

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07903

研究課題名(和文)過敏性腸症候群の粘膜細菌叢および糞便中有機酸解析と治療開発

研究課題名(英文) Analysis of mucosa associated microbiota and fecal organic acids and development of new treatments for irritable bowel syndrome

研究代表者

塩谷 昭子 (Shiotani, Akiko)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80275354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：過敏性腸症候群(IBS)患者の粘膜細菌叢(MAM)の検討では、健常者と比較して回腸末端で酪酸産生菌が少なく、S状結腸でDoreaが多かった。下痢型IBSと便秘型IBSの比較で細菌構成比および機能解析に差を認めた。慢性社会的敗北ストレス(cSDS)マウス群はコントロール群と比較して腸管での有意な炎症細胞の浸潤およびIL-6の増加、MUC2・SERT・HTR4の減少を認めた。脳内では下垂体のドーパミンD2受容体発現量の低下を認めた。ストレスにより腸管における炎症の惹起、セロトニンの関与、中枢におけるドーパミンの関与を確認した。網羅的遺伝子解析および糞便移植による実験を継続する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔からの通過菌を含む便の細菌叢をみるのではなく、宿主の免疫機構の調節あるいは脳腸関連に関わっていることが予想される粘膜細菌叢(MAM)を検討することは、臨床的意義を確認する上で重要である。回腸末端および大腸粘膜MAMの研究でIBS-CとIBS-DでMAMが異なることからサブタイプ別に病態解明を行い、治療戦略を検討する必要があると考えている。動物モデルの脳内の遺伝子発現におけるドーパミンの関与が示唆されたが、今後、網羅的に遺伝子解析を行い、糞便移植の効果を確認する予定である。脳腸細菌叢関連の観点からIBSの病態がさらに解明でき、IBS新規治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The study examining the mucosal microbiota (MAM) of patients with irritable bowel syndrome (IBS) indicated that Butyrate-producing bacteria were decreased in the terminal ileum and Dorea was increase in the sigmoid colon. Differences were observed in bacterial composition ratio and functional analysis between diarrhea-type IBS and constipation-type IBS. In the chronic social defeat stress (cSDS) mouse model, significant infiltration of inflammatory cells and increased IL-6, and decreased MUC2, SERT, and HTR4 were observed compared to the control group. The expression level of dopamine D2 receptors in the pituitary gland was decreased in the cSDS mouse. We are planning comprehensive genetic analysis and fecal transplantation in mouse model.

研究分野：脳腸細菌叢関連

キーワード：ドーパミンD2受容体

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome: IBS) の病態として、心理社会的要因、消化管運動機能異常、内臓知覚異常を中心とした脳腸相関の悪循環に加え、腸内細菌叢が関与する脳-腸-微生物相関が想定されている。しかし細菌叢の研究は糞便を用いた欧米の研究が中心で、症候別に粘膜細菌叢 (Mucosa-associated/adherent Bacteria, MAM) に注目した検討はほとんどない。また腸内細菌により産生される酪酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸や胆汁酸に加え、これらの受容体を有する L 細胞から産生される消化管ホルモン GLP-1 が、腸管の運動異常や知覚過敏に関与していることが報告されている。しかし糞便中の短鎖脂肪酸や GLP-1 の IBS 治療への臨床応用に関する研究はない。私たちは、粘膜ブラッシングサンプルの細菌叢が腸管免疫に影響を及ぼす MAM を反映していること、酪酸産生菌が IBS 患者の MAM で有意に減少していること、便秘型 (IBS-C) と下痢型 (IBS-D) で MAM が異なることを報告した。

2. 研究の目的

回腸および大腸の MAM および代謝産物やこれらの変化に伴う免疫・消化管ホルモン応答を解析し、IBS の病態および重症度との関連性について検討する。さらに健常者および患者の糞便中有機酸の効果、動物モデルを用いて解析することにより、臨床応用を目指す。

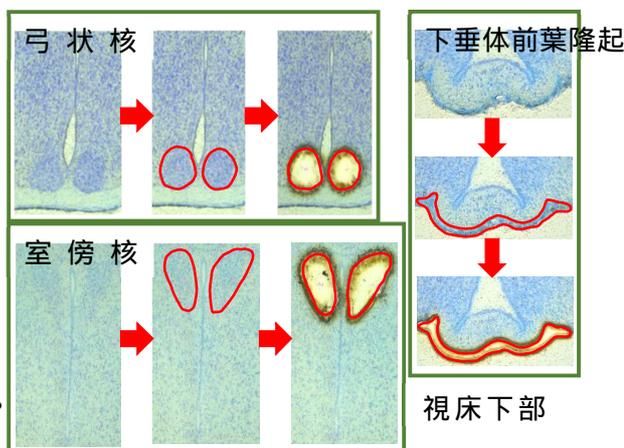
3. 研究の方法

臨床研究

大腸内視鏡検査時に、ブラッシング鉗子を用いて回腸末端、S 状結腸粘膜に付着している粘液を採取する。核酸安定剤保存液に入れる。糞便・ブラッシングサンプルより DNA を抽出し、16S rRNA の V3-V4 領域を PCR で増幅し、次世代シーケンサーにより解析する。糞便中の胆汁酸および短鎖脂肪酸はガスクロマトグラフィー質量分析法にて測定した。

動物実験

IBS マウスモデル動物として、慢性社会的敗北ストレス (chronic social defeat stress: cSDS) (4 週齢から 10 日間、毎日 10 分を連日行う) と母子分離 (maternal separation: MS) (2~14 日齢の間、1 日 3 時間の分離処置を連日行う) を使用した。血液、腸、脳のを採取し、Laser Microdissection (LMD) により視床下部、下垂体、海馬の組織から RNA を抽出し、遺伝子発現量を比較し、脳腸細菌叢相関について検討を追加した。



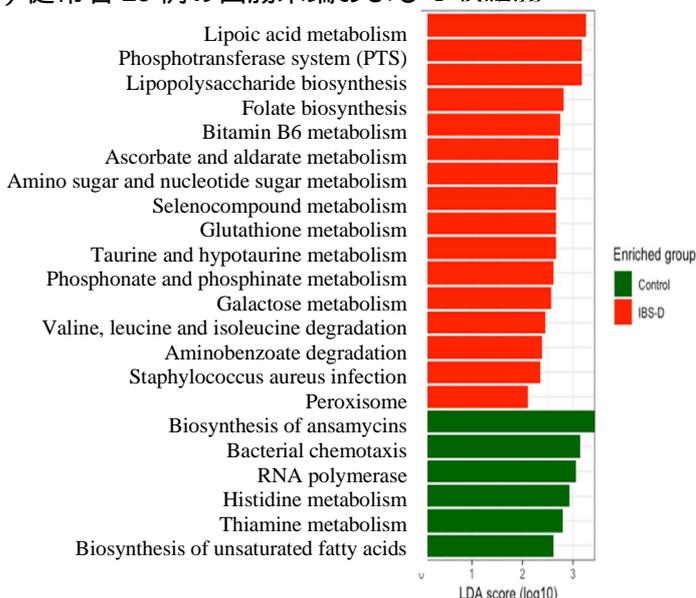
4. 研究成果

臨床研究

IBS 63 例 (IBS-D 30 例、IBS-C 33 例) 健常者 23 例の回腸末端および S 状結腸に MAM を検討した。

多様性は IBS-D で低下傾向を認めたが、多様性を含め有意差を認めなかった。IBS-C と IBS-D の MAM に違いを認めたが、IBS-C と IBS-D の回腸末端で *Butyricoccus*、*Lachnospira* が少なく、IBS-D の回腸末端で *Ruminococcus*、IBS-C の回腸末端及び S 状結腸で *Roseburia* が少なかった。酪酸産生菌が回腸末端で少なく、IBS-C と IBS-D の S 状結腸で *Dorea* が多かった。

PICRUST 解析による機能解析では、IBS-C と IBS-D に差を認め、特に IBS-D の回腸末端で健常群と属レベルの細菌構成比および機能解析で違いが顕著にみられた (図 2)。



動物実験

母子分離モデルにおいては、コントロールと比較して糞便性状の変化がみられず、慢性社会的敗北ストレスマウスモデルに急性ストレス負荷で増加が排便量及び水分量が有意に増加した。慢性社会的敗北ストレスマウスを IBS モデルマウスとして実験に用いた。

IBS 群は、成熟後体重が有意に増加し、急性ストレスで増加が抑制された。急性ストレス負荷の運動量は有意に少なかった。IBS 群のマウスは、腸管での有意な炎症細胞の浸潤を認めた。腸における IL-6 の増加；MUC2、SERT、HTR4 の mRNA 発現量の減少を認めた（図 2）。

IBS 群マウスは、コントロール群と比較して、脳内では下垂体のドーパミン D2 受容体発現量の低下を認めた（図 3）。糞便中の有機酸解析では有意な差を認めなかった。

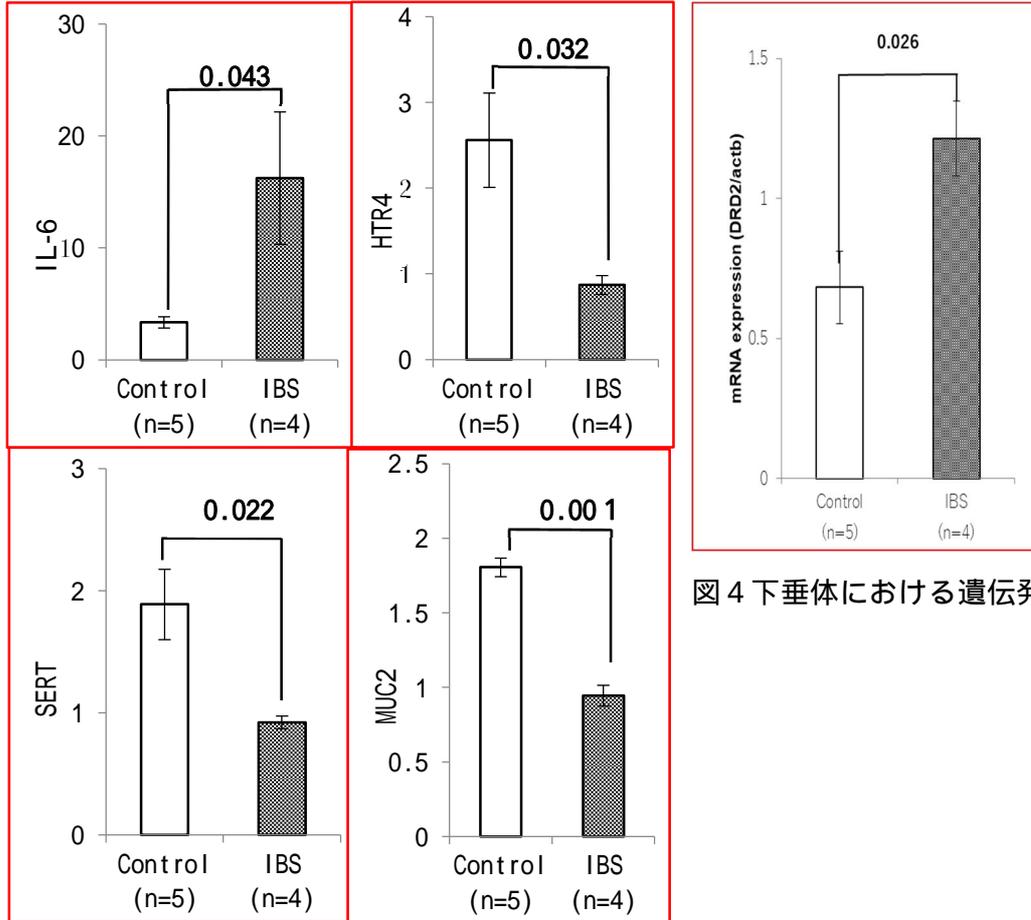
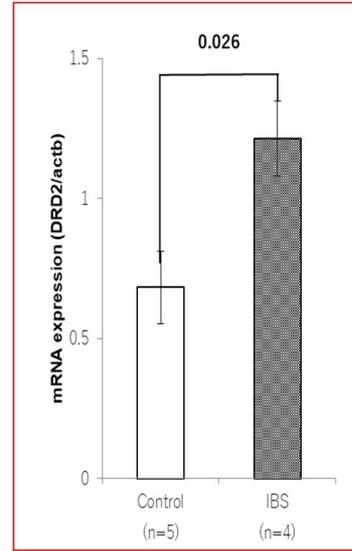


図 3、腸管における遺伝子発現量

考察 過敏性腸症候群においては病型によって腸内細菌層に相違は認められたが、下痢型・便秘型ともに回腸末端において特に酪酸酸性菌の低下が健常者と比較して認められた。しかし臨床研究、動物実験いずれにおいても糞便中の酪酸の有意な差は認められなかった。一方、IBS の病態に、微小炎症の関与が指摘されているが、動物モデルの検討においても腸管の有意な炎症所見および IL-6 の発現増加および MUC2 の発現低下を認めた。おそらく主に回腸における腸内細菌叢を介した消化管免疫が腸管局所の炎症に関与している可能性が示唆された。さらに動物実験で、IBS 群での腸管の SERT および HTR4 の発現低下を認め、セロトニンによる消化管への影響が考えられた。一方で下垂体における DRD2 の上昇は、dopamine は運動の亢進やうつ改善と関係することから、中枢での dopamine 低下による代償性の発現増加の可能性が考えられる。今後は網羅的遺伝子解析を行う予定である。

図 4 下垂体における遺伝子発現



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukushima S, Shiotani A, Matsumoto H, Handa O, Handa Y, Osawa M, Murao T, Umegaki E, Kawano M, Inoue R, Naito Y.	4. 巻 70(2)
2. 論文標題 Comparison of mucosa-associated microbiota in Crohn's disease patients with and without anti-tumor necrosis factor- therapy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr	6. 最初と最後の頁 182-188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbrn.21-41	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto H, Shiotani A, Katsumata R, Fukushima S, Handa Y, Osawa M, Murao T, Handa O, Umegaki E, Inoue R, Naito Y.	4. 巻 102
2. 論文標題 Mucosa-Associated Microbiota in Patients with Irritable Bowel Syndrome: A Comparison of Subtypes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 49-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000512167	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 Fukudo S, Okumura T, Inamori M, Okuyama Y, Kanazawa M, Kamiya T, Sato K, Shiotani A, Naito Y, Fujikawa Y, Hokari R, Masaoka T, Fujimoto K, Kaneko H, Torii A, Matsueda K, Miwa H, Enomoto N, Shimosegawa T, Koike K.	4. 巻 56
2. 論文標題 Evidence-based clinical practice guidelines for irritable bowel syndrome 2020.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 193-217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-020-01746-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 Sugiyama T, Shiotani A.	4. 巻 102
2. 論文標題 The Cutting Edge Research of Functional Gastrointestinal Disorders in Japan: Review on JGA Core Symposium 2018-2020	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestion.	6. 最初と最後の頁 6-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000510680.	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 Horie H, Handa O, Naito Y, Majima A, Yasuda-Onozawa Y, Uehara Y, Kamada K, Katada K, Uchiyama K, Ishikawa T, Takagi T, Itoh Y, Shiotani A.	4. 巻 33
2. 論文標題 Subepithelial Serotonin Reduces Small Intestinal Epithelial Cell Tightness via Reduction of Occluding Expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Turk J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 74-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5152/tjg.2022.20691	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 顧 亨々、塩谷昭子、半田修、他
2. 発表標題 過敏性腸疾患 (IBS) における腸粘膜細菌叢 (Mucosa-associated Microbiota: MAM) の解析
3. 学会等名 日本消化管学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大澤元保、村尾高久、半田 修、松本啓志、梅垣英次、塩谷昭子
2. 発表標題 過敏性腸症候群とbone marrow stromal antigen-1(BST-1)との関連性の検討
3. 学会等名 第18回日本消化管学会総会
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	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	井上 亮 (Inoue Ryo) (70443926)	摂南大学・農学部・教授 (34428)	

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