

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07986

研究課題名(和文) 寛解後炎症性腸疾患患者に残存する消化器症状発現メカニズムの解明

研究課題名(英文) Alterations of gut microbiome and mucosal permeability in inactive IBD patients with IBS-like symptom

研究代表者

富田 寿彦 (TOMITA, TOSHIHIKO)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60388824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的に寛解期状態にある炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎やクローン病)患者に下痢や腹痛などのIBS様症状を合併することが報告されている。その原因として粘膜の微小炎症や腸内細菌叢の異常、腸管透過性の亢進が病態に関連している可能性が推測される。本研究では、寛解期クローン病でIBS様症状を呈する患者の腸管微小炎症、腸内細菌叢、腸管透過性の変化とIBS様症状の関連性を検討した。結果として、腸管微小炎症と不安が、IBS様症状発症と密接に関連していることが明らかとなった。また腸内細菌であるFusicatenibacter 株の減少が、IBS様症状を有する患者の腸管微小炎症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究研究結果から、今後、実地臨床でプロバイオティクス投与による腸内細菌叢プロファイルの改善が、IBS様症状を有する寛解期クローン病患者の治療ターゲットになる可能性があることを示唆している。この問題を明らかにするために、現在、臨床試験を開始している。

研究成果の概要(英文)：Although irritable bowel syndrome (IBS)-like symptoms are frequently occurred in patients with quiescent Crohn's disease (CD), its pathophysiology is remained unclear. To approach the responsible factors for IBS-like symptoms in quiescent CD patients, we performed comprehensive analyses of clinical features and intestinal environment in those patients. We have investigated clinical data sets and intestinal environmental factors in quiescent CD patients with IBS-like symptom. Among many factors examined, we found that intestinal minimal inflammation and anxiety are closely associated with the development of IBS-like symptom in quiescent CD patients. In addition, reduction of Fusicatenibacter strains may be involved in the intestinal minimal inflammation in quiescent CD patients with IBS-like symptom. This suggests that the corrective effect on gut microbiota profile by probiotics may be possible target for the treatment of quiescent CD patients with IBS-like symptom.

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 過敏性腸症候群 微小炎症持続 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis: UC) やクローン病 (Crohn's disease: CD) などの炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease: IBD) は、腸管に免疫学的あるいは器質的異常を伴い、慢性的に下痢、腹痛、血便などを伴う疾患である。近年、IBD における内科的治療は抗 TNF 製剤や免疫調節薬などの開発により、飛躍的に進歩した。現在の内科的治療の目標は炎症を抑えることは当然の事ながら、完全な「消化管の粘膜治癒」を目指す段階に入ってきている。一方、過敏性腸症候群 (Irritable bowel syndrome: IBS) は器質的異常がないにもかかわらず、下痢、便秘などの消化器症状を伴う疾患群であり、IBD とは全く異なる病態を形成していると考えられてきた。しかし最近、腸管炎症が消失して臨床的に寛解期状態にある IBD 患者に下痢や腹痛などの IBS 様症状を合併することが報告され始めている。一般的なアンケート調査で、健康成人における IBS の頻度は約 10-15% と報告されているが、寛解期 IBD 患者に IBS 様症状が残存する患者の頻度は、欧米のデータでは CD で 40-50%、UC で 30-40% 程度と、健常コントロールに比して有意に高いと報告されている。我々も 2016 年に Rome III 基準を用いた検討で、寛解期 IBD 患者における IBS 症状の合併頻度は、CD で 27.1%、UC で 15.7% と対照群の 5.3% に比して、その頻度は IBD 患者で 3~6 倍高いことを報告している。また興味深いことにサルモネラなどの細菌性腸炎に罹患した患者に、感染治癒後に IBS 様症状を示す患者がいることが報告されている。このように、寛解期の IBD 患者と感染性腸炎治癒後の患者に共通して IBS 症状が生じるという事実から、我々は、一見炎症から治癒したと見える大腸組織に IBS 症状発現に繋がる分子メカニズムの変化が生じているのではないかと考えている。実際、炎症で傷害された消化管組織では粘膜修復が完了した後も微弱な炎症細胞浸潤が残存し続けるとの報告もあり、また、我々の先行コホート研究でも、寛解に至るまでの罹病期間が長かった IBD 患者に IBS 様症状を有する頻度が高かったことから、治癒した大腸粘膜に慢性に残存する微小炎症が大腸炎治癒後に生じる IBS の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられる。さらには、その炎症に伴って生じる粘膜免疫機構の変化、腸内細菌叢の変化、加えて粘膜透過性の相違も IBS 症状を発現する上で重要な要因になっている可能性が考えられる。しかしながら現在までに上記に関する検討は行われておらず、詳細は不明である。最近の報告では、腸内細菌叢の変化や短鎖脂肪酸 (SCFA)、持続的な腸管粘膜の微小炎症の持続、腸管粘膜バリアの機能不全が IBD と IBS の両方の病態に共通して関与している可能性が高いという報告も散見される。

2. 研究の目的

本研究では、寛解期クローン病患者における IBS 様症状発症のメカニズムを明らかにするために、寛解期クローン病患者で IBS 様症状を呈する患者における腸内細菌叢や糞便中の短鎖脂肪酸 (SCFA)、便中カルプロテクチン、腸管粘膜透過性の変化と IBS 様症状の関連性を検討した。

3. 研究の方法

対象と方法

2019 年 9 月から 2020 年 7 月までに当院外来受診した寛解期 IBD 患者は 27 名を対象とした。寛解期 IBD の定義は CDAI index 150、CRP 0.3 とした。IBS の診断は自己記入式でローマの日本語版問診票を用い、健康関連 QOL スコアは疾患特異性 QOL として IBDQ、一般的な QOL としては SF-8 を使用した。IBDQ は IBD 患者の腹部症状・全身症状・情緒社会生活などさまざまな方面を総合的に反映し、日常生活を指標化するものである。精神症状に関しては、抑うつと不安ス

コアを評価する hospital anxiety scale (HADS)を使用し、うつと不安尺度、総スコアを評価した。また日本版 IBS 重症度の質問票を使用して、IBS 様症状の重症度を評価した。書面による十分なインフォームドコンセントの後、同意を得られた患者を本研究に登録した。本研究は兵庫医科大学の倫理審査委員会に申請し承認されている（承認番号第 3158 号）。University Hospital Medical Information Network (UMIN)登録番号は UMIN000041577 である。

腸管粘膜透過性の測定

腸管粘膜透過性の評価は、overnight の絶食後、マンニトール (1.5 g)、スクラロース (0.5 g)、ラクツロース (4 g) およびスクロース (15 g) を含む混合物を経口摂取し、最初の 0 ~ 5 時間および 5 ~ 24 時間尿を採取した。それぞれの尿検体における糖濃度をガスクロマトグラフィー法で測定することによって小腸および大腸における透過性を評価した。

糞便中のカルプロテクチン濃度の測定

新鮮な便サンプルを各患者から採取し、解析まで-20℃で保存した。糞便中のカルプロテクチンのレベルは、蛍光酵素免疫測定法 (CALPROTECTIN MOCHIDA、持田、東京、日本) で定量化した。

腸内細菌叢の分析

糞便抽出した DNA を用いて 16SrDNA の V3-V4 領域を増幅し、次世代シーケンサーでゲノム解析を行うことで腸内細菌叢のプロファイル分析を行った。

便中 SCFA の分析

糞便 SCFA は、既報のプロトコルを用い、ガスクロマトグラフィー質量分析法で測定した (Fukui H et al. J Clin Med 2020; 9: 2403) 。

4 . 研究成果

IBS 様症状の有無と寛解期 CD 患者の特徴

27 人の寛解期クローン病 患者を本研究の対象とした。27 例中 12 例の患者 (44.4%) が IBS 様症状を呈していた。年齢、BMI、罹病期間、内服薬、手術歴、CRP などの臨床的指標は IBS 様症状の有無にかかわらず、両群間で差は認めなかったが、IBS 様症状を伴う寛解期 CD 患者の方が、罹病期間が長い傾向があった。Disease activity index である CDAI は IBS 様症状のある患者 (104.9 ± 32.3) では、症状のない患者 (60.5 ± 29.8) と比して有意に高かった。また、IBS の重症度は、IBS 様症状のある CD 患者 (140.4 ± 60.8) では、ない患者 (79.1 ± 45.9) と比較して有意に高かった。

寛解期 CD 患者における疾患特異的および健康関連 QOL

疾患特異的 QOL である IBDQ スコアは、IBS 様症状のある患者 (167.8 ± 25.8) では、ない患者 (188.2 ± 15.1) よりも有意に低かった。また一般的な QOL 指標である SF-8 の身体的、精神的サマリースコアは、IBS 様症状を有する患者 (身体的、 53.8 ± 3.8 ; 精神的、 45.2 ± 10.6)と、IBS 様症状のない患者 (身体的、 52.8 ± 3.5 ; 精神、 47.8 ± 4.9) で、統計学的差は認めなかったが、国民の基準値より低かった。

IBS 様症状の有無と寛解期休止状態の CD 患者のうつ病と不安症の状態

HADS を用いた抑うつスコアは、IBS 様症状のある患者 (6.4 ± 3.3) と IBS 様症状のない (6.9 ± 2.9) の間で統計学的差はなかったが、不安尺度は IBS 様症状のある患者 (6.8 ± 3.4) では、症状のない患者 (4.5 ± 3.0) に比して有意に低かった。

糞便中の腸内細菌叢、短鎖脂肪酸 (SCFA)、便中カルプロテクチン、腸管粘膜透過性
腸内細菌叢の主座標分析では IBS 様症状の有無にかかわらず、寛解期 CD 患者では、腸内細菌叢構造に有意な差はなかった。また門レベルの解析では、2 群間に差は認めなかった。次に属レベルで分析では、Fusicatenibacter の相対的豊富度は、IBS 様症状のある CD 患者で有意に減少し、Ruminococcus の豊富度も IBS 症状のある患者群で減少している傾向があった ($p=0.065$)。次に糞便中の SCFA のプロファイルを検討したが、IBS 様症状のある場合とない患者では有意差は認めなかった。次に腸管微小炎症マーカーである糞便中のカルプロテクチン濃度を測定したが、糞便中のカルプロテクチンレベルは、IBS 様症状のある CD 患者 (384.8 ± 310.6 mg/kg) では、IBS 症状のない患者 (161.0 ± 251.0 mg/kg) に比して有意に高かった。小腸の粘膜透過性のレベル (ラクツロース/マンニトール比) は、IBS 症状のある CD 患者 (0.011 ± 0.008) と IBS 様症状のない患者 (0.012 ± 0.007) で有意な差は認めなかった。また結腸の粘膜透過性 (スクラロース排泄) に関しても、IBS 症状を有する CD 患者 ($0.594 \pm 0.463\%$) と IBS 様症状のない患者 ($0.536 \pm 0.256\%$) で、統計学的差は認めなかった。

糞便中のカルプロテクチン、Fusicatenibacter の豊富さ、不安スコアの関連

糞便中のカルプロテクチンレベル、Fusicatenibacter の豊富さ、または不安スコアに関して ROC 解析を行い、寛解期 CD 患者における IBS 様症状の予測をおこなった。糞便中のカルプロテクチンレベルのカットは 125 mg/kg であり、感度と特異度は 73.3%、91.7% であった。また糞便中 Fusicatenibacter 豊富さのカットオフ値は 0.05% であり、感度と特異度はそれぞれ 40.0% と 100% であった。また不安スコアのカットオフ値は 3.5 であり、感度と特異度はそれぞれ 46.7% と 91.7% であった。これらの 3 群間の関連を分析すると、糞便中のカルプロテクチンレベルが高い寛解期 CD では、糞便中の Fusicatenibacter の量が少なく、不安スコアが高くなる傾向を認めた。さらに、不安スコアが高い寛解期 CD では、糞便中の Fusicatenibacter の量が少ない傾向があった。

結果

本研究結果より、腸管微小炎症と不安が、寛解期 CD 患者における IBS 様症状の発症と密接に関連していることが明らかとなった。腸管微小炎症と不安との相互作用のメカニズムを明らかにすることはできなかったが、腸内細菌である Fusicatenibacter 株の減少が、IBS 様症状を有する寛解期 CD 患者の腸管微小炎症に関与している可能性があることが示された。今後、プロバイオティクスによる腸内細菌叢プロファイルの改善が、IBS 様症状を有する寛解期 CD 患者の治療のターゲットとなる可能性がある。現在、これに関連して、我々はこの問題を明らかにするための臨床試験を開始している。この研究業績に関しては現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Xin Xu , Hirokazu Fukui , Ying Ran , Xuan Wang , Yoshihito Inoue , Nobuhiko Ebisudani , Heihachiro Nishimura, Toshihiko Tomita , Tadayuki Oshima , Jiro Watari , Hiroshi Kiyama , Hiroto Miwa	4. 巻 6
2. 論文標題 The Link Between Type III Reg and STAT3-Associated Cytokines in Inflamed Colonic Tissues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mediators Inflamm	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/7859460.	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 Xin Xu , Hirokazu Fukui , Ying Ran , Toshihiko Tomita , Tadayuki Oshima , Jiro Watari , Hiroto Miwa	4. 巻 9
2. 論文標題 Alteration of GLP-1/GPR43 Expression and Gastrointestinal Motility in Dysbiotic Mice Treated With Vancomycin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-40978-9	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 Kodani M, Fukui H, Tomita T, Oshima T, Watari J, Miwa H.	4. 巻 17
2. 論文標題 Association between gastrointestinal motility and macrophage/mast cell distribution in mice during the healing stage after DSS induced colitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Med Rep.	6. 最初と最後の頁 8167-8172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2018.8926.	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 -

〔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	福井 広一 (Fukui Hirokazu) (60378742)	兵庫医科大学・医学部・准教授 (34519)	
研究分担者	三輪 洋人 (Miwa Hiroto) (80190833)	兵庫医科大学・医学部・教授 (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