

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861171

研究課題名(和文) 回腸嚢炎は潰瘍性小腸炎であるという仮説に基づいた潰瘍性大腸炎起炎菌の同定の試み

研究課題名(英文) Trial to identify the bacteria which causes ulcerative colitis on the hypothesis that pouchitis is ulcerative ileitis

研究代表者

神山 篤史 (Kohyama, Atsushi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：50647005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：大腸全摘・回腸嚢肛門吻合術の晩期合併症として回腸嚢炎が発生することがあるが、その発生頻度は潰瘍性大腸炎で高く、家族性大腸腺腫症ではほとんど認めない。回腸嚢炎の発症機序は未だ不明であるが治療に抗生剤やプロバイオティクスが有効であることから、腸内細菌叢との関連性が示唆されてきた。本研究の目的は、潰瘍性大腸炎が遺伝的背景をもとに、術後の腸内細菌のいったい何が変化的ことによって本来病変の存在しなかった回腸に炎症が生ずるのかを明らかにすることである。さらには、「回腸嚢炎は、術後の回腸嚢に起こる潰瘍性大腸炎の再燃であり、潰瘍性小腸炎である」とする仮説に基づき、潰瘍性大腸炎の病因究明につなげることである。

研究成果の概要(英文)：Pouchitis is a major late complication which sometimes occurs after restorative proctocolectomy with ileal pouch-anal anastomosis (IPAA). However, its pathogenesis still remains unclear. The rate of incidence is higher in ulcerative colitis' cases and quite rare in familial adenomatous polyposis' cases. Furthermore, the fact that antibiotics and probiotics are effective in treating pouchitis indicates a direct or indirect link of pouch microbiota to mucosal inflammation. There are two aims based on the hereditary background to elucidate how microbiota in the guts alter after the patients' operation and what causes the inflammation in the ileum, which is not supposed to have any lesions in the ulcerative colitis. In addition, the other aim is to investigate the pathogenesis which causes ulcerative colitis according to the hypothesis that "pouchitis is ulcerative ileitis."

研究分野：消化器外科

キーワード：潰瘍性大腸炎 回腸嚢炎 腸内細菌叢 家族性大腸腺腫症

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎は原因不明の難治性炎症性腸疾患である。厚生労働省の難病指定を受け、患者数は10万人を超えてなお増え続けている。大腸全摘回腸肛門(管)吻合術は潰瘍性大腸炎の標準術式であるが、術後の約半数に回腸囊炎が発症する(Pardi D, et al. *Inflam Bowel Dis* 2009)。家族性大腸腺腫症術後での発生は稀であることから、潰瘍性大腸炎そのものの発症要因と深く関連すると推察される。我々の施設では、これまで診断基準や治療指針の作成に直接関与してきたが、最近ではいわゆる難治例が増加してきており、術後QOLの低下に直結している(Fukushima K, et al. *J Gastroenterology* 2006)。抗生剤(Shen B, et al. *Inflamm Bowel Dis* 2001)やプロバイオティクス(Gionchetti P, et al. *Gastroenterology* 2003)が治療や予防に有効であることから、腸内細菌叢の変化が発症に關与するものではないかと推測されるが、直接的な証拠は現在のところない。

我々はこれまでに大腸全摘術後の腸内細菌叢を Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法により後ろ向きに解析を行ってきた。これによると、腸内細菌叢は本来個人差が大きいとされるにもかかわらず、術後回腸囊便中の腸内細菌変動パターンは普遍的であり、より大腸に近い菌構成に近づくことを証明してきた(Kohyama A, et al. *Surgery* 2009)。さらに菌種(群)特異的プライマーを用いた定量的PCRによりその所見を確認するとともに、通常小腸に存在する腸内細菌の減少も認められた(Hinata M, et al. *Dig Dis Sci.* 2012)。

回腸囊炎には、初期治療として ciprofloxacin や metronidazole などの抗生剤が奏功する。回腸囊にまつわる腸管上皮や菌叢の経時的変化、抗生剤の治療効果と耐性の出現、プロバイオティクスの有効性から、腸内細菌が回腸囊炎の発症、再燃、難治化に深く關与することが示唆される。しかし、従来の培養法では、約70%の腸内細菌が培養困難菌であり、関連性のある菌種のリストアップさえ十分なされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、潰瘍性大腸炎が遺伝的背景をもとに、術後の腸内細菌のいったい何が変わることによって本来病変の存在しなかった回腸に炎症が生ずるのかを明らかにすることである。さらには、「回腸囊炎は、術後の回腸囊に起こる潰瘍性大腸炎の再燃であり、潰瘍性小腸炎である」とする仮説に基づき、潰瘍性大腸炎の病因究明につなげることである。

3. 研究の方法

(1) T-RFLP 法による検討

大腸全摘回腸囊肛門(管)吻合を施行された症例に対し、内視鏡検査により回腸囊炎の有無を確認しつつ経時的に採便しDNA, RNAを抽出し、T-RFLP法にて以下の検討を行なう。

潰瘍性大腸炎および家族性大腸腺腫症の大腸全摘術後回腸囊腸内細菌叢の経時変化についてT-RFLP法で前向きに解析を行う。

同一症例(潰瘍性大腸炎および家族性大腸腺腫症)の回腸囊炎発症前、発症時、治療時、再燃時の腸内細菌叢の経時変化をT-RFLP法で行い、発症に關わる菌種の絞り込みを行い、データベースより菌種の同定を行なう。

(2) Microarray 法による検討

同一症例の検査時に同時に腸管上皮の生検を行い、腸内細菌叢の変化と関連してどのように腸管上皮の発現型が変化するかについてはmicroarray法などを用いて調べる。

(3) 検体採取時期、検体の処理

検体の採取:以下の時期に検体を採取する(我々はすでに腸内細菌叢は、術後1年を経過することで安定化することを明らかにしている)。

- 1) 術後2週目(予防的抗生剤投与の影響を考慮)
- 2) 術後1ヶ月目
- 3) 術後6ヶ月目
- 4) 術後1年目(以下1年おき)
- 5) 回腸囊炎発症時(診断には内視鏡を用いる)
- 6) 回腸囊炎発症時(metronidazoleとciprofloxacinを併用して2ないし4週投与)
- 7) 回腸囊炎再燃時およびその治療後術後経過観察時の投薬としては、原則として整腸剤(プロバイオティクス)を併用しない。

検体の処理(DNAおよびRNAの抽出):

採便後直ちに検体を5倍量のRNA保存液に入れ混和、4℃にて保存して3週間以内に核酸抽出を行なう。DNA抽出にはグラム陽性・陰性で収量効率の変わらないGES溶液中によるビーズ破砕で、RNA抽出は塩化セシウム密度勾配遠心法により抽出し吸光度測定後-80℃に保存する。

4. 研究成果

(1) T-RFLP 法による検討

これまで潰瘍性大腸炎(UC)患者3名および家族性大腸腺腫症(FAP)患者1名から検体の採取の同意を得て経時的にサンプルの採

取を行い、DNA 精製をおこなっている。しかしながら、T-RFLP で解析を行うには症例が少なく、また、回腸囊炎発症へ至る症例も未だに存在しないためにもうしばらくの集積期間が必要であると考えられた。症例集積が進まなかった理由としては、内科治療の進歩に伴う手術患者数の減少、プロトコルの煩雑性、関連施設などへの症例の分散などが挙げられる。以上のような理由から検体の採取は思うように進まなかったものと推測する。

このため、予備実験として以前に採取、保存していた検体を用いて再度解析を行った。2007年までに採取しDNA抽出を行っていた大腸全摘術後の UC 患者 29 人、健常成人 (control) 31 人の糞便から DNA を用いて terminal restriction fragment length polymorphism(T-RFLP)法にて解析した。UC 患者からは同一個体から繰り返し採取したものも含めて回腸瘻 (イレオストミー) 便 23 検体、回腸囊炎未治療 13 検体、回腸囊炎に対して抗生剤治療後 10 検体の計 46 検体を用いた。

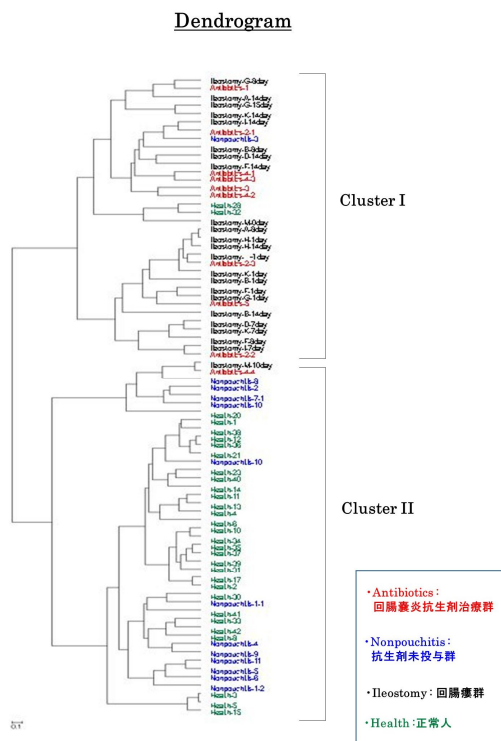


図 1: 回腸囊炎治療の有無による Cluster 解析

図 1 の如く、健常人 31 検体を合わせた 77 検体で dendrogram を作成した。

結果、Cluster 解析では赤字で示す抗生剤治療群の 90% (10 検体中の 9 検体) が、黒字で示す回腸瘻 (イレオストミー) 群の 96% (23 検体中 22 検体) の便と同じ Cluster I に入る

一方で、青字で示す回腸囊炎未治療群の 92% (13 検体中の 12 検体) は、健常成人の 94% (31 例中の 29 例) の便と同じ Cluster II に入ることが示された。

つまり、以前の研究 (Kohyama, et al. Surgery 2009) で大腸全摘後の患者で便中細菌叢が経時的に健常人に近づくことを示したが、今回の結果から UC における回腸囊炎に対する治療は、回腸囊内の細菌叢を健常人と近い細菌叢から回腸に近い細菌叢へ近づけている可能性が考えられた。

また、回腸囊炎発症例の T-RFLP 波形を同一患者から経時的に 1 例採取出来ていたので比較を行った。

臨床的に 回腸囊炎未発症時、回腸囊炎診断時、抗生剤治療 2 ヶ月後、抗生剤治療 3 ヶ月後、抗生剤治療 6 ヶ月後の計 5 回を同一患者から採取して、制限酵素 HhaI で処理して T-RFLP 法を行った。結果、図 2 に示すような波形を示した。抗生剤治療前の波形と抗生剤治療後の波形で大きく異なることが明示された。以前の研究 (Kohyama, et al. Surgery 2009) でいわゆる「大腸型」腸内細菌叢の典型波形としていた 187bp が治療前では目立つが、治療後は一転してこれらが消失している。代わりに、いわゆる「小腸型」波形の典型とした 213bp が出現しているという結果であった。

以上の結果から、回腸囊炎の治療前後で便中細菌叢は「大腸型」から「小腸型」へと変化する可能性が考えられた。

しかし、これらの結果は計画的かつ経時的に採取された必要十分数の検体から検討されたものではない。本結果を参考として、さらなる検体集積の後に再度検討を行う予定である。

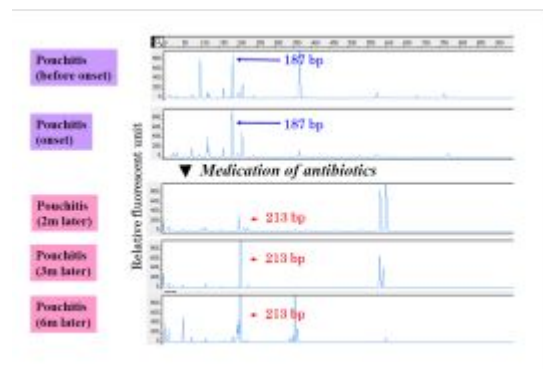


図 2: 回腸囊炎発症例 (同一症例) の経時的比較

(2) Microarray 法による検討

同一症例の検査時に同時に腸管上皮の生検を行い、腸内細菌叢の変化と関連してどのように腸管上皮の発現型が変化するかについては microarray 法を用いて調べる予定で

あったが、先述の通り症例集積は進んでおらず未施行である。集積が進み次第、施行予定である。

(3) 検体採取時期、検体の処理

先述の通り、これまでに UC 患者 3 名および FAP 患者 1 名から検体の採取の同意を得て経時的にサンプルの採取を行い、DNA 精製を施行した。現時点でサンプル数が絶対的に不足していることは否めない。特に本研究において FAP 症例のサンプル採取は key となりうる。また、今後は回腸嚢炎を発症する患者も出現することも予測されるため、本研究期間は終了したものの、今後も症例集積を重ねて研究を続けていく予定である。

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 8 件)

Kajiwara T, Miura K, Ohnuma S, Shimada M, Komura T, Toshima M, Kohyama A, Kudoh K, Haneda S, Musha H, Naitoh T, Shirasaka T, Unno M. Gastrointestinal toxicities of 5-fluorouracil increase the proportion of regulatory T cells in intestinal tract: advantages of alternate-day S-1 administration. *Int J Clin Oncol*. 査読有, 2015 Oct; 20(5): 913-21. doi:10.1007/s10147-015-0791-x. Epub 2015 Feb 5.

Komura T, Miura K, Shirasaka T, Ohnuma S, Shimada M, Kajiwara T, Fujishima F, Philchenkov A, Nakagawa K, Kudoh K, Haneda S, Toshima M, Kohyama A, Musha H, Naitoh T, Shibata C, Unno M. Usefulness of alternate-day administration of S-1 and leucovorin in a xenograft mouse model of colorectal cancer: a shorter drug-free interval leads to more efficient antitumor effects. *Int J Clin Oncol*. 査読有, 2015 Feb; 20(1): 117-25. doi: 10.1007/s10147-014-0699-x. Epub 2014 May 8.

Yabusaki M, Sato J, Kohyama A, Kojima T, Nobuoka D, Yoshikawa T, Sawada Y, Murakami K, Gohda K, Okegawa T, Nakamura M, Takamatsu K, Ito M, Kaneko K, Nakatsura T. Detection and preliminary evaluation of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with eight types of cancer using a telomerase-specific adenovirus. *ncol Rep*. 査読有, 2014 Nov; 32(5): 1772-8. doi: 10.3892/or.2014.3436. Epub 2014 Aug 22.

Ohnuma S, Naitoh T, Haneda S, Kudoh K, Kohyama A, Nagao M, Tanaka N, Sasaki H, Aoki T, Abe T, Musha H, Morikawa T, Yoshida H, Motoi F, Katayose Y, Shibata C, Unno M. Therapeutic strategy for neuroendocrine tumor of the rectum. *Gan To Kagaku Ryoho*. 査読無, 2013 Nov; 40(12): 2077-9. Japanese.

武山 大輔, 市川 宏文, 大原 勝人, 神山 篤史, 金田 巖 脾頭部嵌頓による胆汁うっ滞を伴った巨大食道裂孔ヘルニアを腹腔鏡下に修復した 1 例. *日本内視鏡外科学会雑誌* 査読有, 20 巻 5 号 P.501-506(2015.09)

福島 浩平, 渡辺 和宏, 羽根田 祥, 神山 篤史, 佐々木 健吾, 齋藤 喬, 高橋 賢一, 舟山 裕士. クロウン病における Intestinal Failure とその対策 外科の立場から(解説/特集). *消化と吸収* 査読無, 36 巻 3 号 p.322-326(2014.07)

福島 浩平, 羽根田 祥, 渡辺 和弘, 神山 篤史, 長尾 宗紀, 舟山 裕士, 高橋 賢一, 佐々木 健吾, 齋藤 喬 炎症性腸疾患(IBD) 回腸嚢炎(解説/特集) 成人病と生活習慣病 査読無, 44 巻 3 号 Page335-339(2014.03)

工藤 克昌, 柴田 近, 武者 宏昭, 田中 直樹, 大沼 忍, 羽根田 祥, 神山 篤史, 中川 圭, 内藤 剛, 海野 倫明 胃癌手術症例に対する controlling nutritional status 法による術前栄養評価と術後合併症の評価 *日本消化器外科学会雑誌* 査読有 47 巻 6 号 p. 305-312(2014.06)

[学会発表](計 12 件)

Kohyama A, et al. The feasibility and safety of laparoscopic interval appendectomy for appendiceal abscess. *Society of American Gastrointestinal and Endoscopic Surgeons* 2015, 2015 年 4 月 15 日 ナッシュビル アメリカ

神山 篤史, 他. 成人膿瘍形成性虫垂炎に対する Laparoscopic interval appendectomy の治療成績. 第 28 回日本内視鏡外科学会総会 2015 年 12 月 10 日 大阪国際会議場(大阪市)

神山 篤史, 他. 大腸ステント導入後の大腸癌イレウスに対する治療戦略. 第 77 回日本臨床外科学会総会 2015 年 11 月 27 日 福岡国際会議場(福岡市)

神山 篤史, 他. 80 歳以上の大腸癌イレウス患者に対する大腸ステントの有効性の検討. 第 68 回日本大腸肛門病学会学術集会 2015 年 11 月 14 日 ヒルトン名古屋(名古屋市)

神山 篤史、他。大腸癌イレウスに対する使用目的別の大腸ステントの治療成績。第70回日本消化器外科学会総会 2015年7月16日 アクトシティ浜松(浜松市)

神山 篤史、他。傍ストーマヘルニア発症の危険因子の検討。第69回日本消化器外科学会総会 2014年7月16日 ホテルハマツ(郡山市)

神山 篤史、他。重症潰瘍性大腸炎症例に対する外科治療の成績。第68回日本大腸肛門病学会学術集会 2013年11月15日 京王プラザホテル(東京都)

神山 篤史、他。クローン病癌化15例の検討。第100回日本消化器病学会総会 2014年4月24日 東京国際フォーラム(東京都)

神山 篤史、他。潰瘍性大腸炎関連大腸癌39例の検討。第114回日本外科学会定期学術集会 2014年4月3日 国立京都国際会館(京都市)

神山 篤史、他。直腸神経内分泌腫瘍に対する治療方針の検討。第80回大腸癌研究会 2014年1月24日 都市センターホール(東京都)

神山 篤史、他。癌化したクローン病14症例の外科的側面からの検討。JDDW2013 2013年10月10日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都)

神山 篤史、他。潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌に対する術式選択の検討。第68回日本消化器外科学会総会 2013年7月18日 ホテルサンフェニックス(宮崎市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
神山 篤史(KOHYAMA ATSUSHI)
東北大学・医学系研究科・非常勤講師
研究者番号：50647005

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし