

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09074

研究課題名(和文) 潰瘍性大腸炎術後回腸囊炎の発症機序解明：腸内細菌叢および脂質メディエーターの解析

研究課題名(英文) Pathogenesis of pouchitis after ileal pouch anal anastomosis for ulcerative colitis: Analysis of intestinal microbiota and lipid mediators.

研究代表者

亀山 仁史 (Kameyama, Hitoshi)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：40626420

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)：潰瘍性大腸炎術後の回腸囊炎発症に関する細菌群の解析を行い、脂質メディエーターの観点から回腸囊炎発症のメカニズムを検証し、適切な治療戦略の構築を目指すことを目的とした。本研究では、回腸囊炎症例では、80%の症例で抗pSphK1抗体による免疫組織化学染色が陽性となっており、炎症の進展におけるスフィンゴシン1リン酸(S1P)の関与が示唆された。また、S1P値の高値症例では回腸囊炎の炎症の程度が高度になる可能性が認められた。脂質メディエーターであるS1Pが、潰瘍性大腸炎術後の回腸囊炎増悪に関与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎術後の回腸囊炎の炎症増悪と脂質メディエーターであるS1Pの関連を明らかにした初めての報告である。S1P値の高値症例では回腸囊炎の炎症の程度が高度になっている可能性があることから、S1Pの測定は、回腸囊炎の活動性の評価、あるいは潰瘍性大腸炎そのものの炎症評価にも有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to analyze the bacterial population involved in the development of pouchitis after ileal pouch anal anastomosis for ulcerative colitis and to examine the mechanism of pouchitis in terms of lipid mediators. Furthermore, we aimed to establish appropriate therapeutic strategies. In this study, immunohistochemical staining with anti-phospho-sphingosine kinase 1 antibody was positive in 80% of pouchitis cases after ulcerative colitis surgery, suggesting the involvement of sphingosine 1-phosphate (S1P) in the development of inflammation. It was also observed that the degree of inflammation of pouchitis may be more severe in cases with high S1P levels. S1P, a lipid mediator, may be involved in the progression of pouchitis after ulcerative colitis surgery.

研究分野：消化器外科

キーワード：潰瘍性大腸炎 回腸囊炎 スフィンゴシン-1-リン酸

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎に対する標準手術術式は大腸全摘、回腸囊肛門(管)吻合である。本術式により永久人工肛門を避けることが可能となり、術後の Quality of life (QOL) が保たれるようになった。しかし、回腸囊に回腸囊炎が生じると QOL が著しく低下する。病因として、潰瘍性大腸炎と同一の機序、回腸囊内の dysbiosis、免疫機能の異常、粘膜の虚血、短鎖脂肪酸の減少、遺伝的感受性などが報告されているが、現状では単一の病因では全てを説明することができず、複合的な病態である考えられている。同じ術式が施行される家族性大腸腺腫症の術後では回腸囊炎の発生は少ないとされていることから、潰瘍性大腸炎そのものの発生機序との関連が示唆されている。回腸囊炎は抗菌薬治療が有効なことから、何らかの細菌感染が誘因となっていることが疑われているが、特定の細菌感染でないことも指摘されている。腸内細菌叢バランスの破綻 (dysbiosis) に起因した炎症・免疫異常の関与が想定される。

これまでに我々は、回腸囊炎に関する細菌学的研究、プロバイオティクス投与の経験、消化器外科領域におけるヨーグルトの抗菌作用等の研究を行ってきた。また、炎症性脂質メディエーターであるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) が、潰瘍性大腸炎関連大腸癌の発生に関連しているとの報告を行っていた経験から、回腸囊炎の発症、進展にも脂質メディエーターが関与しているのではないかと考えた。

我々は、「回腸囊炎は腸内細菌叢バランスの崩壊 (dysbiosis) がその一因であり、炎症の発生・進展過程で脂質メディエーターが関与している」との着想に至った。将来的には、回腸囊炎の機序を解明することは潰瘍性大腸炎そのものの解明にもつながると考えている。

また、近年、潰瘍性大腸炎関連大腸癌における炎症関連脂質メディエーターの関与が注目されている。我々はこれまでに脂質メディエーター (S1P) シグナルが潰瘍性大腸炎関連大腸癌の発生に関与していることを明らかにしてきた (J Surg Res 2018)。回腸囊炎は持続的な非特異的炎症をきたす病態であり、脂質メディエーターが回腸囊炎の発症あるいは病態の進展に関与している可能性が高いと考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「回腸囊炎発症に関与する細菌群の解析を行い、脂質メディエーターの観点から回腸囊炎発症のメカニズムを検証し、適切な治療戦略の構築を目指すこと」である。

3. 研究の方法

2020年7月～2021年2月に潰瘍性大腸炎術後、回腸囊から内視鏡的あるいは手術により組織生検が行われた6名を対象とした。上記対象患者において、臨床データ(採血結果、回腸囊炎重症度、消化管内視鏡検査等)をカルテから後方視的に解析した。回腸囊炎の診断は、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業による「潰瘍性大腸炎・クローン病診断基準・治療指針」に準じた。

回腸囊の生検組織を凍結保存し、質量分析法 (LC-ESIMS/MS、4000 QTRAP; Applied Biosystems) によって組織中の S1P を定量した。また、回腸囊の生検検体のパラフィン包埋組織を用いて、S1P 産生酵素であるスフィンゴシンキナーゼ 1 型 (SphK1) のリン酸化を評価するため、抗 pSphK1 抗体 (Proteintech SphK1 [Ser-225] phosphor-specific polyclonal antibody; ECM Biosciences LLC) を用いた免疫組織化学染色も合わせて施行した。染色の評価 (陽性/陰性) は細胞質の染色強度で判断した。回腸囊炎の重症度と S1P 値、抗 pSphK1 抗体免疫組織化学染色の関連について検討した。

4. 研究成果

1) 対象6名の患者背景として、男性は5名、女性は1名であり、年齢の中央値は45歳(範囲: 33 - 70歳)であった。回腸囊の内視鏡所見は、1例が正常、2例は軽度、3例は中等度であった。検体検査時の回腸囊肛門吻合術後経過期間(中央値)は14年2か月(範囲: 8年1か月 - 25年8か月)であった。

2) 症例呈示

内視鏡的に回腸囊炎が中等度で、C-reactive protein が 15.7 mg/dL と高値であった症例を1例呈示する。症例は35歳、男性。潰瘍性大腸炎に対して16年前に大腸全摘、回腸囊肛門吻合術が施行された。1年前に、骨盤内膿瘍形成のため小腸人工肛門が造設されている。内視鏡による回腸囊検査では血管透過像は消失、易出血性、膿性粘液を認め、回腸囊診断基準では中等度の所見であった。骨盤部造影 CT 検査では回腸囊壁の浮腫が認められた。組織学的には高度の慢性炎症浸潤と好中球浸潤が認められた。

3) S1P 測定

対象 6 例の S1P 測定値の結果は、中央値は 0.2 pmol/mg (範囲: 0.1 - 0.8 pmol/mg) であった。前述した呈示症例の S1P 値が高値を示していた。しかし、その他の症例は、同レベルの数値であった。

4) 免疫組織化学染色

抗 pSphK1 抗体による免疫組織化学染色を行った。前述した呈示症例では陽性となった。内視鏡的に回腸嚢炎の所見を認めた 5 例のうち 4 例で抗 pSphK1 抗体が陽性であった。既報に準じて免疫組織化学染色のスコア化を試みたが重症度との関連は明らかにできなかった。

本研究では、内視鏡で何らかの所見を認めた症例のうち、80% (4 例/5 例) の症例で抗 pSphK1 抗体による免疫組織化学染色が陽性となっており、回腸嚢炎においても S1P 産生が関与していることが示唆された。

これまでに回腸嚢炎と S1P の関連については報告がない。本研究では、採血データで炎症の高かった回腸嚢炎症例で S1P が高値を示していた。S1P シグナルが回腸嚢炎の重症度に関与している可能性が示唆され、興味深い所見である。

S1P の産生酵素である SphK1 は主に細胞質に存在し、そのリン酸化は S1P の産生能を反映していると考えられている。本研究では、内視鏡で何らかの所見を認めた症例のうち、80% (4 例/5 例) の症例で抗 pSphK1 抗体による免疫組織化学染色が陽性となっており、回腸嚢炎においても S1P 産生が関与していることが示唆された。しかし、抗 pSphK1 抗体の染色性と回腸嚢炎の重症度との関連は明らかにできなかった。症例数を重ねた今後の検討が必要と考える。

本研究の限界として、単施設、少数例の後ろ向き研究であること、重症例が含まれなかったこと、採血上の炎症が高度であった中等度症例が 1 例のみであり、さらにこの症例は人工肛門造設症例であったことが挙げられる。また、現状では S1P の測定可能な施設が限られており、複数回の測定が困難なため、病態の変化や治療の効果を経時的に解析できていないこと、免疫組織化学染色との関連が示されなかったこと等が挙げられる。しかし、原因不明な回腸嚢炎の炎症増悪機序の 1 つの因子として S1P シグナルが関与している可能性が示唆されたことには意義があると考えられる。脂質メディエーターである S1P が、潰瘍性大腸炎術後回腸嚢炎の炎症増悪に関与している可能性が示唆された。

本研究期間中では、回腸嚢炎症例における細菌叢 (16S rRNA 解析) との関連についての研究まで達成できなかったが、今後の課題としたい。一方、本研究により解明できた事項は以下の通りである。

潰瘍性大腸炎術後の回腸嚢炎の症例では、80% の症例で抗 pSphK1 抗体による免疫組織化学染色が陽性となっており、炎症の進展における S1P の関与が示唆された。

さらに、S1P 値の高値症例では回腸嚢炎の炎症の程度が高度になる可能性がある。

以上より、脂質メディエーターである S1P が、潰瘍性大腸炎術後回腸嚢炎の炎症増悪に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 亀山仁史、永橋昌幸、田島陽介、小柳英人、廣瀬雄己、中野麻恵、中野雅人、島田能史、竹内志穂、奥田修二郎、若井俊文	4. 巻 136
2. 論文標題 潰瘍性大腸炎術後回腸嚢炎とスフィンゴシン-1-リン酸の関連	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 新潟医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 219-224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島田 能史、中野 麻恵、松本 瑛生、中野 雅人、市川 寛、羽入 隆晃、滝沢 一泰、坂田 純、小林 隆、若井 俊文
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌の遺伝子学的特徴
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永橋 昌幸、土田 純子、油座 築、諸 和樹、根本 万里子、廣瀬 雄己、利川 千絵、五十嵐 麻由子、三浦 宏平、田島 陽介、市川 寛、羽入 隆晃、滝沢 一泰、中島 真人、島田 能史、小林 隆、坂田 純、石川 卓、亀山 仁史、若井 俊文
2. 発表標題 慢性炎症による癌の増殖・転移を促進する脂質メディエーター分子機構
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

〔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	奥田 修二郎 (Okuda Shujiro) (00512310)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

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	廣瀬 雄己 (Hirose Yuki) (10737365)	新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (13101)	
研究分担者	島田 能史 (Shimada Yoshifumi) (20706460)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究分担者	中野 麻恵 (Nakano Mae) (20790281)	新潟大学・医歯学総合病院・特任助教 (13101)	
研究分担者	竹内 志穂 (Takeuchi Shiho) (70422277)	新潟大学・医歯学総合研究科・特任准教授 (13101)	
研究分担者	中野 雅人 (Nakano Masato) (70744788)	新潟大学・医歯学総合病院・助教 (13101)	
研究分担者	小柳 英人 (Oyanagi Hidehito) (70831725)	新潟大学・医歯学総合病院・専任助教 (13101)	
研究分担者	永橋 昌幸 (Nagahashi Masayuki) (30743918)	新潟大学・医歯学総合病院・研究准教授 (13101)	
研究分担者	田島 陽介 (Tajima Yosuke) (30757505)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	

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
---------	---------