

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K08363
研究課題名（和文）口腔内細菌叢を標的とした新規機能性ディスぺプシア治療薬開発に向けた基盤研究

研究課題名（英文）The mechanism of higher abundance of streptococcus induces duodenal hyper permeability.

研究代表者
福居 顕文（FUKUI, AKIFUMI）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：60725307
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：機能性ディスぺプシア(Functional dyspepsia: FD)症状と強い相関を示す細菌は齲歯の起因菌とされるStreptococcus infantis種であった。
FD患者では、本来口腔内細菌であるStreptococcus属が十二指腸MAMとして定着しており、FDでは菌の定着を許す十二指腸粘膜環境に変化をきたしていることが明らかになった。これらの結果から、FD患者の口腔内細菌叢解析が今後の重要なテーマであると考えられ、口腔内感染症を起因とする十二指腸の炎症応答を制御することがFD治療に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、機能性消化管疾患とされるFDが感染症の一種である可能性が示唆された。今後の検討課題として、「口腔内・十二指腸粘膜における粘膜関連細菌叢のdysbiosis - 腸管バリア維持機構・腸管粘膜免疫機構破綻」という新基軸を中心に、口腔内細菌叢であるStreptococcus属と十二指腸の炎症応答の関連を明らかにし、これらを制御することで革新的なFDの治療法に発展するシーズ開発に繋がる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this present study, we firstly clarify the relationship between upper gastrointestinal symptoms in FD and the characteristics of the gastrointestinal mucosa-associated microbiota (MAM), from the oral cavity to the descending portion of duodenum by using 16S-rRNA V3-V4 gene sequences and some questionnaires.

Streptococcus is a bacterium strongly correlated with upper gastrointestinal symptoms in FD. Duodenal dysbiosis and its potential impact on the gut must also be considered and associated with oral gut microbiota.

研究分野：上部消化管

キーワード：機能性ディスぺプシア 腸内細菌 Streptococcus属

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 機能性消化管障害の1つである機能性ディスぺプシア (Functional dyspepsia: FD) は、2016年に国際診断基準である Rome 基準が発刊され¹⁾、疾患概念がより明確になった。本邦でも2021年に日本消化器病学会から改訂版 FD 診療ガイドライン²⁾、が発刊され、国内外を問わずその診断・治療に注目が集まっている。また、本邦では、*H.Pylori* 感染症罹患率の低下から上部消化管疾患における器質的疾患の割合が減少し、相対的に FD 患者の割合が増加していることが推測されており、FD は患者 quality of life を損なうことから社会生産性の低下も危惧され^{1,2)}、その病態解明、新規治療開拓は重要な課題である。

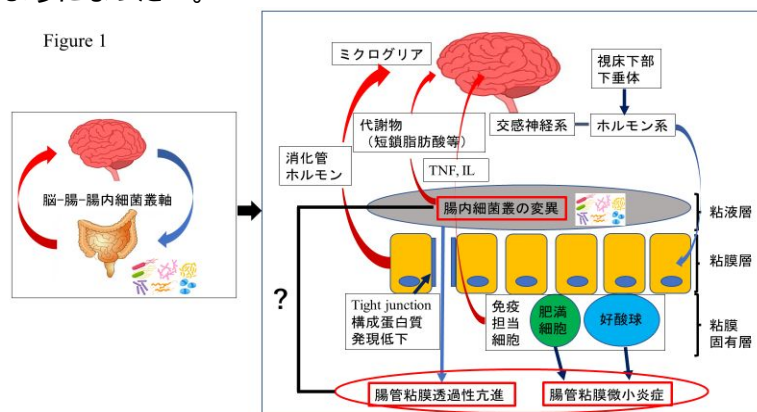
(2) 自然免疫系の解明によって、腸管炎症に対する腸内細菌の役割が注目されている。これまで、FD の病態には、消化管運動能異常、内臓知覚過敏、心理社会的因子、消化管免疫、感染性胃腸炎の既往、生育環境、遺伝的要因、運動・睡眠・食事内容や食生活などのライフスタイルといった多因子が複合的に関与し、これらを総合的に捉える概念として「脳腸相関」が FD 病態の根幹に位置すると指摘されてきた¹⁾。しかしながら、腸管内の常在菌培養は困難を極め、詳細な腸内細菌叢解析は困難であった。近年、次世代シーケンサーを用いて腸内細菌叢全体を網羅的に解析するメタゲノム解析が登場したことから腸内細菌研究は急激な進歩を遂げ、比較的安価で手軽に菌叢構成や機能解析が可能となった。感染性胃腸炎を契機に FD が発症しやすいことが明らかになって以降^{1,2)}、腸内細菌叢の変異 (dysbiosis) が FD の発病に重要な役割を果たすと考えられるようになり、脳-腸-腸内細菌叢軸 (Brain-Gut-Microbiota Axis) の病態概念が注目されるようになった。しかしながら、いまだその機序解明にはいたっていないのが現状である。

(3) また、FD 患者の十二指腸粘膜では、粘膜透過性亢進、Tight junction 構成蛋白質の発現低下、好酸球、肥満細胞、マクロファージなどの炎症性細胞浸潤が増加しており、十二指腸免疫免疫異常が FD 発症に関与していることが明らかになっている³⁾。脳-腸-腸内細菌叢軸の観点から考えると、十二指腸バリア維持機構破綻・粘膜免疫異常と腸内細菌叢との関係を明らかにすることが FD 病態解明に繋がると考えられた (Figure 1)。

2. 研究の目的

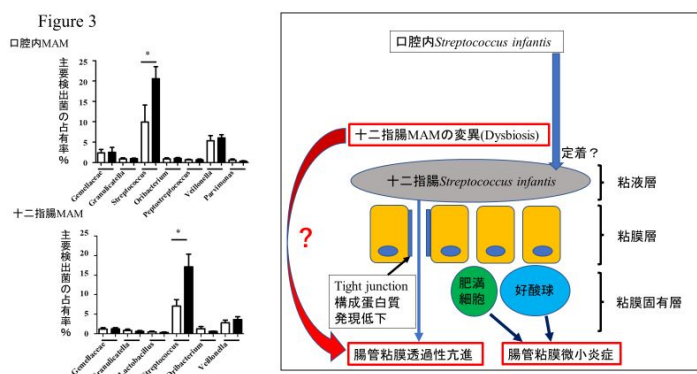
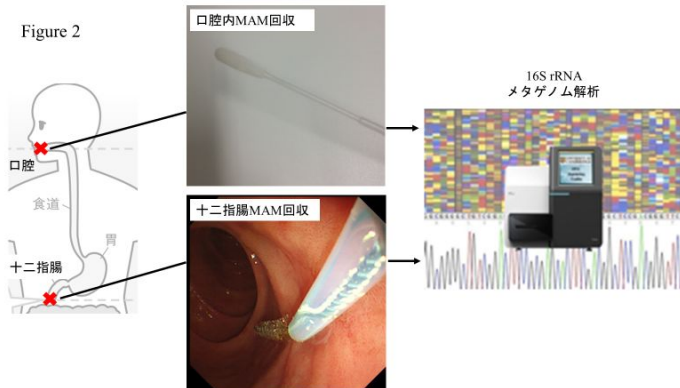
本研究の最終目的は、口腔内細菌叢が FD 病態における十二指腸粘膜免疫異常やバリア維持機構破綻に関与していることを明らかにするものである。「口腔内・十二指腸粘膜における粘膜関連細菌叢の dysbiosis - 腸管バリア維持機構・腸管粘膜免疫機構破綻」という新基軸を中心に、十二指腸炎症応答を制御することで革新的な FD の治療法に発展するシーズ開発を目的とした。

(1) これまでの腸内細菌叢解析研究では主に糞便や胃・腸液を試料として用い、これらは腸管腔内の腸内細菌叢を反映していた。腸管粘膜の防御は粘液層、粘膜層、粘膜固有層の免疫担当細胞が主に担っているが、粘膜上皮近くの主に粘液層に存在する粘膜関連細菌叢 (Mucosa-associated microbiota: MAM) がより直接的に、より高濃度の代謝物によって粘膜層に影響を及ぼすことが明らかになってきた⁴⁾ (Figure 1)。消化管のバリア維持機構破綻や粘膜免疫異常を検討する上で、粘液層に存在する MAM やその代謝物と上皮細胞の相互作用の解明が重要視されるようになった¹⁶⁾。



(2) 我々は、これまでに消化管粘液層に存在する粘液をより採取する方法とし内視鏡下にブラシを用いて検体を採取し消化管 16S rRNA メタゲノム解析手法を確立しているが⁵⁾ (Figure 2)、同手法を用いて、FD 患者と健常人の口腔内・十二指腸粘膜の MAM の比較検討を行い、FD 患者では口腔内、十二指腸粘膜いずれも *Streptococcus* 属の占有率が有意に高値であること、FD 症状スコアと口腔内・十二指腸粘膜内 *Streptococcus* 属占有率には一定の相関が認められることを明らかにした⁶⁾ (Figure 3)。

(3) 十二指腸の MAM として検出される *Streptococcus* 属は各個人の占有率から考慮すると、口腔内細菌叢由来である可能性が高く、FD 患者の口腔内細菌叢解析が、FD 発症機序解明における今後の重要な課題であると考えられた。FD 症状スコアと相関する口腔内、十二指腸 *Streptococcus* 属を種レベルで解析するとともに、口腔内細菌叢である *Streptococcus* 属が十二指腸 MAM として定着していることを明らかにすることを目的に研究を行った。



3. 研究の方法

【研究計画】

【概要】腸管バリア維持機能に関与する粘膜関連細菌叢の解析手法の確立と研究データの統合的解析を行う。FD 症状スコアと相関する口腔内、十二指腸 *Streptococcus* 属を種レベルで解析し、十二指腸 MAM として口腔内細菌叢が定着しているかを確認する。FD 患者の口腔内と十二指腸粘膜で増幅する *Streptococcus* 属菌株の同一性を検証する。

【研究方法】

内視鏡下採取検体を用い、FD 症状スコアと相関する *Streptococcus* 属を種レベルで同定する。また、FD 患者口腔内、十二指腸粘膜で増幅する *Streptococcus* 属の菌株同一性を検証する。メタボローム解析により、FD 症状と相関する新規候補代謝物・遺伝子産物を同定する。

【実験方法】

RomeIV基準を満たした *Helicobacter pylori* 陰性 FD 成人患者を対象に、口腔内、ならびに、上部内視鏡検査下に十二指腸の粘膜擦過粘液を、採取用ブラシを用いて採取した。検体は 16S リボソーム RNA 領域を増幅し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列を取得し、相同性検索および系統分類解析を実施した。臨床データを参照に FD 症状スコアを出雲スケールを用いて評価し、症状と相関する腸内細菌叢解析を行った。また、口腔内、十二指腸粘膜から採取した *Streptococcus* 属をそれぞれ単離培養し、培養上清/菌体抽出物を用い、コロニーを *Streptococcus* 属特異的 PCR で増幅し、電気泳動により菌種の同定を行い(AP-PCR 法)、両群で増幅する *Streptococcus* 属の菌株同一性を検証した。サンプル(ブラシ、生検検体)からサイトカイン、mRNA の発現を解析し、メタボローム解析を行い、*Streptococcus* 属細菌叢における代謝パスウェイ、MAM 新規代謝物、遺伝子発現解析を行い、疾患制御に繋がる新規候補代謝物・遺伝子産物の同定に役立てる予定である。

本研究は、京都府立医科大学医学倫理審査委員会の承認 (ERB-C-839) を得て実施した (UMIN000033978)。

4. 研究成果

- (1) 口腔内ならびに十二指腸 *Streptococcus* 属を対象とした、種レベルの解析では、FD 症状と強い相関を示す細菌は齲歯の起因菌とされる *Streptococcus infantis* 種であった⁶⁾。
- (2) FD 患者では、本来口腔内細菌である *Streptococcus* 属が十二指腸 MAM として定着しており、FD では菌の定着を許す十二指腸粘膜環境に変化をきたしていることが明らかになった。これらの結果から、FD 患者の口腔内細菌叢解析が今後の重要なテーマであると考えられ、口腔内感染症を起因とする十二指腸の炎症応答を制御することが FD 治療に繋がる可能性が示唆された (Figure3)。

引用文献

1. Stanghellini V, Chan FK, Suzuki H, et al. Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology* 150:1380-1392,2016.

2. 機能性消化管診療ガイドライン改定第2版.日本消化器病学会編,南江堂,2021.
3. Vanheel H, Vicario M, Vanuytsel T. et al. Impaired duodenal mucosal integrity and low-grade inflammation in functional dyspepsia. *Gut* 63: 262-271,2014.
4. Ringel Y, Maharshak N, Ringel-Kulka T. et al. High throughput sequencing reveals distinct microbial populations within the mucosal and luminal niches in healthy individuals. *Gut Microbes* 6:173–81,2015.
5. Kashiwagi S, Naito Y, Takagi T, Fukui A. et al. Mucosa-Associated Microbiota in the Gastrointestinal Tract of Healthy Japanese Subjects. *Digestion*. 101(2):107-20.2020.
6. Fukui A, Takagi T, Naito Y. et al. Higher Levels of Streptococcus in Upper Gastrointestinal Mucosa Associated with Symptoms in Patients with Functional Dyspepsia. *Digestion*. 101(1):38-45.2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 福居顕文、高木智久、北江博晃、鎌田和浩、内藤裕二	4. 巻 36
2. 論文標題 機能性消化管疾患と腸内細菌叢の変異	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床消化器内科	6. 最初と最後の頁 545-551
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福居顕文、高木智久、内藤裕二
2. 発表標題 機能性ディスペプシアにおける十二指腸粘膜関連細菌叢との関係について
3. 学会等名 第60回日本小腸学会 主題セッション2 「マイクロバイオーームと小腸疾患」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高木智久、福居顕文、内藤裕二
2. 発表標題 消化管疾患における内視鏡下採取粘膜擦過検体を用いた粘膜関連細菌叢メタゲノム解析
3. 学会等名 第99回日本消化器内視鏡学会総会ワークショップ1 「ゲノム医療における内視鏡の役割」
4. 発表年 2020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 (Naito Yuji) (00305575)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	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	高木 智久 (Takagi Tomohisa) (70405257)	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