

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08677

研究課題名（和文）潰瘍性大腸炎の病態解明に向けた回腸囊炎の細菌叢解析

研究課題名（英文）The alteration of gut microbiome during treatment of pouchitis in patients with ulcerative colitis.

研究代表者

内野 基（Uchino, Motoi）

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：00388810

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）：炎症発生時には細菌叢の多様性が減少し、治療により改善を認めた。Enterobacteriaceaeが炎症時、優位に増加しており、炎症の程度と正の相関を認めた。治療により増加していたFusobacteriaceaeがほぼ消失していた。また、Lactospiraceae、Bifidobacteriaceaeが炎症時、優位に減少しており、それぞれ炎症スコアとの負の相関を認めた。炎症時に短鎖脂肪酸、遊離脂肪酸の減少も確認できた。Bifidobacteriaceaeなど短鎖脂肪酸産生細菌の減少に付随した短鎖脂肪酸、遊離型胆汁酸の減少が回腸囊炎の増悪・発症に関与している可能性を得ることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症惹起、炎症抑制候補細菌叢の同定、代謝産物変化を捉えることができたことは学術的に意義があると考えられる。今後、さらに細菌同定を進め、炎症惹起、抑制の確認を行い、原因追及が可能となれば、それをターゲットにした抗菌薬の選択、またはプレバイオティクスの利用などによる腸内環境整備を考案する一助となる。

研究成果の概要（英文）：The alpha diversity of gut microbiota was decreasing when the pouchitis developed, however those alteration of diversity was recovered from treatment. We found that the Lactospiraceae and Bifidobacteriaceae has decreased according to development of pouchitis. The short chain fatty acids and free fatty acids has also decreased with bowel inflammation. Lactospiraceae, Bifidobacteriaceae and Fusobacteriaceae could be candidate for associated microbiota with development of pouchitis in patients with ulcerative colitis.

研究分野：消化器外科

キーワード：潰瘍性大腸炎 回腸囊炎 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎は再燃を繰り返す難治性疾患で難病指定疾患である。年々患者数は増加し、本邦ではすでに 20 万人の罹患数を超えている。その発症の要因の一つには腸内細菌叢の関与が推測されているが、具体的なメカニズムは不明である。潰瘍性大腸炎では軽快しない場合、癌化する場合などでは大腸全摘手術が必要となるが、その術後には潰瘍性大腸炎関連疾患である回腸囊炎という大腸炎に類似した炎症が起こることも増加してきた。回腸囊炎の発症は潰瘍性大腸炎の免疫異常と同類であると考えられているが、抗菌薬治療によく反応することが知られているすなわち何らかの腸内細菌叢異常が関連していると考えられ、回腸囊炎の発症前後での腸内細菌叢異常を解明する事が潰瘍性大腸炎の発症メカニズムを探求する道と考えられた。まず回腸囊炎での腸内細菌叢変化、発症メカニズムを解明することを第一の研究目的とし、さらにその応用により潰瘍性大腸炎の病因解明を次の目的としている。

2. 研究の目的

潰瘍性大腸炎は病因が未だ解明されていない免疫異常に関わる難病指定疾患で増加の一途をたどっている。治療の進歩は目覚ましいが、大きな問題は再燃を繰り返し難治化することである。発症には環境因子、特に腸内細菌叢の関与が推測されているが、具体的に説明できる腸内細菌叢の質的量的異常と発症メカニズムの関連は明確ではない。本研究は上述した潰瘍性大腸炎関連疾患である回腸囊炎の発症における腸内細菌叢異常の関与を解明し、腸内細菌叢の関与へのヒントを得る事を目的とする。研究は回腸囊炎発症前後、治療前後の腸内細菌叢変化を捉え、候補細菌のマウスへの移植実験を通じて、炎症の原因細菌および代謝産物の同定を試みる。これまでの解析で、腸管環境の恒常性維持あるいは炎症惹起に関与していると考えられる細菌叢の候補を見出している。これらの候補についてさらに細かく解析し、炎症の病因解明、新たな抗菌薬やバイオティクス治療の開発を目指す。

3. 研究の方法

兵庫医科大学炎症性腸疾患外科で回腸囊炎前後の検体採取、診断を行い、兵庫医科大学病原微生物学講座と共同で検体から腸内細菌の DNA を抽出、保管する。これを理化学研究所 大野研究チームと連携して解析し、炎症の原因、抑制に関わる病原微生物異常を解明する。得られた結果をもとに、兵庫医科大学病原微生物講座と共同でマウスへの移植実験により炎症惹起の検証を行う。具体的な研究実施計画は(1)患者サンプルの採取、サンプル調整：約 5g の便を採取し、集菌後保存する。(2)細菌の培養単離：(1)のサンプルを培養し 16s rRNA 領域を増幅し、MinION にて属レベルを決定、細菌を同定する。(3)患者サンプルの MiSeq による解析：(1)にて保存した検体を酵素法で DNA を抽出し、16s rRNA の V1 領域にて解析する。(4)質量分析による代謝産物解析：糞便から水溶性代謝物と短鎖脂肪酸を抽出、誘導化処理の後、ガスクロマトグラフィー質量分析計 GCMS-TQ8040 (島津製作所) で分析を行う。データ解析は定量支援ソフト LabSolutions Insight (島津製作所) を使って定量化を行う (孫、小椋、中西、石戸)。(5)細菌のマウスへの移植による解析：抗菌薬投与で常在細菌を除去したマウスに、単離した細菌を投与、または便検体を投与し、大腸粘膜固有層の炎症状態を、好中球、好酸球、T 細胞(Th17、iTreg など)の数、炎症性サイトカインの mRNA、リポカリンを、FACS、qPCR、ELISA にて測定して調べる。

4. 研究成果

潰瘍性大腸炎関連疾患である回腸囊炎の発症における腸内細菌叢異常の関与を解明し、腸内細菌叢の関与へのヒントを得る事を目的として研究を行った。これまでに約 180 例の患者便サンプルを採取、DNA を抽出した。16s rRNA の V1 領域にて解析を進め、炎症発生時には細菌叢の多様性が減少していたが、治療によりその改善を認め、炎症惹起細菌叢の増加、または炎症抑制の細菌叢減少が起こっていると考えた。さらに細菌叢の解析を進めると、Enterobacteriaceae が炎症時、優位に増加しており、炎症の程度と正の相関を認めた。治療抗菌薬が著効した場合には、治療前に約 40%を占めていた Fusobacteriaceae がほぼ消失していた。また、Lactospiaceae、Bifidobacteriaceae が炎症時、優位に減少しており、それぞれ炎症スコアとの負の相関を認めた。次いで、細菌のマウスへの移植による解析を進めた。細菌移植を受けるマウスの常在細菌を除去し、便サンプルを投与した後、大腸粘膜固有層の炎症状態を調査している。高度炎症のサンプルは、マウス大腸において炎症細胞を優位に増加させた。Fusobacteriaceae はマウス大腸において炎症細胞を優位に増加させた。炎症を惹起しうる候補として *F. mortiferum*、Enterobacteriaceae の細菌が挙げられた。また Lactospiaceae、Bifidobacteriaceae は炎症を抑制する可能性も示唆された。炎症時に短鎖脂肪酸、遊離脂肪酸の減少も確認できた。Bifidobacteriaceae など短鎖脂肪酸産生細菌の減少に付随した短鎖脂肪酸、遊離型胆汁酸の減

少が回腸嚢炎の増悪・発症に関与している可能性を得ることが出来た。

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
研究分担者	石戸 聡 (Ishido Satoshi) (10273781)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	中西 裕美子 (Nakanishi Yumiko) (10614274)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員 (82401)	
研究分担者	堀尾 勇規 (Horio Yuki) (10838999)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	小椋 英樹 (Ogura Hideki) (20573174)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	

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	加藤 完 (Katou Tamotsu) (20632946)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ 研究員 (82401)	
研究分担者	孫 安生 (Son Aoi) (30447924)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	皆川 知洋 (Minagawa Tomohiro) (70839000)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	池内 浩基 (Ikeuchi Hiroki) (80319863)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	桑原 隆一 (Kawahara Ryuichi) (90839010)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	

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