

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460933

研究課題名(和文)胃酸分泌低下の腸内細菌叢への影響と腸管疾患との関連

研究課題名(英文)Effect of decrease in gastric acid secretion on the intestinal microbiota and its associated diseases

研究代表者

加藤 順 (Kato, Jun)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90379743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリコバクターピロリ感染に伴う萎縮性胃炎などによる胃酸分泌低下状態が、腸内細菌叢に与える影響、および腸内細菌叢が関与する疾患に与える影響についてはよくわかっていない。本研究では、おもにラットを用いて、胃酸分泌低下によって惹起される腸内細菌叢の変化を解析し、また、それに伴う腸管における組織変化、遺伝子発現の変化も併せて検討した。その結果、胃酸分泌低下状態は腸内細菌叢の特異的な変化を引き起こし、腸管部位ごとに異なる組織学的炎症、遺伝子発現変化をもたらすことが判明し、胃酸分泌低下と各種腸管疾患との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori infection induces atrophic gastritis with decrease in secretion of gastric acid, resulting in increase in pH in the gastrointestinal system. However, the effect of decrease in gastric acid secretion on the intestinal microbiota and diseases associated with microbiota has not fully been investigated. In this research, the changes of microbiota, and histological and genetic changes in the gut induced by decrease in gastric acid secretion were investigated by using a rat model. The results revealed that decrease in gastric acid secretion led to the specific change of microbiota, accompanied with site-specific histological inflammation in the gut and changes of gene expression in the intestinal mucosa. These results suggested the possible correlation between reduction of gastric acid secretion and microbiota-associated diseases.

研究分野：消化管疾患

キーワード：ヘリコバクターピロリ 萎縮性胃炎 腸内細菌 慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

H. pylori による胃粘膜長期感染の結果、萎縮性胃炎が進行し、萎縮性胃炎は胃癌発生母地となることはよく知られている。一方、進行した萎縮性胃炎では胃酸分泌能が廃絶し、胃内を中心として、消化管内腔の pH が上昇する。この消化管内腔環境の変質が消化管疾患の発生や経過に与える影響についての報告はほとんどない。一方、超高齢社会を迎えた我が国では、今後更なる人口高齢化の進展、萎縮性胃炎罹患者の増加が見込まれており、恒常的な胃酸分泌低下に起因する消化管内腔環境の変化が消化管を含めた生体に及ぼす影響を検討することは、科学的観点のみならず、臨床医学の観点からも重要なテーマを形成することになる。近年、腸内細菌叢の変化が消化管のみならず、全身の炎症性疾患、癌、代謝性疾患や肥満の発生、経過に深くかかわっていることが明らかになってきた。ヒトの腸内には 100 種類以上、100 兆個の細菌が存在するといわれているが、そのほとんどは偏性嫌気性菌であり、従来の培養法などで検出できるものはごく一部に限られていた。これに対して、最近の分子生物学的手法の進歩により、細菌特有の 16S rRNA をターゲットとして腸内細菌のゲノムを増幅した上で網羅的に解析する手法が広まってきており、腸内細菌叢全体のダイナミックな変化が解析できるようになってきた。現在、そのような腸内細菌叢に対する網羅的な解析に基づいて、さまざまな疾患に対する腸内細菌の影響の報告が多数行われるようになってきている。しかしながら、萎縮性胃炎を含めた胃酸分泌低下の病態が腸内細菌叢に与える影響についての解析はほとんどなされていない。

2. 研究の目的

今回の研究では、以前当施設で行われた胃酸分泌能低下が腸内細菌叢に与える影響についての基礎研究をさらに進展させる。具体的には、

(1) 胃酸分泌能低下をよりよく反映する動物モデル(胃切除ラットモデル)を作成し、腸内細菌叢の変化を網羅的に解析する。

(2) さらに、その動物モデルの腸管組織の病理学的、分子生物学、免疫学的検討を行い、腸内細菌叢の変化が腸管組織や腸管免疫に与える具体的な影響について解析する。

(3) ペプシノゲン法で評価した胃粘膜萎縮のあるヒトのコホートから便および腸管組織を採取し、動物実験の結果と照合したうえで、ヒトにおける胃酸分泌能低下の腸内細菌叢、腸管組織の増殖分化、腸管免疫に対する影響を解析する。

(4) さらに、動物モデルおよびヒトのコホートに対し、腸内細菌叢を変化させる介入(probiotics の投与など)を行い、その影響を解析し、将来の治療、予防医学に対する可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) ラット(ウイスター雄性、10週令)に胃切除術を施行、同時に作成した擬似手術を施行したラットをコントロールとして、術後の経時的変化を以下の項目について行う。

腸管内容の pH 測定

マイクロプローブを装着した pH メーターを用いて腸管各部位の内容物サンプルについて pH を直接測定する。

腸内容物サンプルの HPLC による分析

腸内容物サンプルを PBS にて希釈、遠心後の上清を HPLC および電気伝導度検出器システムを用いて分析することで、短鎖脂肪酸をはじめとする内容物の分析を行う。

腸内細菌叢解析

各部位の腸内容物サンプルよりビーズ・フェノール法により細菌 DNA を抽出し、既報(BBRC 381; 666-670, 2009)の如く、16S rRNA を標的とした特異的定量的 real-time PCR 法により腸内細菌叢の主要な 12 菌種・菌群について解析を行い、腸内細菌叢構成菌を把握し、胃酸分泌低下に伴う腸内細菌叢の動態について検討する。

(2) 上記の胃切除ラットおよびコントロールについて、病理組織学的な検討を行うと共に腸管粘膜の細胞周期・細胞増殖・アポトーシスについてのパラメーターの解析(腸管粘膜の細胞増殖性 Ki-67, PCNA, topoisomerase, MCM, caspase-3 などの免疫染色)、carbonic anhydrase I and II などの分化マーカーの発現の検討を併せて行う。

(3) 組織より抽出した RNA を対象に遺伝子の網羅的解析を行い、十二指腸から大腸までの消化管の各部位における遺伝子発現変化を通して、無酸状態が消化管および生体に与える影響を検討する。

(4) 胃切除ラットにおける免疫機能の変化を検討するためにラット末梢血単核球を採取、in-vitro におけるサイトカイン誘導能、FACS による解析を行うと共に、消化管組織に加えてリンパ節、肝臓、脾臓など免疫学的に重要な機能を果たしている臓器の免疫組織化学的な検討を行う。

(5) 上記実験動物でのデータを踏まえて、胃酸低下状態のヒトでのデータを検討するために、申請者がこれまで追跡研究に使用してきた、胃がん検診コホートをを用いて以下の検討を行う。

血清ペプシノゲン検査陽性・ヘリコバクター抗体価陰性を以て診断した萎縮性胃炎進展により高度の低酸状態に至った化生性胃炎例を 40 - 50 例集積し、これらに対するコントロールとしてヘリコバクター未感染で萎縮性胃炎合併の無い、年齢及び性を一致させた症例を同数選別し、IC 取得の上で採血および採便を行う。

上記の便サンプルより DNA を抽出し、ラットでの検討と同様に 12 菌種・菌群に対応するプライマーを用いて定量的 real-time

PCR 法により解析を行う。

上記の血液検体につき、血清中のインターフェロン、TNF-などのサイトカインレベルを測定する。また、末梢血単核球を調整し in-vitro におけるサイトカイン誘導能、FACS による解析を行う。

(6) 胃切除後症例を対象に IC 取得後、上記化生性胃炎症例と同様の検討を行う。

(7) 上記で観察された胃酸分泌低下に伴う一連の変化の改善策として、抗菌薬、probiotics 投与などが有効であるかを検討する。すなわち、同じラット胃切モデルを用いて、腸内細菌叢を含めた腸管内容、細胞増殖・分化を中心とした腸管上皮の組織構築および遺伝子発現、免疫機能について検討を加えることで、改善策を検討する。

(8) 同様にヒトにおいても、上記の化生性胃炎症例、胃切除術後症例を対象に IC 取得を行い、prebiotics あるいは probiotics 投与により、腸管細菌叢、免疫機能の改善が図られるかについて cross-over 試験を行う。

4. 研究成果

胃全摘術施行後、4 週間飼育したラットの回盲部・中部結腸部・直腸部から採取した腸内容物をサンプルとして pH 測定・短鎖脂肪酸分析・フロー解析を以下の通りに行った。

(1) 腸内容物を対象にした pH 測定では全部位および直腸部位において胃全摘ラット群の方がコントロールラット群よりも pH が有意に高かった。中部結腸および回盲部では両群間に有意な差は認められなかった。

(2) 腸内容物サンプルの短鎖脂肪酸分析を HPLC システムにて行った。コハク酸・乳酸・酢酸・プロピオン酸・酪酸が検出されたが、他の短鎖脂肪酸は検出限界 (2 mM) 以下であった。乳酸・酢酸・プロピオン酸の各短鎖脂肪酸濃度および検出可能であった短鎖脂肪酸の合計濃度を比較したところ、胃全摘ラット群で有意な低下を認めた。

(3) 腸内容物サンプルのフロー解析を SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time)(RR041A タカラバイオ)を用いた qPCR にて行った。胃全摘ラットでは、*B. fragilis* group, *Enterobacteriaceae*, *C. ramosum* subgroup, *C. coccoides* group, *E. cylindroides* group, *Bifidobacterium*, *Atopobium* cluster, *Prevotella*, *Veillonella* の菌数がコントロールラットに比べて有意に増加し、*Lactobacillus* は有意に減少していた。すなわち、胃全摘ラットの腸管内容物では偏性嫌気性菌の有意な増加が観察された。また、病理学的には胃全摘ラットの大腸粘膜では著明なリンパ球を中心とした浸潤が観察された。

(4) 胃全摘ラットの末梢血単核細胞 (PBMC) を単離、LPS 刺激によるサイトカイン誘導能を検討した。その結果、胃全摘ラットではコントロールラットに比べ IFN の発現誘導が有意に亢進していた。

(5) 胃全摘ラットの十二指腸から大腸に至る消化管各臓器より RNA を抽出し、マイクロアレイによる遺伝子発現を解析した。

コントロールラットと比較して、各領域で有意な発現変化を示す遺伝子数は以下の通りであった。

	Changed	Increased	Decreased
十二指腸	542	250	292
小腸	640	405	235
大腸	1353	518	835
直腸	737	346	391

(6) 更に胃全摘が個体全体に与える影響を検討するため、これらの遺伝子群がどのような生体内機能 Pathway と関連するものかを IPA (Ingenuity Pathway Analysis) アプリケーションを用いて、発現変化を示した遺伝子群と関連性の高い生物学的機能と既知のパスウェイを解析した。結果は、直腸においては Top 5 に炎症に関わる機能がリストされており、また発現変化に関連する既知のパスウェイ (canonical pathways) については、T リンパ球に関するものが 2 種類 (Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis Signaling Pathway および OX40 Signaling Pathway) 認められた。すなわち、直腸においては慢性炎症が惹起されている可能性が強く示唆された。一方、同じ大腸でも結腸においては T cell receptor signaling が抑制傾向にあると想定される解析結果が得られた。また、十二指腸および小腸では脂質・コレステロールの合成機能に変化が生じている結果が得られた。胃全摘により、十二指腸・小腸・結腸・直腸の各領域で全く異なるシグナルが動いていることが想定された。

(7) 上記の遺伝子発現の結果から、胃全摘により十二指腸・小腸・結腸・直腸の各領域で全く異なるシグナルが動いていることが想定されたため、胃全摘ラットの十二指腸から直腸に至る消化管の病理組織学的変化をコントロールとの対比で検討した。その結果、胃全摘ラットにおいては、肛門より 3 cm 程度の範囲の直腸におけるリンパ球を主体とする炎症細胞浸潤が著明であること、リンパ濾胞の構造が変化していると思われる所見を見出した。浸潤するリンパ球の構成としては、B cell および T cell 共に増加を示しており、免疫組織学的に浸潤するこれらリンパ球の subset, CD68 をマーカーとしたマクロファージの浸潤を検討しているところである。

(8) ヒトでのデータを検討する目的で、年齢、性を調整した健常人 42 名、萎縮性胃炎者 42 名を対象に便中より抽出した DNA と次世代シクエンサーを用いて腸管フローの解析を行い、Bacteroidaceae, Lachnospiraceae が健常人よりも有意に減少していることを見出した。

(9) 地域検診コホートを対象に萎縮性胃炎が進展し、化生性胃炎の病期に達した受診者と *H. pylori* 未感染かつ萎縮性胃炎のない健

常者をそれぞれリクルートし、腸管細菌の制御の上で定評のある梅エキスを用いさせ腸管フローラの変化、PBMCのサイトカイン誘導能の変化について検討することを目的にクロスオーバー試験を実施した。当初、化生性胃炎群、コントロール群70名を選択して協力を依頼したが、協力を得られ、かつ適格者として試験を完遂した者はそれぞれ20名、27名であった。彼らの末梢血単核細胞(PBMC)を単離、LPS刺激によるサイトカイン誘導能を検討した。その結果、胃全摘ラットでの実験結果とは異なり、個人による差異が大きいが、全体として化生性胃炎例ではIFNの発現誘導が有意に低下、IL10の発現誘導が亢進している結果が得られた。そして梅エキスの摂取は、化生性胃炎例でのLPS刺激によるIL10の発現誘導亢進を減弱させる効果を示した。

(10) 現在、胃全摘ラットを使った動物実験の研究結果をまとめているところであるが、この点に関してほぼ事前に想定した結果を得ることができた。一方、人においてはデータの個人差が大きく、対象となる個人の食事摂取や萎縮性胃炎・化生性胃炎の進展度に差があることが原因していると思定されるが、PBMCのサイトカイン誘導能については胃全摘ラットと人のデータが全く相反するデータで、その点の解釈に苦慮していること、人を対象としたクロスオーバー試験で参加者が予定より少なかったこと、また、これらの対象者から得た便より抽出したDNAの腸管フローラの解析が遅れていることにより、ヒトでの検討データをまとめる上では、今しばらくの時間が必要である。ヒトを対象にしたクロスオーバー試験のフローラ解析などの結果が教室の事情で遅れているが、この点の遅れを至急取り戻すこと、対象者間に認められるデータのバラツキの原因を突き止めて妥当な範囲で結論付けられる内容で結果の取りまとめを行いたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

Iguchi M, Kato J (2 番目/15 人), Ichinose M (15 番目/15 人). Serum pepsinogen levels can quantify the risk of development of metachronous gastric cancer after endoscopic resection. *Int J Cancer* 査読あり 2016, epub DOI: 10.1002/ijc.30145
Moribata K, Kato J (2 番目/12 人), Ichinose M (12 番目/12 人). Endoscopic features associated with development of metachronous gastric cancer in patients who underwent endoscopic resection followed by *Helicobacter pylori* eradication. *Dig Endosc* 査読あり 2016 epub. DOI: 10.1111/den.12581
Fukatsu K, Kato J (2 番目/14 人),

Ichinose M (14 番目/14 人). Microscopic invasion patterns and epithelial cell-phenotypes in early gastric cancer with submucosal invasion. *J Cytol Histol* 査読あり 2015,6:380 DOI: 10.4172/2157-7099.1000380

Maekita M, Kato J (2 番目/17 人), Ichinose M (17 番目/17 人). Japanese apricot improves symptoms of gastrointestinal dysmotility associated with gastroesophageal reflux disease. *World J Gastroenterol* 査読あり 2015,21:8170-8177. DOI: 10.3748/wjg.v21.i26.8170

中田博也, 加藤順, 井上泉, 玉井秀幸, 井口幹崇, 前北隆雄, 一瀬雅夫. 潰瘍性大腸炎における *Helicobacter pylori* 感染と胃粘膜萎縮の関連 日本消化器がん検診学会雑誌 査読あり 2015,53:383-388. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsgcs/53/3/53_383/_pdf

Yamamichi N, Kato J (10 番目/24 人), Ichinose M (23 番目/24 人). Associated factors of atrophic gastritis diagnosed by double-contrast upper gastrointestinal barium X-ray radiography: a cross-sectional study analyzing 6901 healthy subjects in Japan. *PLoS One* 査読あり 2014,9:e111359. DOI: 10.1371/journal.pone.0111359

井上泉, 加藤順, 前北隆雄, 井口幹崇, 玉井秀幸, 一瀬雅夫. 大腸腫瘍のリスクファクターとしての *Helicobacter pylori* 感染胃炎 臨牀消化器内科 査読なし 2014,29:611-613. <http://www.nmckk.jp//thesisDetail.php?category=CLGA&vol=29&no=5&d1=15&d2=0&d3=0&lang=ja>

Inoue I, Kato J, Tamai H, Iguchi M, Maekita T, Yoshimura N, Ichinose M. *Helicobacter pylori*-related chronic gastritis as a risk factor for colonic neoplasms. *World J Gastroenterol* 査読あり 2014,20:1485-1492. DOI: 10.3748/wjg.v20.i6.1485

Yoshida T, Kato J (2 番目/20 人), Ichinose M (20 番目/20 人). Cancer development based on chronic active gastritis and resulting gastric atrophy as assessed by serum levels of pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody titer. *Int J Cancer* 査読あり 2014, 134:1445-1457. DOI: 10.1002/ijc.28470

[学会発表](計 13 件)

Moribata K, Kato J, Ichinose M. Predictive factors for metachronous

gastric cancer after HP eradication in the post-ESD status. UEGW2015 2015/10/27 Barcelona (Spain)

Yamamoto Y, Kato J, Ichinose M. ESD for early gastric cancer in elderly patients. UEGW2015 2015/10/28 Barcelona (Spain)

井上泉, 加藤順, 一瀬雅夫. HP 感染/HP 感染胃炎による大腸腫瘍リスク増加の発生部位による影響 第 90 回日本消化器内視鏡学会総会 2015/10/10 東京

井上泉, 加藤順, 一瀬雅夫. 大腸腫瘍リスク増加に対する腸内細菌の影響 第 90 回日本消化器内視鏡学会総会 2015/10/8 東京

Iguchi M, Kato J, Ichinose M. Extensive mucosal atrophy quantified by serum pepsinogen levels can predict metachronous gastric cancer development after endoscopic resection regardless of Helicobacter pylori eradication. DDW2015 2015/5/18 Washington DC (USA)

吉田岳市, 加藤順, 一瀬雅夫. Helicobacter pylori (HP)感染胃炎の活動度および萎縮性胃炎進展度により決定される胃癌発生リスク 第112回日本内科学会総会 2015/4/10 京都

Inoue I, Kato J, Ichinose M. Effects of smoking on Helicobacter pylori-associated chronic gastritis and the development of gastric cancer. UEGW2013 2013/10/13 Berlin (Germany)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 順 (KATO, Jun)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90379743

(2) 研究分担者

一瀬 雅夫 (ICHINOSE, Masao)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50143425