

平成30年 8月28日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21670

研究課題名(和文)メタゲノム解析とメタボローム解析を用いた小児好酸球性消化管疾患の腸内細菌叢の解明

研究課題名(英文)Integrative analysis of metagenomics and metabolomics for eosinophilic gastrointestinal disorders in children

研究代表者

正田 哲雄 (Shoda, Tetsuo)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・生体防御系内科部・医師研究員

研究者番号：00724311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌叢は、免疫および上皮機能に影響を与える代謝産物を産生することにより、好酸球性消化管疾患(EGID)に対する感受性を増加させる可能性がある。本研究では、次世代シーケンシング解析により、小児EGIDに関連する腸内細菌叢および代謝物質プロファイルを解明することを目的とし、症例対照研究(EGID群5例と疾患対照群10例)を行った。種々の解析(主座標分析、クラスター分析、マイクロバイオームとメタボロームの統合分析など)を実施したが、EGID群と疾患対照群に明らかな差異を認めなかった。本研究の結果からは、小児EGIDに関連する腸内細菌叢および代謝物質プロファイルは見出されなかった。

研究成果の概要(英文)：Microbes may increase susceptibility to eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID) by producing bioactive metabolites that affect immune activity and epithelial function. To uncover disease-associated microbial and metabolomics profile in pediatric EGID by next-generation sequencing analysis, a case-control study (EGID vs control, n=5 vs 10) was conducted. Several analyses, including principal coordinate analysis, cluster analysis and integrated analysis of both microbiome and metabolome, did not show significant differences between EGID and control. In this case-control study, a disease-associated microbial and metabolomics profile in pediatric EGID was not found.

研究分野：小児科

キーワード：好酸球性消化管疾患 腸内細菌叢 メタボローム

1. 研究開始当初の背景

好酸球性消化管疾患 (EGID) は好酸球の消化管局所への異常な集積から好酸球性炎症が生じ、消化管組織が傷害され、機能不全を起こす疾患の総称である。新生児-乳児から小児、成人に至る幅広い患者層を抱える疾患群だが、その診断や管理が困難なことが多く、難病指定を受け、その対策が望まれている。臨床症状としては、主に、腹痛、嘔吐、下痢、血便などの消化器症状を呈することが多いが、生命にかかわる重大な合併症(ショック、腸閉塞、腸破裂、低タンパク血症など)も報告されており、そのような場合は緊急性を要する。

本疾患の詳細な病因・病態解明はなされていないが、炎症の引き金となる食物が同定された場合、その適切な除去により症状が劇的に改善することから、主に食物を抗原とした非即時型アレルギー疾患の一つと考えられている。これは、本来獲得すべき食物蛋白に対する免疫寛容が誘導できなかった、あるいは破綻した状態といえる。経口免疫寛容の成立や特定のリンパ球の選択的な分化誘導に深くかかわる因子として腸内細菌叢が知られている。そのため、本疾患における経口免疫寛容の不成立あるいは破綻に対し、腸内細菌叢が果たしている役割は大きいと考えられる。

また、本疾患の重要な鑑別疾患のひとつとして炎症性腸疾患 (IBD) があるが、消化管生検組織での網羅的な mRNA 発現解析では EGID では IBD と異なる遺伝子発現パターンが報告されている。そのため、EGID と IBD では異なる腸内細菌叢のパターンを呈する可能性が示唆されている。

以上から、「IBD とは異なる、EGID に特異的な腸内細菌叢の変化や機能的な異常、それに伴う代謝産物の変化が存在し、EGID の病態形成に深く関与している」と仮説を立てた。

2. 研究の目的

これまで EGID 患者の腸内細菌叢に関しての検討はない。本研究では、EGID に特異的な腸内細菌叢の変化や機能的な異常、それに伴う代謝産物の変化を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究のデザイン

EGID 群と疾患対照群 (IBD) のケースコントロール研究とした。当初は病理学的異常のないコントロール群も解析を予定していたが、解析費用の点から今回は実施を見送った。実施機関として、症例の集積、検体採取は国立成育医療研究センターにて実施した。検体の収集に関しては、倫理委員会の承認を受け実施した。臨床所見を有し、その精査のため内視鏡検査を受けるため入院した 4 - 20

歳の患者を対象とし、以下の基準に基づき症例を集積した。

(2) 選択基準

【EGID 患者】

EGID に矛盾しない臨床所見を有し、内視鏡生検組織の病理所見により EGID の確定診断をした。

【疾患対照者】

EGID 群と年齢を一致させた IBD 患者(炎症性腸疾患：潰瘍性大腸炎とクローン病)を疾患対照者とした。臨床情報と消化管の内視鏡生検組織の病理所見から IBD の診断を確定した。

【除外基準】

試験を行うのに支障となる合併疾患を有すると担当医が判断した患者、あるいは、担当医師が対象として不適当と判断した患者は除外した。

研究参加の同意を得た上で、患者背景として以下の項目を調査した(性別、生年月日、同意取得日、病歴、両親・兄弟の病歴、既往歴、合併症、疾患重症度、検査値、治療歴、使用薬剤、食事調査)。

(3) 細菌叢解析とメタボローム解析

入院での内視鏡前処置前に便検体のサンプリングを行った。採便容器で便を 1g(親指大)程度採取し、採取後直ぐに-80°Cで保管した。組織検体は内視鏡生検検体を採取後直ぐに-80°Cで保管した。

破砕法により DNA を抽出し、化合物抽出は液液分配法を用いて抽出した。腸内細菌叢解析は当初メタゲノム解析を予定していたが、解析方法を再検討し、16S rRNA 解析とメタゲノム機能予測解析を実施した。次世代シーケンサー(イルミナ社製 Miseq)による遺伝子配列解析を用い、細菌種の存在比率を定量化した。メタボローム解析はキャピラリー電気泳動-質量分析計(Agilent 社製 CE-QqQ)による解析にて、まず検出されたピークの泳動時間、質量電荷比、ピーク面積を取得し、基準物質の測定結果と照合することで各ピークが対応する代謝物質を推定した。

細菌叢とメタボロームの統合解析としては、16sRNA 機能予測解析より得られた KEGG Orthology の機能組成比を用いて群間の比較統計解析を行った。そして、メタボロームデータの KEGG pathway の情報と 16sRNA 機能予測解析の機能情報に基づいて両者の比較統計解析結果を統合した。

4. 研究成果

(1) 対象患者

研究実施期間内に同定した EGID の対象者 5 名と共に、疾患対照者として小児 IBD (潰瘍性大腸炎：5 名とクローン病：5 名) の 10 名から検体を採取した。患者の臨床的背景

を以下に示す。EGID 群の年齢は平均 9 歳 10 か月、男女比は 3 : 2、疾患対照群 (IBD) の年齢は平均 10 歳 0 か月、男女比は 6 : 4 であり群間における明らかな差異はなかった。また、他の調査項目において特筆すべき点はなかった。

(2) 腸内細菌叢解析

便・組織ともにサンプルからの DNA 抽出を行った後、次世代シーケンサーによる遺伝子配列解析を用い細菌種の存在比率を定量化した。16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を PCR にて増幅し、シーケンスを行った。得られたリード数は 1 サンプル当たり平均で 1,399,944 read であり、今回のサンプル全てにおいて十分量の配列を得ることができた。

門レベルから OTU (Operational Taxonomic Unit) レベルの菌種組成比ならびに α 多様性指数の群間比較を行ったが、多重補正の結果から EGID 群と疾患対照群 (IBD) で明らかな差異のある因子は特定できなかった。また、腸内細菌叢のプロファイルを可視化するために実施した主座標分析においても EGID 群と疾患対照群 (IBD) を分離することはできなかった。

(3) メタボローム解析

キャピラリー電気泳動-質量分析計による解析にて、合計で 322 種類の代謝物質が検出され、それぞれのサンプル間の相対存在比に基づいて z-score を求めた。メタボローム解析については、候補化合物が絞り込まれた 322 ピークにおいて群間比較を行い EGID に特有の代謝物を探索したが、多重補正の結果から EGID 群と疾患対照群 (IBD) で明らかな差異のある物質は特定できなかった。主成分解析ならびに階層的クラスタリング解析においても、代謝物質プロファイルにより EGID 群と疾患対照群 (IBD) を分離することはできなかった。

(4) 統合解析

細菌叢とメタボロームの統合解析としては、メタボロームデータの KEGG pathway の情報と 16sRNA 機能予測解析の機能情報に基づいて両者の比較統計解析結果を統合した。その結果、関連性を示す因子群が複数抽出されたが、現時点ではそれらの直接的な因果関係は不明であった。将来的に、サンプル数を増やすことでこれらの有意差が明らかとなる可能性は残されているが、本研究で実現可能な範囲においては、小児 EGID に関連する疾患特異的な腸内細菌叢および代謝物質プロファイルは見出すことはできなかった。

これらの結果から、EGID 群ならびに疾患対照群 (IBD) における腸内細菌叢・代謝物質プロファイルは、今回の研究期間内に検討

できた症例数で明らかになるほどの明確な差異がないということが示唆された。

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 5 件)

1: Ishihara S, Shoda T, Ishimura N, Ohta S, Ono J, Azuma Y, Okimoto E, Izuhara K, Nomura I, Matsumoto K, Kinoshita Y. Serum Biomarkers for the Diagnosis of Eosinophilic Esophagitis and Eosinophilic Gastroenteritis. Intern Med. 2017 1; 56(21):2819-2825.

2: Mitsui M, Shoda T, Natsume O, Nomura I, Narita M, Fukuda A, Sakamoto S, Kasahara M, Ohya Y. Factors Associated with Development of Food Allergy in Young Children after Liver Transplantation: A Retrospective Analysis of 10 Years' Experience. J Allergy Clin Immunol Pract. 2017; 5(6):1698-1706.

3: Sato M, Shoda T, Shimizu H, Orihara K, Futamura K, Matsuda A, Yamada Y, Irie R, Yoshioka T, Shimizu T, Ohya Y, Nomura I, Matsumoto K, Arai K. Gene Expression Patterns in Distinct Endoscopic Findings for Eosinophilic Gastritis in Children. J Allergy Clin Immunol Pract. 2017; 5(6): 1639-1649.

4: Shoda T, Futamura M, Yang L, Narita M, Saito H, Ohya Y. Yogurt consumption in infancy is inversely associated with atopic dermatitis and food sensitization at 5 years of age: A hospital-based birth cohort study. J Dermatol Sci. 2017; 86(2):90-96.

5: Shoda T, Matsuda A, Nomura I, Okada N, Orihara K, Mikami H, Ishimura N, Ishihara S, Matsumoto K, Kinoshita Y. Eosinophilic esophagitis versus proton pump inhibitor-responsive esophageal eosinophilia: Transcriptome analysis. J Allergy Clin Immunol. 2017; 139 (6): 2010-2013.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

〔その他〕
なし

6．研究組織

(1) 研究代表者

正田 哲雄 (Shoda Tetsuo)
国立研究開発法人国立成育医療研究センター・生体防御系内科部・医師研究員
研究者番号：00724311