

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293167

研究課題名(和文) マイクロバイオーム解析とメタボローム解析による神経性食欲不振症の病態機序解明

研究課題名(英文) Microbiome and metabolome analysis in patients with anorexia nervosa

研究代表者

久保 千春 (Kubo, Chiharu)

九州大学・その他部局等・その他

研究者番号：80117100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、定量的PCR法に基づいたYakult Intestinal Flora-Scanを用いて、神経性食欲不振症(AN)女性患者の腸内細菌叢を年齢を一致させた健康女性と比較した。AN患者では健康群と比較し、総細菌数、Clostridium coccoides group、Clostridium leptum subgroup、Bacteroides fragilis group、およびStreptococcusの細菌数が有意に減少していた。AN群では健康者と比べ糞便中の酢酸、プロピオン酸濃度が有意に低かった。以上の結果は、AN患者では腸内細菌叢の異常が存在することを示している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we compared the fecal microbiota of female patients with AN those of age-matched healthy female controls (n = 21) using the Yakult Intestinal Flora-SCAN based on 16S or 23S rRNA-targeted RT-quantitative PCR technology. AN patients had significantly lower amounts of total bacteria and obligate anaerobes including those from the Clostridium coccoides group, Clostridium leptum subgroup, Bacteroides fragilis group, and Streptococcus than the age-matched healthy women. The detection rate of the Lactobacillus plantarum subgroup was significantly lower in the AN group than in the control group. The AN group had significantly lower acetic and propionic acid concentrations in the feces than the control group. Taken together, these results clearly show the existence of dysbiosis in the gut of AN patients.

研究分野：内科学一般(含心身医学)

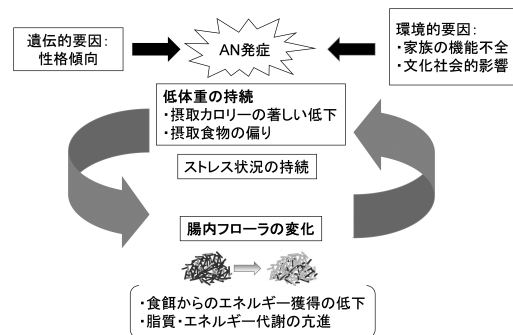
キーワード：神経性食欲不振症 腸内細菌 メタボローム マイクロバイオーム 腸内フローラ

1. 研究開始当初の背景

近年、先進国を中心に神経性食欲不振症 (anorexia nervosa: 以下 AN と略) が急増しており、大きな社会問題となっている。極端なやせを追求する AN 患者においては、体重を恒常的に増加させることが困難であり、重度の低体重 AN 患者では、免疫機能が低下し、重篤な感染症や肝機能障害を併発して死の転機をとることも珍しくない。AN の発症メカニズムを明らかにし、早期診断、治療、予防法の開発が急務とされているが、その病態は十分に解明されていない。

ヒトは腸や皮膚などに多数の常在細菌を有しており、長い進化の過程で共生関係を保っている。その数は 100 兆を超える細菌によって構成されるきわめて複雑な集団であり、その重量は成人体重の実に 1kg を占めるとされている。近年、腸内フローラの新しい生理作用が徐々に解明されているが、なかでも腸内フローラ (= マイクロバイオーム) が肥満症の発症や維持・増悪に関与していることを解明した Gordon らの報告 (Nature 2006;444:1027-1031) は世界中の研究者に衝撃をあたえた。申請者らは、長年、腸内細菌が宿主の中枢神経機能、特にストレス反応や行動に及ぼす影響について研究しているが、最近の腸内フローラ研究の動向を踏まえて、AN 患者には腸内フローラ構成の異常が生じており、それが腸管内の栄養素の吸収や代謝に影響し、やせの持続因子として作用しているという病態 (下図) を推定している。

ANの持続・増悪因子としての腸内フローラの役割 (仮説)



2. 研究の目的

本研究では、摂食障害患者において、マイクロバイオームとメタボロームを同時に解析することを通じて、AN の病態解明および治療に応用可能な知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 被験者の選択あるいは対象

適格基準: 15 歳以上から 40 歳までの構造化面接においてアメリカ精神医学会精神疾患診断統計マニュアル第 5 版の AN の診断基準を満たし、文書によって同意の得られた AN 患者 (25 名, 制限型 ANR: 14 名, 過食排出型 ANBP: 11 名)。および AN 群と年齢を一致させた健常女性 21 名 (コントロール

群)。なお、問診、身体診察によって身体疾患や精神疾患の合併が明らかになった場合は、対象から除外した。腸内フローラへの影響を考慮し、エントリー前 3 ヶ月間に抗生物質の投与を受けた場合、また患者群において中心静脈栄養による治療を行った症例も除外した。生菌製剤やそれを含むヨーグルトなどの摂取歴については専用のチェックシートを用いて詳細を記録した。

(2) 腸内フローラ解析

糞便採取キットによって採取したヒト糞便サンプルは、RNA または DNA 抽出時まで 4℃ で保存した。糞便からの RNA/DNA 抽出と解析は、腸内フローラ解析システム「YIF-SCAN」(Yakult Intestinal Flora Scan) を用いて行った (Masuda K, Nomoto K et al. Appl. Environ. Microbiol. 75: 1961-1969, 2009)。本システムは、門、属あるいは種に特異的なプライマーを用いた定量的 PCR/RT-PCR 法を原理としており、迅速、簡便および大量の腸内フローラ解析が可能となる。

(3) 血清メタボローム解析

血清メタボローム解析は、ガスクロマトグラフィー-質量分析計 (GC-MS) にて水溶性低分子代謝物と脂肪酸を、液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS) にて脂質、極性水溶性代謝物の解析を行った。

4. 研究成果

下のように AN 患者の腸内フローラは、年齢を一致させた健常者に比べ、総細菌数、最優勢菌群である *Clostridium cocoides*, *Clostridium leptum*, *Bacteroides fragilis*, *Streptococcus* などが有意に減少していた。

Table 3. Comparison of bacterial counts between the control subjects (CON) and anorexia nervosa (AN) patients.

	Log ₁₀ cells/g feces		p value	ES (r)
	CON (n = 21)	AN (n = 25)		
Total bacteria	11.1 ± 0.5	10.5 ± 0.5*	0.0002	0.5560
C. cocoides group	10.0 ± 0.4	9.3 ± 0.5*	< .0001	0.6015
C. leptum subgroup	10.4 ± 0.7	9.6 ± 0.6*	0.0006	0.5138
B. fragilis group	10.5 ± 0.6	9.6 ± 0.6*	< .0001	0.6376
Bifidobacterium	10.3 ± 0.7	9.9 ± 1.1	0.1729	0.2055
Atopobium cluster	9.3 ± 0.8	9.1 ± 1.2	0.7077	0.0553
Prevotella	6.9 ± 1.3	6.4 ± 0.8	0.3620	0.1645
Enterobacteriaceae	7.1 ± 0.9	7.0 ± 1.0	0.7046	0.0572
Enterococcus	6.2 ± 1.2	7.0 ± 1.2	0.0370	0.3144
Staphylococcus	5.3 ± 0.9	5.4 ± 0.8	0.9473	0.0098
Streptococcus	9.0 ± 0.7	8.2 ± 0.8*	0.0003	0.5616
C. difficile	< 2.4	6.3 ± 1.1	NT	NT
C. parvifragens	4.9 ± 1.3	4.6 ± 1.6	0.5478	0.1281
Total Lactobacillus	6.0 ± 1.1	5.7 ± 2.2	0.7065	0.0574
L. gasseri subgroup	5.4 ± 1.2	5.0 ± 1.8	0.2269	0.2136
L. reuteri subgroup	4.9 ± 1.0	5.0 ± 1.7	0.8748	0.0394
L. ruminis subgroup	4.2 ± 1.1	5.9 ± 2.1	0.1123	0.3869
L. plantarum subgroup	4.0 ± 0.8	3.5 ± 1.1	0.3421	0.2179
L. sakei subgroup	4.4 ± 1.3	3.9 ± 0.6	0.4743	0.1461
L. casei subgroup	5.8 ± 1.4	6.5 ± 1.4	0.3787	0.1921
L. brevis	5.3 ± 0.3	4.2 ± 0.4	0.2453	0.5810
L. fermentum	4.6 ± 0.7	8.7	0.2416	0.4781

C, Clostridium; B, Bacteroides; L, Lactobacillus; ES, effect size; NT means "not tested" because at least one group is below detection limits. The total count of Lactobacillus obtained by YIF-SCAN is expressed as the sum of the counts of 6 Lactobacillus subgroups and 2 species. An asterisk (*) indicates a significant difference between the AN and control group after the Bonferroni correction based on the number of tests (n = 21, p < 0.0024 (0.05/21)).

病型別解析では、制限型、排出型ともに *Bacteroides fragilis* の菌数減少が顕著であった。

興味深いことに *Lactobacillus plantarum* の検出率は AN 群において有意に定値であった。また *Clostridium difficile* は ANBP 群の 11 例中 5 例で検出され、健常群、ANR 群では検出されなかった。短鎖脂肪酸濃度に関しては、AN 群は健常群と比較し、酢酸、プロピオン酸の濃度が有意に低かった。

Table 7. Comparison of organic acids and pH between the control subjects (CON) and anorexia nervosa (AN) patients.

	µmol/g feces		p value	ES (†)
	Controls (n = 21)	AN (n = 25)		
Total organic acids	87.9 ± 43.9	54.3 ± 20.6	0.0049	0.4268
Succinic acid	5.9 ± 10.6	16.4 ± 15.0	0.3506	0.2200
Lactic acid	11.2 ± 12.8	0.9	0.2888	0.4743
Formic acid	0.1 ± 0.0	2.27 ± 2.71	0.0265	0.6405
Acetic acid	58.6 ± 27.0	38.7 ± 13.2*	0.0603	0.5465
Propionic acid	15.2 ± 5.9	9.3 ± 4.8*	0.0010	0.4957
Iso-butyric acid	1.2 ± 1.4	13.6 ± 8.2	0.0591	0.6674
Butyric acid	0.6 ± 7.5	3.8 ± 2.5	0.0082	0.5089
Novilenoic acid	3.1 ± 2.2	4.3 ± 1.4	0.18	0.3883
Valeric acid	4.2	4.7 ± 1.2	1	0
pH	6.74 ± 0.94	7.37 ± 0.86	0.0374	0.3103

ES: effect size. Total organic acid concentration is expressed as the sum of the concentrations of 9 acids. An asterisk (*) indicates a significant difference between the AN and control groups after a Bonferroni correction based on the total number of tests (n = 11, p < 0.0045 (0.05/11)).

以上の結果はAN患者の腸内では腸内細菌叢の異常、いわゆる“dysbiosis”が生じていることを示している。このAN患者で認められた腸内細菌叢の異常がANの病態形成にどのように関与しているかについて検討する予定である。

血清メタボローム解析では、AN患者は、健常者と比較し、必須アミノ酸およびその代謝産物の濃度が有意に低かった。またAN患者においては、その生成が腸内細菌と関連している一部の uremic toxin 濃度が、健常者と比較し、高値であった。現在、さらなる詳細な解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)

(1) Nishino R, Sudo N, et al., Commensal microbiota modulate murine behaviors in a strictly contamination-free environment confirmed by culture-based methods., *Neurogastroenterology & Motility.*, 査読有, 25, 2013, 521-528.

(2) 須藤 信行., 摂食障害の治療の進歩 摂食障害治療の最近の工夫 身体面の治療と心理療法について., *心身医学.*, 査読有, 53(9), 2013, 834-840.

(3) 河合 啓介., 生活習慣の見直しとストレス解消のすすめ 腸内フローラとストレス., *皮膚の科学.*, 査読有, 12, 2013, 37-41.

(4) Sudo N, Mark Lyte, John F. Cryan., *Microbiome. HPA Axis and Production of Endocrine Hormones in the Gut.*, *Microbial Endocrinology.*, 査読有, 1, 2014, 177-194.

(5) 古賀 泰裕., 【Bacterial translocation と諸疾】 Bacterial translocation とプロバイオティクス., *G.I. Research.*, 査読有, 22(4), 2014, 343-348.

(6) 古賀 泰裕., H.pylori 感染症に対するプロバイオティクス., *感染症内科.*, 査読有, 2(4), 2014, 424-430.

(7) 山下 さきの, 河合 啓介, 山口 貞子, 吉田 実, 大部 一成, 野田 英一郎, 高倉 修, 瀧井 正人, 久保 千春, 須藤 信行., 神経性食欲不振症患者の Refeeding 症候群に対する高リン含有栄養補助食品の利用の試み.,

静脈経腸栄養., 査読有, 29(6), 2014, 1379-1383.

(8) Kawai K, Yamashita S, Komaki G, Shimizu M, Nakashima M, Etou S, Takakura S, Takii M, Kubo C, Sudo N., The outcome of treatment for anorexia nervosa inpatients who required urgent hospitalization., *Biopsychosoc Med.*, 査読有, 3;8, 2014, 20.

(9) Chijiwa T, Oka T, Lkhagvasuren B, Yoshihara K, Sudo N., Prior chronic stress induces persistent polyI:C-induced allodynia and depressive-like behavior in rats: Possible involvement of glucocorticoids and microglia., *Physiol Behav.*, 査読有, 1;147, 2015, 264-73.

(10) Takakura S, Yokoyama H, Suzuyama C, Tatsushima K, Yamashita M, Gondou M, Morita C, Hata T, Takii M, Kawai K, Sudo N., Three cases of appendicitis with anorexia nervosa under inpatient care., *J Eat Disord.*, 査読有, 6;3, 2015, 38.

(11) Morita C, Tsuji H, Hata T, Gondo M, Takakura S, Kawai K, Yoshihara K, Ogata K, Nomoto K, Miyazaki K, Sudo N. Gut Dysbiosis in Patients with Anorexia Nervosa., *Plos One.*, 査読有, 18;10(12), 2015, e0145274.

(12) Tsuda A, Suda W, Morita H, Takanashi K, Takagi A, Koga Y, Hattori M., Influence of Proton-Pump Inhibitors on the Luminal Microbiota in the Gastrointestinal Tract., *Clin Transl Gastroenterol.*, 査読有, 11;6, 2015, e89.

〔学会発表〕(計21件)

(1) 須藤 信行. ストレス関連疾患の病態と治療, 第62回東北支部主催生涯教育講演会, 2014年2月15日, 宮城.

(2) 須藤 信行. 腸内細菌とこころの発達, 第13回抗加齢医学の実際2013, 2013年9月16日, 東京.

(3) Takakura S, Kawai K, Hiramoto T, Takii M, Kubo C, Sudo N. Specific microRNA expressions under chronic starvation stress in mouse hippocampus, The ICPM 2013 Congress, 2013年9月13日, ポルトガル.

(4) Kawai K, Nakashima M, Yamashita S, Takakura S, Takii M, Kubo C, Sudo N. Ghrelin activation in response to medium chain fatty acid administration in patient with anorexia nervosa, The ICPM 2013 Congress, 2013年9月13日, ポルトガル.

(5) Sudo N. Gut microbiota influence stress response and behavior of the host, The 16th Congress of Asian College of Psychosomatic Medicine, August 22nd, 2014, Indonesia.

(6) 須藤 信行. 腸内細菌と脳腸相関 心身医学研究の新しい展開, 第 55 回日本心身医学会総会ならびに学術講演会, 2014 年 6 月 7 日, 千葉.

(7) 須藤 信行. 腸内細菌によるストレス反応・行動特性の制御, 第 10 回日本食品免疫学会学術大会, 2014 年 10 月 17 日, 東京

(8) 須藤 信行. 内科領域におけるストレス関連疾患の病態と治療, 第 53 回九州支部生涯教育講演会(日本内科学会九州支部), 2015 年 1 月 10 日, 福岡.

(9) 須藤 信行. 腸内細菌によるストレス反応・行動特性の制御, 第 88 回日本内分泌学会学術総会, 2015 年 4 月 24 日, 東京.

(10) 須藤 信行. 腸内細菌によるストレス反応・行動特性の制御, 第 24 回日本臨床環境医学会学術集会, 2015 年 6 月 7 日, 東京.

(11) 須藤 信行. 腸内細菌から見た栄養学プロバイオティクス・プレバイオティクスの臨床応用の可能性, 第 56 回日本心身医学会総会ならびに学術講演会, 2015 年 6 月 27 日, 東京.

(12) 須藤 信行. 腸内細菌と脳腸相関, 第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会合同年会, 2015 年 9 月 26 日, 東京.

(13) 須藤 信行. 症状としての過食: 腸内細菌からみた摂食障害, 第 31 回日本ストレス学会学術総会, 2015 年 11 月 7 日, 東京.

(14) 須藤 信行. 脳腸相関に基づく消化器・心療内科診療の新展開 腸内細菌からみた脳腸相関, 第 20 回日本心療内科学会総会・学術大会, 2015 年 11 月 21 日, 岩手.

(15) 辰島 啓太, 河合 啓介, 須藤 信行. 30 歳以上の神経性やせ症患者における骨密度の検討, 第 88 回日本内分泌学会学術総会, 2015 年 4 月 24 日, 東京.

(16) 中島 めぐみ, 河合 啓介, 高倉 修, 清水 美希, 榎藤 元治, 森田 千尋, 山下 真, 須藤 信行. 神経性食欲不振症患者における脳波研究 高速フーリエ変換を用いた優位律動の周波数解析, 第 56 回日本心身医学会総会ならびに学術講演会, 2015 年 6 月 26 日, 東

京.

(17) 森田 千尋, 波多 伴和, 榎藤 元治, 高倉 修, 河合 啓介, 辻 浩和, 緒方 清仁, 野本 康二, 宮崎 幸司, 須藤 信行. 神経性食欲不振症患者における腸内フローラの解析, 第 56 回日本心身医学会総会ならびに学術講演会, 2015 年 6 月 26 日, 東京.

(18) 清水 美希, 河合 啓介, 高倉 修, 榎藤 元治, 森田 千尋, 波多 伴和, 辰島 啓太, 中島 めぐみ, 須藤 信行. Anorexia nervosa における極長鎖脂肪酸についての検討, 第 56 回日本心身医学会総会ならびに学術講演会, 2015 年 6 月 26 日, 東京.

(19) 榎藤 元治, 河合 啓介, 守口 善也, 樋渡 昭雄, 高倉 修, 森田 千尋, 山下 真, 須藤 信行. 神経性食欲不振症患者のデフォルトモードネットワーク, 第 56 回日本心身医学会総会ならびに学術講演会, 2015 年 6 月 26 日, 東京.

(20) 高倉 修, 西原 智恵, 波多 伴和, 山下 真, 榎藤 元治, 森田 千尋, 瀧井 正人, 河合 啓介, 須藤 信行. 若年発症神経性やせ症の一治療例, 第 56 回日本心身医学会総会ならびに学術講演会, 2015 年 6 月 27 日, 東京.

(21) 河合 啓介, 山下 さきの, 高倉 彦, 榎藤 元治, 森田 千尋, 江藤 紗奈美, 中島 めぐみ, 清水 美希, 小牧 元, 須藤 信行. 身体的要因で緊急入院した神経性やせ症の心理社会的特徴と予後に関する研究, 第 56 回日本心身医学会総会ならびに学術講演会, 2015 年 6 月 27 日, 東京.

〔図書〕(計 1 件)

(1) 須藤 信行. 「腸内細菌と脳機能」, ヒトマイクロバイオーム研究最前線(服部正平, 監修), pp442, 2016, 株式会社エヌ・ティ・エス

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 千春(KUBO CHIHARU)

九州大学・総長

研究者番号: 80117100

(2) 研究分担者

高倉 修(TAKAKURA SHU)

九州大学病院・助教
研究者番号：40532859

古賀 泰裕 (KOGA YASUHIRO)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：60170221

須藤 信行 (SUDO NOBUYUKI)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：60304812

河合 啓介 (KAWAI KEISUKE)
九州大学病院・講師
研究者番号：80325521

(3)連携研究者
なし