

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22929

研究課題名(和文)小腸潰瘍形成におけるプロスタグランジンと腸内細菌叢の役割

研究課題名(英文)The role of prostaglandins and microbiota in small intestinal ulcer formation

研究代表者

松野 雄一 (Matsuno, Yuichi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60876522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：非特異性小腸潰瘍症やNSAIDs起因性小腸潰瘍はともにプロスタグランジン(PG)が発症に関与していると考えられるが、その発症メカニズムは明らかとなっていない。我々はNSAIDs起因性小腸潰瘍形成における腸内細菌叢の関与とプロバイオティクスの影響を明らかとするため、RCTを行い、プロバイオティクス内服群では小腸潰瘍の発生率はプラセボ群より有意に少ないこと明らかとした。また小腸の細菌叢の解析にあたり、消化管各部位における細菌叢の相違について検討を行った。今後、NSAIDs起因性小腸潰瘍における細菌叢の変化、非特異性多発性小腸潰瘍症でのPGやそのレセプター、トランスポーターの発現を検討していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロバイオティクスによってNSAIDs起因性小腸潰瘍の発生率を有意に低くすることが示唆されたことにより、今後NSAIDs起因性小腸潰瘍の治療としてのプロバイオティクスの可能性が示された。また今後NSAIDs起因性小腸潰瘍の腸内細菌叢の検討により、NSAIDs起因性小腸潰瘍のみならず、CEASを含めたプロスタグランジン関連腸症の発症メカニズムの解明につながる可能性がある。また今回行った消化管各部位での細菌叢の相違の検討結果から、空腸と十二指腸では類似したクラスターが形成されており、空腸からの検体採取が困難であれば十二指腸から採取した検体も解析対象となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although prostaglandins (PGs) are involved in the pathogenesis of both Chronic enteropathy associated with SLC02A1 gene (CEAS) and NSAIDs-induced small intestinal ulcer, the pathogenesis of these disease is unclear. We conducted an RCT to clarify the involvement of intestinal microbiota in NSAIDs-induced small intestinal ulcer, and found that the incidence of small intestinal ulcer in the probiotic group was significantly lower than that in the placebo group. Analyzing the microbiota of the small intestine, we examined the differences in the microbiota in each part of the gastrointestinal tract. We are preparing to examine the changes in microbiota in NSAIDs-induced small intestinal ulcers and the expression of PG and its receptors and transporters in CEAS.

研究分野：消化器内科学

キーワード：小腸潰瘍 プロスタグランジン 腸内細菌叢 非特異性多発性小腸潰瘍症 CEAS NSAIDs

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

非特異性多発性小腸潰瘍症は、小腸に潰瘍が多発する疾患であり、持続的な消化管出血に伴う高度の貧血と低蛋白血症を特徴とする。治療法は確立されておらず、内科治療が無効な場合や消化管狭窄を来した場合には手術が必要となる難治性の疾患である。当科ではこれまでに内視鏡所見や X 線所見などの臨床所見を詳細に検討することにより世界に先駆けて本疾患の診断基準を示し、常染色体劣性遺伝を示すメンデル遺伝性疾患である可能性を報告してきた。そして全エクソームシーケンスを用いた解析から本疾患がプロスタグランジン (PG) 輸送体をコードする *SLCO2A1* 遺伝子の変異が原因であることを明らかとし、Chronic enteropathy associated with *SLCO2A1* gene (CEAS) という疾患概念を確立した。CEAS では小腸組織における PG の利用障害により粘膜障害が生じると考えられるが、発症にはその他の修飾因子の関与も考えられており、その発症メカニズムは明らかとなっていない。

また、近年増加傾向である非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) 起因性小腸潰瘍は、シクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害による PG の欠乏が病因と考えられており、これらの PG 代謝に関連した疾患群に対し、PG 関連腸症という新たな疾患概念も提唱されている。

当科では NSAIDs 起因性小腸粘膜傷害について選択的 COX2 阻害薬は小腸粘膜傷害を完全には予防できないこと、プロトンポンプ阻害剤の併用により小腸粘膜傷害が増加する可能性について報告しているが、その機序として腸内細菌叢の関与を示唆する報告もある。CEAS を含めた PG 関連腸症の発症機序の解明や PG 関連腸症における細菌叢の変化を検討し、誘因となる細菌叢の同定は新規治療薬の開発につながると思われる。

### 2. 研究の目的

本研究では CEAS の小腸粘膜における PG 分布や小腸潰瘍発生の誘因となる要因、腸内細菌叢の関与を明らかにすること、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) 起因性小腸潰瘍形成における腸内細菌叢の関与とプロバイオティクスの影響を明らかにすることを目的としている。

本研究では CEAS を含む PG 関連腸症と対照者の小腸組織における PG および PG トランスポーター、PG レセプターの発現を免疫組織化学的手法により検討することで PG の分布、効果発現について明らかにするとともに小腸粘膜の細菌叢や遺伝子発現の網羅解析、性ホルモンの評価を行う。また、NSAIDs とプロトンポンプ阻害薬 (PPI) 内服による腸内細菌叢の変化を検討し、PG 関連腸症の誘因となる細菌叢を同定する。また、小腸における細菌叢の検討にあたり、消化管の各部位における細菌叢の違いを明らかにする。

### 3. 研究の方法

NSAIDs 起因性小腸潰瘍形成における腸内細菌叢の関与とプロバイオティクスの影響を明らかにするため、60 人の健常者を対象とし、セレコキシブ (200mg 1日2回) およびラベプラゾール (20mg 1日1回) に加え、プラセボ (プラセボ群、n=30) または *Lactobacillus salivarius* WB21 ( $2.8 \times 10^9$  CFU 1日2回) (WB21 群、n=30) の投与を行う 2 群に二重盲検無作為割付を行った。それぞれの薬剤を 2 週間投与し、投薬前後における、カプセル内視鏡所見 (びらん、潰瘍の発生率および病変数)、消化器症状、血液検査を 2 群間で比較した。また、それぞれの群で前後での便検体を収集し、後述の方法で腸内細菌叢の解析を行った。

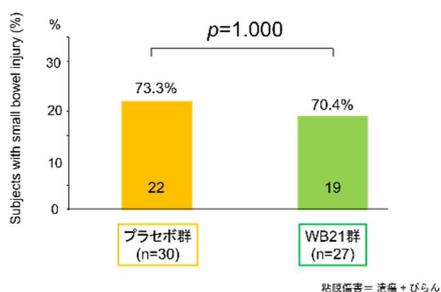
小腸の細菌叢の解析にあたり、胃、十二指腸、空腸、回腸、終末回腸、直腸の各部位および便から採取した臨床検体を用いて消化管における各部位での細菌叢の違いについて検討した。29 症例、140 検体を対象とし、各部位からの検体はダブルバルーン小腸内視鏡を用いて深部小腸を含めた各部位のブラシによる粘膜擦過により収集した。収集した検体から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の V4 領域に対して、515F/806R primer を使用して PCR を行った。PCR アンプリコンは Illumina MiSeq<sup>®</sup> を用いてシーケンスを行った。シーケンスで得られたリードから、クオリティチェックとキメラ配列の除去を行ったのちに、operational taxonomic unit を作成した。解析は QIIME ソフトウェアで行い、機能予測解析を Picrust software で行った。

CEAS を含む PG 関連腸症と対照者の消化管粘膜組織における PGE<sub>2</sub> の分布の比較として PGE<sub>2</sub> や PG トランスポーター、EP4 などの PGE<sub>2</sub> のレセプターの免疫組織化学染色を行い、組織内でそれぞれの発現、分布を検討した。さらに CEAS を含む PG 関連腸症と対照者の消化管粘膜組織における炎症関連遺伝子発現の比較として既採取の CEAS 患者と対照者の消化管組織検体を用いて、網羅的なデジタルカウント遺伝子発現解析 (nCounter) を行う (nCounter は標的遺伝子に特異的な捕捉用とレポート用のプローブとハイブリダイゼーション後、後者のプローブに標識されたバー・タグをカウントする。ホルマリン固定パラフィン包埋組織から高精度な発現解析が可能である)。CEAS を含む PG 関連腸症と対照者の血液試料における性ホルモン量の比較としてプロゲステロンやエストロゲン等の定量を行い、CEAS 発症における性ホルモンの関与を検討する。CEAS を含む PG 関連腸症と対照者の細菌叢の比較として小腸粘膜生検検体を用いて 16S rRNA 菌叢解析を行う。

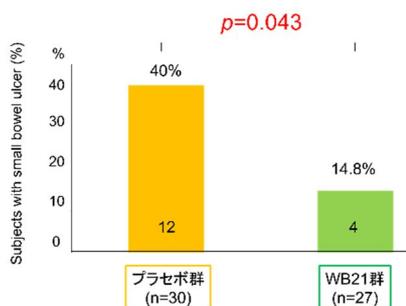
#### 4. 研究成果

まず NSAIDs 起因性小腸潰瘍形成における腸内細菌叢の関与とプロバイオティクスの影響を明らかにするため、健常者を対象とし、セレコキシブ (200mg1 日 2 回) およびラベプラゾール (20 mg) に加え、プラセボ (プラセボ群) または *Lactobacillus salivarius* WB21 (WB21 群) の投与を行うランダム化比較試験を行った。両群において投薬後の貧血出現はなく、消化器症状 (GSRs) に関しても 2 群間で有意差を認めなかった。プラセボ群と WB21 群の間で小腸粘膜傷害の発生率に有意差は認めなかったものの、小腸潰瘍の発生率はプラセボ群より WB21 群で有意に少ないことがわかり、PPI 併用下での NSAIDs 投与において *Lactobacillus salivarius* WB21 の追加投与は NSAIDs 起因性小腸潰瘍の形成を抑制する可能性が示唆された。さらに現在便検体を用いて腸内細菌叢の解析を行っているが、DNA の収量に問題があり、条件設定を検討している。今後さらに次世代シーケンサーによる腸内細菌叢の解析を行い、NSAIDs 起因性小腸潰瘍形成における腸内細菌叢の関与を明らかにしていく。

小腸粘膜傷害の発生率



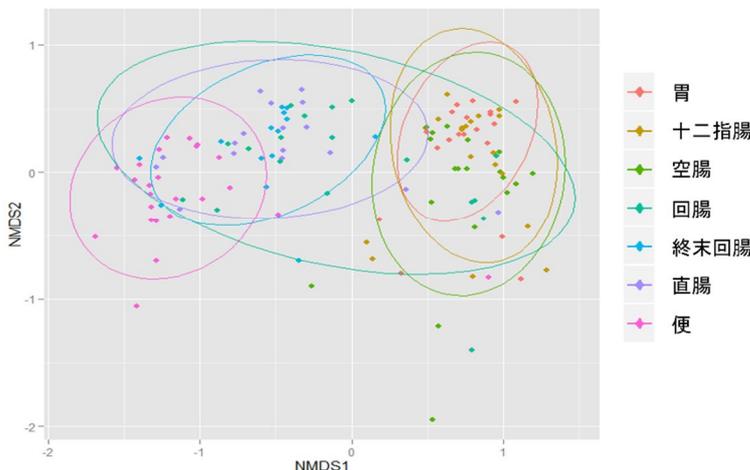
小腸潰瘍の発生率



また、小腸の細菌叢を解析していくにあたって、胃、十二指腸、空腸、回腸、終末回腸、直腸の各部位および便から採取した臨床検体を用いて細菌叢の解析を行い、各部位での細菌叢の違いについて検討した。

種の豊富さに着目すると空腸は最も多様性が低く、回腸の多様性は便と同等であり、終末回腸や直腸より低かった。空腸や回腸は便とは異なるクラスターを形成し、空腸は十二指腸と類似したクラスターを形成するのに対し、回腸は上部消化管と下部消化管の間に幅広いクラスターを形成することがわかった。門レベルでは空腸は便と比較し、Firmicutes 門の割合が高く、Bacteroidetes 門の占める割合は低かった。属レベルでは空腸は Firmicutes 門の大部分が *Streptococcus* 属と *Veillonella* 属で構成されていたのに対し、便では多様な属が比較的均一に存在していた。*Bacteroides* 属は空腸に比べて便で大きくその割合を増していた。機能予測解析では、炭水化物代謝やアミノ酸代謝に関与する遺伝子は空腸や回腸粘膜細菌叢よりも便中細菌叢が多く有していると予測された。空腸・回腸粘膜細菌叢と十二指腸粘膜細菌叢の間には、炭水化物代謝・アミノ酸代謝・脂質代謝に関与する遺伝子量に有意な差は認めなかった。今後の小腸の細菌叢解析において、採取部位による細菌叢の相違を考慮する必要があり、小腸内視鏡での検体収集が困難であれば空腸における細菌叢の解析の代替として十二指腸の細菌叢が解析対象になる可能性も示唆された。

β多様性 (異なる環境間での多様性)  
主座標分析



○ : 95%CI  
NMDS: non-metric multidimensional scaling

CEAS 患者における小腸粘膜の生検検体での解析については比較的検体が古いものも多く、条件設定を検討の上で、今後さらに CEAS 患者の小腸粘膜の免疫化学染色やデジタルカウント遺伝子発現解析、腸内細菌叢の解析を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 松野 雄一、梅野 淳嗣、冬野 雄太、鳥巢 剛弘	4. 巻 4
2. 論文標題 炎症性腸疾患の画像所見と鑑別診断	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 胃と腸	6. 最初と最後の頁 1527-1533
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 無
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 Torisu T, Kawano S, Miyawaki K, Yamamoto H, Ihara Y, Matsuno Y, Torisu K, Sugio T, Sasaki K, Shimakawa T, Kato K, Akashi K, Nakamura S, Kitazono T	4. 巻 39
2. 論文標題 B cell receptor signaling related to resistance to Helicobacter pylori eradication therapy in gastric diffuse large B cell lymphoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hematological Oncology	6. 最初と最後の頁 145-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hon.2816	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 Ihara Y, Torisu T, Miyawaki K, Umeno J, Kawasaki K, Hirano A, Fujioka S, Fuyuno Y, Matsuno Y, Sugio T, Sasaki K, Moriyama T, Akashi K, Kitazono T	4. 巻 102
2. 論文標題 Ustekinumab improves active Crohn's disease by suppressing the T Helper 17 pathway.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 946-955
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000518103	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 Tanaka T, Matsuno Y, Torisu T, Shibata H, Hirano A, Umeno J, Kawasaki K, Fujioka S, Fuyuno Y, Moriyama T, Esaki M, Kitazono T	4. 巻 100
2. 論文標題 Gastric microbiota in patients with Helicobacter pylori-negative gastric MALT lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine	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） 10.1097/MD.0000000000027287	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 Kawasaki K, Torisu T, Nagahata T, Esaki M, Kurahara K, Eizuka M, Tanaka Y, Fujiwara M, Kawatoko S, Oshiro Y, Yamada S, Ikegami K, Fujioka S, Fuyuno Y, Matsuno Y, Umeno J, Moriyama T, Kitazono T, Sugai T, Matsumoto T	4. 巻 21
2. 論文標題 Role of barium enema examination for the diagnosis of submucosal invasion depth in T1 colorectal cancers.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Imaging	6. 最初と最後の頁 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40644-021-00437-z	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 Nagasue T, Hirano A, Torisu T, Umeno J, Shibata H, Moriyama T, Kawasaki K, Fujioka S, Fuyuno Y, Matsuno Y, Esaki M, Kitazono T	4. 巻 -
2. 論文標題 The Compositional Structure of the Small Intestinal Microbial Community via Balloon-Assisted Enteroscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Digestion	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) 10.1159/000524023	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岡本康治、平野敦士、江崎幹宏、小林広幸、鳥巢剛弘
2. 発表標題 PPI併用下でのNSAIDs起因性小腸粘膜傷害に対するLactobacillus salivarius WB21株による予防効果
3. 学会等名 第109回日本消化器内視鏡学会九州支部例会
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

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