

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670717

研究課題名(和文)メタゲノム解析による切迫早産例、子宮内膜症例における膣内ならびに腸内細菌叢の解析

研究課題名(英文)Changes of intestinal microbiome of preterm labor cases and endometriosis cases by metagenome analysis.

研究代表者

齋藤 滋 (SAITO, Shigeru)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：30175351

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)：早産ならびに子宮内膜炎は炎症性疾患である。最近の研究により炎症性疾患では腸内細菌叢が変化し炎症を惹起させることが判ってきた。そこで両疾患の腸内細菌叢をメタゲノム解析した。群間比較では有意な変化を示すgenus/speciesは検出できなかったが、早産例でEscherichia/Shigellaが多い症例が一部認められ、子宮内膜症ではMegamonasの増加やParabacteroidesの減少が認められる例もあった。今後、病態との関連性を明らかにしていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Preterm delivery and endometriosis are classified to inflammatory diseases. Recent data demonstrate that the changes of intestinal flora are correlated with inflammatory diseases by affecting immune system. Therefore, we have studied the metagenome profile in preterm labor cases and endometriosis cases. We have not found significant changes in intestinal flora, but abundance of Escherichia/Shigella was found in some preterm labor cases, and abundance of Meganonas and decreased Parabacteroides were found in some endometriosis cases. We should clarified the relationship between patients conditions and abnormality of intestinal flora.

研究分野：産科婦人科

キーワード：腸内細菌叢 早産 子宮内膜症 炎症性疾患

1. 研究開始当初の背景

炎症性疾患は全身性に生じるが、産婦人科領域では早産や子宮内膜症が代表的な疾患である。これら炎症性疾患で腸内細菌叢が変化することが、炎症性腸疾患 (IBD)、糖尿病 (DM)、関節リウマチ (RA) 等で報告されていた。申請者らも世界に先駆けて早産の腸内細菌叢が変化していることを T-RFLP 法を用いて報告 (PLoS ONE 2014) したが、メタゲノム解析の報告は皆無であり、子宮内膜症で腸内細菌叢の報告は皆無であった。

2. 研究の目的

我々はすでに早産例では腸内細菌であるクロストリジウム属が減少することを報告している。クロストリジウム属は腸内で制御性 T 細胞を誘導するので、このため炎症が助長されると考えた。そこで酪酸菌を含むピオスリー®投与前後での細菌叢の変化と早産予後につき検討した。

切迫早産で入院した患者で早産に至った群、早産とならなかった群、さらにプロバイオティック製剤であるピオスリー®を内服し、その前後での腸内細菌叢の変化と早産との関連を見ることを第一の目的とした。第二の目的として、子宮内膜症例での腸内細菌叢の変化がないかを検討した。

3. 研究の方法

糞便から DNA を抽出し 16SrRNA 遺伝子領域を PCR 増幅し、DNA を精製、抽出後に Illumina Miseq によるシーケンシングを行なった。得られた配列 (リード) から、曖昧塩基を含むリード、PhiX 由来リード、Average Quality 25 未満のリードを除去した。キメラ判定されたリードを除去した。次に Usearch を用いたクラスタリングを行い、OTU を得た。各 OTU に対して RDP Classifier を用いて細菌の属名をアサインした。次に SILVA Living Tree Project を用いて種名をアサインした。切迫

早産で入院して管理した患者で早産に至った例が 16 例、正常産となったのは 14 例であった。早産群でピオスリー®内服後 1 週間後の便を採取でき解析できたのが 10 例、正常産では 13 例であった。子宮内膜症例は 8 例、良性卵巣腫瘍は 5 例、正常非妊婦コントロールが 17 例であった。群間比較では Wilcoxon 検定を行ない、その後、多重検定補正 (FDR) を行なった。

4. 研究成果

早産群と正常産例との比較では、早産例で *Escherichia/Shigella* の多い例が認められた。ピオスリー®投与前後での細菌叢の変化を PCA 解析により検討したところ、早産群の方が正常産群に比し変動が大きかった。

切迫早産で早産した群と正常産に至った群でピオスリー®投与前、投与前後で属、種を比較したが、多重検定補正後に有意差のある属、種はなかった。またピオスリー®投与前後での細菌叢の変化につき検討したが、有意な変化は認められなかった。

正常コントロール群、子宮内膜症群、良性卵巣腫瘍群との間に腸内細菌叢の属、種とも有意差を認めなかったが、子宮内膜症の 8 例中 2 例で *Megamonas* が増加しており、逆に *Parabacteroides* が 3 例で減少していたが、今後症例数を追加して検討したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 28 件)

- 1) 米田 哲, 米田 徳子, 齋藤 滋. 074 絨毛膜羊膜炎. 周産期医学. 2017; 46: 224-225. (査読無)
- 2) Yoneda S, Shiozaki A, Yoneda N, Ito M, Shima T, Fukuda K, Ueno T, Niimi H, Kitajima I, Kigawa M, Saito S. Antibiotic therapy increases the risk of preterm birth in preterm labor without intra-amniotic microbes, but

- may prolong the gestation period in preterm labor with microbes, evaluated by rapid and high sensitive PCR system. *Am J Reprod Immunol.* 75(4):440-50(doi: 10.1111/aji.12484.), 2016. (査読有)
- 3) Yoneda N, Yoneda S, Niimi H, Ueno T, Hayashi S, Ito M, Shiozaki A, Urushiyama D, Hata K, Suda W, Hattori M, Kigawa M, Kitajima I, Saito S. Polymicrobial Amniotic Fluid Infection with Mycoplasma/Ureaplasma and Other Bacteria Induces Severe Intra-Amniotic Inflammation Associated with Poor Perinatal Prognosis in Preterm Labor. *Am J Reprod Immunol.* 75(2): 112-25.(doi: 10.1111/aji.12456.), 2016. (査読有)
 - 4) Nakabayashi Y, Nakashima A, Yoshino O, Shima T, Shiozaki A, Adachi T, Nakabayashi M, Okai T, Kushima M, Saito S. Impairment of the accumulation of decidual T cells, NK cells, and monocytes, and the poor vascular remodeling of spiral arteries, were observed in oocyte donation cases, regardless of the presence or absence of preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 114: 65-74 (doi: 10.1016/j.jri.2015.07.005.), 2016. (査読有)
 - 5) 塩崎 有宏. 齋藤 滋. 既往早産妊婦の管理 細菌性腔症・持続子宮内感染の診断と治療. *臨床婦人科産科.* 2016; 70: 20-24. (査読無)
 - 6) 塩崎 有宏. 齋藤 滋. 既往早産妊婦の管理 細菌性腔症・持続子宮内感染の診断と治療. *臨床婦人科産科.* 2016; 70: 20-24. (査読無)
 - 7) 齋藤 滋. 子宮内感染、炎症からみた早産の病態. HIGHLIGHTS OF THE RSV JAPAN GLOBAL EXPERTS ' MEETING (GEM) 2016 アップヴィ合同会社. 2016.11.2-4.
 - 8) 塩崎有宏、齋藤 滋. 腸内細菌と妊娠・出産. 診断と治療. 2016;104:175-180. (査読無)
 - 9) 米田 哲, 福田香織, 齋藤 滋. 子宮内感染症(臨床的絨毛膜羊膜炎). *ペリネイタルケア*. 新春増刊. 2016;37-45.
 - 10) Niimi H, Ueno T, Hayashi S, Abe A, Tsurue T, Mori M, Tabata H, Minami H, Goto M, Akiyama M, Yamamoto Y, Saito S, Kitajima I. Melting Temperature Mapping Method: A Novel Method for Rapid Identification of Unknown Pathogenic Microorganisms within Three Hours of Sample Collection. *Sci Rep.* 5:12543. (doi: 10.1038/srep12543), 2015. (査読有)
 - 11) Ueno T, Niimi H, Yoneda N, Yoneda S, Mori M, Tabata H, Minami H, Saito S, Kitajima I. Eukaryote-Made Thermostable DNA Polymerase Enables Rapid PCR-Based Detection of Mycoplasma, Ureaplasma and Other Bacteria in the Amniotic Fluid of Preterm Labor Cases. *PLOS ONE* .10: e0129032. (DOI:10.1371/journal.pone.0129032), 2015. (査読有)
 - 12) Toldi G, Vásárhelyi ZE, Rigó J Jr, Orbán C, Tamássy Z, Bajnok A, Shima T, Saito S, Molvarec A. Prevalence of Regulatory T-Cell Subtypes in Preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 74:110-115. (doi: 10.1111/aji.12380.), 2015. (査読有)
 - 13) Ito M, Shiozaki A, Shimizu M, Saito S. Hemolytic-uremic syndrome with acute encephalopathy in a pregnant woman infected with epidemic enterohemorrhagic Escherichia coli: characteristic brain images and cytokine profiles. *Int J Infect Dis.* 34: 119-121, (doi: 10.1016/j.ijid.2015.03.024), 2015. (査読有)
 - 14) Yoneda S, Shiozaki A, Ito M, Yoneda N, Inada K, Yonezawa R, Kigawa M, Saito S. Accurate prediction for the stage of histological chorioamnionitis before delivery by amniotic fluid IL-8 level. *Am J Reprod Immunol.* 73(6):568-576. (doi: 10.1111/aji.12360), 2015. (査読有)
 - 15) Shiozaki A, Yoneda S, Iizuka T, Kusabiraki T, Ito M, Ito M, Yoneda N, Yoshimoto H, Saito S. Prenatal diagnosis of enterolithiasis at 18 weeks: multiple foci of intraluminal calcified meconium within echogenic bowel. *J Med Ultrasonics.*42:113-116 (doi: 10.1007/s10396-014-0561-9), 2015. (査読有)
 - 16) Inada K, Shima T, Ito M, Ushijima A, Saito S. Helios-positive functional regulatory T cells are decreased in decidua of miscarriage cases with normal fetal chromosomal content. *J Reprod Immunol.*107:10-19, (DOI: 10.1016/j.jri.2014.09.053), 2015. (査読有)
 - 17) 塩崎 有宏、齋藤 滋. 細菌性腔症と早産 - 腔内細菌叢ならびに腸内細菌叢との関連性について - .*日本女性医学学会雑誌.* 2015;22:236-238. (査読無)
 - 18) 米田 哲、稲坂 淳、齋藤 滋. 切迫早産時の羊水検査. *産科と婦人科.*2015;82:19-22. (査読無)

- 19) 米田徳子, 伊東雅美, 齋藤 滋. 早産の予知・予防の新たな展開 4. 早産の予知 Amniotic fluid sludge と早産予知. 臨床婦人科産科. 2015;69(3):296-300. (査読無)
- 20) Yoshida K, Maekawa T, Zhu Y, Renard-Guillet C, Chatton B, Inoue K, Uchiyama T, Ishibashi K, Yamada T, Ohno N, Shirahige K, Okada-Hatakeyama M, Ishii S. The transcription factor ATF7 mediates lipopolysaccharide-induced epigenetic changes in macrophages involved in innate immunological memory. *Nat Immunol.* 2015;16(10):1034-43. doi: 10.1038/ni.3257. (査読有)
- 21) Sato Y, Yamagishi J, Yamashita R, Shinozaki N, Ye B, Yamada T, Yamamoto M, Nagasaki M, Tsuboi A. Inter-Individual Differences in the Oral Bacteriome Are Greater than Intra-Day Fluctuations in Individuals. *PLoS One.* 2015;10(6):e0131607. doi: 10.1371/journal.pone.0131607. (査読有)
- 22) Uchiyama T, Irie M, Mori H, Kurokawa K, Yamada T. FuncTree: Functional Analysis and Visualization for Large-Scale Omics Data. *PLoS One.* 2015;10(5):e0126967. doi: 10.1371/journal.pone.0126967. (査読有)
- 23) Wang T, Mori H, Zhang C, Kurokawa K, Xing XH, Yamada T. DomSign: a top-down annotation pipeline to enlarge enzyme space in the protein universe. *BMC Bioinformatics.* 2015;16:96. doi: 10.1186/s12859-015-0499-y. (査読有)
- 24) Migita O, Maehara K, Kamura H, Miyakoshi K, Tanaka M, Morokuma S, Fukushima K, Shimamoto T, Saito S, Sago H, Nishihama K, Abe K, Nakabayashi K, Umezawa A, Okamura K, Hata K. Compilation of copy number variants identified in phenotypically normal and parous Japanese women. *J Hum Genet.* 59: 326-31, (doi: 10.1038/jhg.2014.27), 2014. (査読有)
- 25) Shiozaki A, Yoneda S, Yoneda N, Yonezawa R, Matsubayashi T, Seo G, Saito S. Intestinal microbiota is different in women with preterm birth: results from terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *PLoS ONE.* 9:e111374 (DOI: 10.1371/journal.pone.0111374), 2014. (査読有)
- 26) Shimizu M, Kuroda M, Inoue N, Konishi M, Igarashi N, Taneichi H, Kanegane H, Ito M, Saito S, Yachie A. Extensive serum biomarker analysis in patients with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111-induced hemolytic-uremic syndrome. *Cytokine.* 66:1-6. (doi: 10.1016), 2014. (査読有)
- 27) Yoshida T, Takasaki I, Kanegane H, Inomata S, Ito Y, Tamura K, Makimoto M, Saito S, Yoshimoto Y, Miyawaki T. Intrauterine growth restriction modifies gene expression profiling in cord blood. *Pediatr Int.* 56:559-565. (doi: 10.1111/ped.12324), 2014. (査読有)
- 28) Shiozaki, A., Yoneda S., Nakabayashi M., Takeda Y., Takeda S., Sugimura M., Yoshida K., Tajima A., Manabe M., Akagi K., Nakagawa S., Tada K., Imafuku N., Ogawa M., Mizunoe T., Kanayama N., Itoh H., Minoura S., Ogino M., Saito S. Multiple pregnancy, short cervix, part-time worker, steroid use, low educational level, and male fetus are risk factors for preterm birth in Japan: A multicenter, prospective study. *J Obstet Gynaecol Res* 40: 53-61, 2014. doi: 10.1111/jog.12120. (査読有)
- [学会発表](計 24 件)
- 1) 齋藤 滋: Extremely preterm delivery (超早産)をいかにして防ぐか. 第 45 回宮城県周産期医療懇話会・第 23 回宮城県委託周産期医療研修会. 2017.1.28, 仙台(招待講演)
- 2) 山田拓司、大腸がんに関わる腸内代謝経路の探索、第 39 回日本分子生物学会年会、2016.11.30-12.2.横浜.
- 3) 山田拓司、腸内細菌のメタゲノム解析、神戸大学農工連携次世代バイオプロダクション(iBioK)主催フォーラム、2016.11.25.神戸。(招待講演)
- 4) 山田拓司、ヒト腸内細菌による疾病診断の可能性、CBI2016年大会、2016.10.25、東京。(招待講演)
- 5) 山田拓司、ヒト腸内細菌と疾患の関連性およびその医療応用可能性について、第 7 回北陸ライフサイエンスクラスターシンポジウム、2016.10.3.金沢.
- 6) 山田拓司、ヒト腸内細菌叢メタゲノム解析と疾病との関連、山田拓司、日本脂質栄養学会第 25 回大会、2016.9.16-17.新潟。(特別講演)
- 7) 齋藤 滋: 流産、早産、妊娠高血圧症候群という三大産科疾患の病態解明と治療への試み. 第 95 回未来医療セミナー大阪大学. 2016.7.28, 大阪(招待講演)
- 8) 山田拓司、大腸がんに関わる腸内代謝経路の探索、第 4 回がん代謝研究会、

- かごしま県民交流センター、2016.7.7-8、鹿児島。(招待講演)
- 9) Saito S. The pathophysiology of preterm birth from the view point of intestinal and vaginal microbiota. 13th Congress of the International Society for Immunology of Reproduction; 2016.6.22-25; Erfurt, Germany. (Invited lecture)
- 10) 齋藤 滋: 羊水内病原体検出システムを確立し、見えてきたこと。妊婦の感染と早産を考える会～新たな早産予防と治療戦略の確立に向けて。2016.5.14, 福岡。(招待講演)
- 11) 齋藤 滋: 切迫流早産における最新の知見。第22回北海道周産期研修会。2016.3.19, 札幌。(招待講演)
- 12) 齋藤 滋: これまで謎とされてきた妊娠高血圧症候群の病因・病態を明らかにする。第15回和歌山産婦人科病診連携研究会。2016.3.12, 和歌山。(招待講演)
- 13) 齋藤 滋: 早産の病態に関する最近の知見 Current topics of pathophysiology of preterm delivery. 名古屋大学「大学院特論」。2016.1.14, 名古屋。(招待講演)
- 14) 齋藤 滋: 早産の要因と対策—最近の知見を交えて—。日本大学医学部産婦人科学教室教室・同窓会合同忘年会。2015.12.12, 東京。(招待講演)
- 15) 山田拓司、ヒト腸内細菌代謝経路データベースの構築、第366回CBI学会講演会、2015.11.5.大阪(招待講演)
- 16) 山田拓司、Metabolic pathway database for Human gut microbiome、第67回日本生物工学会大会、2015.10.26-28. 鹿児島。
- 17) 齋藤 滋: 免疫学的にみた妊娠維持機構と、その破綻(教育講演)。第133回近畿産科婦人科学会学術集会。2015.10.25, 甲子園。(招待講演)
- 18) 齋藤 滋: 免疫学的妊娠維持機構から見た自己免疫合併妊娠管理(ランチタイム教育講演)。第43回日本臨床免疫学会総会。2015.10.23, 神戸。(招待講演)
- 19) Yamada.T. Metabolic pathway database for Human gut microbiome, International Symposium for Frontier of Bioinformatics, Tokyo Institute of Technology, 2015.10.16 Tokyo.
- 20) 山田拓司、Fecal metagenomic analysis of colorectal cancer cohort、第74回日本癌学会学術総会、2015.10.8-10.名古屋。(招待講演)
- 21) 齋藤 滋: 早産を科学する～子宮内炎症、感染に関する最近の知見～。第28回新生児慢性肺疾患研究会。2015.10.3, 鹿児島。(招待講演)
- 22) Saito S. Pathophysiology of preeclampsia from the view point of

- immunology. ISSHP European Congress; 2015.9.24-26; Budapest, Hungary. (Invited lecture)
- 23) 山田拓司、ヒト腸内細菌代謝機能データベースの構築、第15回日本抗加齢医学会総会、2015.5.29-31.福岡。(招待講演)
- 24) 山田拓司、ヒト腸内細菌代謝機能データベースの構築、第88回日本細菌学会総会、2015.3.26-28.岐阜。(招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
 齋藤 滋 (SAITO, Shigeru)
 富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授
 研究者番号：30175351
- (2) 研究分担者
 山田 拓司 (YAMADA, Takuji)
 東京工業大学・生命理工学院・准教授
 研究者番号：10437262