めた。

検討3. CRH 投与急性ストレス疑似モデル

コントロール群ではCRHの静脈投与によりその後2時間における排便数が有意に増加したが、アスタキサンチン群では変化はなかった。これより、アスタキサンチンが急性ストレスに起因する腸管蠕動運動の亢進を抑制する効果があることが判明した。また、腸内細菌叢の検討では、アスタキサンチン群の糞便中の腸内細菌叢はコントロール群から有意に変化していた。糞便中の短鎖脂肪酸に関しては、アスタキサンチン群の酢酸および酪酸濃度はコントロール群より有意に低異結果であった。アスタキサンチンはCRH誘発性腸管運動亢進を抑制し、腸内細菌叢組成およびSCFAを変化させた。



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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yasuda R, Kamada K, Murakami T, Inoue R, Mizushima K, Hirose R, Inoue K, Dohi O, Yoshida N, Katada K, Uchiyama K, Handa O, Ishikawa T, Takagi T, Konishi H, Naito Y, Itoh Y.	4. 巻 93
2. 論文標題 Astaxanthin attenuated the stress-induced intestinal motility disorder via altering the gut microbiota	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Vitam Nutr Res	6. 最初と最後の頁 427-437
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1024/0300-9831/a000756	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 Yasuda Ritsu, Kamada Kazuhiro, Murakami Takaaki, Inoue Ryo, Mizushima Katsura, Hirose Ryohei, Inoue Ken, Dohi Osamu, Yoshida Naohisa, Katada Kazuhiro, Uchiyama Kazuhiko, Handa Osamu, Ishikawa Takeshi, Takagi Tomohisa, Konishi Hideyuki, Naito Yuji, Itoh Yoshito	4. 巻 -
2. 論文標題 Astaxanthin attenuated the stress-induced intestinal motility disorder via altering the gut microbiota	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal for Vitamin and Nutrition Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1024/0300-9831/a000756	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 鎌田和浩、内藤裕二	4. 巻 73
2. 論文標題 機能性胃腸症とマイクロバイオーム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 最新医学	6. 最初と最後の頁 1647-1653
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 鎌田和浩	4. 巻 23
2. 論文標題 腸内細菌と消化管運動	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本創傷・オストミー・失禁管理学会誌	6. 最初と最後の頁 169
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kazuhiro Kamada, Ritsu Yasuda, Takaaki Murakami, Ryo Inoue, Katsura Mizushima, Ken Inoue, Kazuhiro Katada, Kazuhiko Uchiyama, Takeshi Ishikawa, Tomohisa Takagi, Yuji Naito, Yoshito Itoh
2. 発表標題 The effects of carotenoid ingestion on the expression of tight junction protein in intestine which were correlated with gut microbiota composition
3. 学会等名 Digestive Disease Week (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鎌田和浩
2. 発表標題 腸内細菌と消化管運動
3. 学会等名 第28回 日本創傷・オストミー・失禁管理学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田律、鎌田和浩、内藤裕二
2. 発表標題 幼少期ストレスIBSモデルに対する食品成分アスタキサンチンの可能性
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 鎌田和浩、安田律、内藤裕二
2. 発表標題 母子分離ストレスによる粘膜透過性と腸内細菌叢の変化の関連
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田律、鎌田和浩、内藤裕二
2. 発表標題 ラット母子分離ストレスにおける腸管粘膜透過性と腸内細菌叢の関連の検討
3. 学会等名 第47回日本潰瘍学会 / 第21回日本神経消化器病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鎌田和浩、安田律、内藤裕二
2. 発表標題 動物ストレスモデルにおけるIBS関連症状と腸内細菌叢の関連性
3. 学会等名 第16回日本消化管学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuhiro Kamada
2. 発表標題 Alteration of microbiota by maternal separation and correlation between the microbiota composition and mucosal barrier function
3. 学会等名 DDW2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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	内藤 裕二	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授	
	(Naito Yuji)		
	(00305575)	(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
---------	---------