

## 内視鏡下ブラッシング法を用いた IBD 粘膜関連腸内細菌叢の構造、機能解析

研究分担者 安藤 朗 滋賀医科大学 消化器内科 教授

研究要旨：炎症性腸疾患の腸内細菌叢では、その多様性低下や細菌叢の構成の異常などの dysbiosis が認めらる。この Dysbiosis は炎症性腸疾患の病態形成に重要な役割を果たしていることが知られている。近年、粘膜に付着する細菌叢、粘膜関連細菌叢（mucosa-associated microbiota）が腸管上皮や粘膜機能に対して直接影響を及ぼし、炎症性腸疾患の病態生理に関与していることが明らかとなってきた。本研究課題では、炎症性腸疾患の粘膜関連細菌叢を検討することを目的とした。

### 共同研究者

西田 淳史（滋賀医科大学消化器内科）  
 馬場 重樹（滋賀医科大学消化器内科）  
 井上 亮（京都府立大学生命環境科学研究科）  
 内藤 裕二（京都府立医科大学消化器内科）

（細菌叢解析）Miseq を用いて 16S rRNA シークエンスを行った。

（倫理面への配慮）

本研究は滋賀医科大学倫理委員会の承認を得て行っている。（28-111）

研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）を十分に行い、倫理面に問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記することとした。

### A. 研究目的

本研究は「腸内細菌プロジェクト」の一貫として、炎症性腸疾患の粘膜関連細菌叢の解析をすることを目的としている。

### B. 研究方法

（対照）潰瘍性大腸炎（UC 群）43 例、クローン病（CD 群）26 例、非炎症性腸疾患（Control 群）14 例から 174 サンプル採取した。

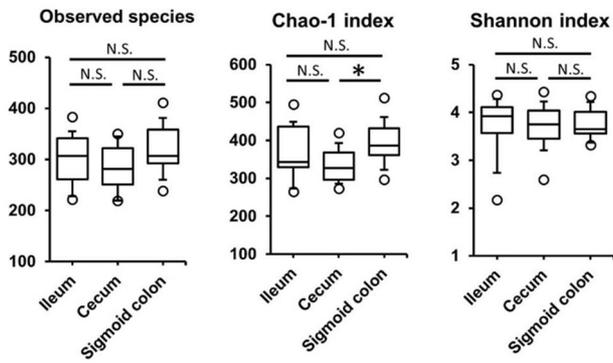
（サンプル採取）サンプルを内視鏡的に消化管細胞診用ブラシ（COOK® CCB-7-240-3-S, Bloomington, IN, USA）を用いて採取した。非炎症性腸疾患では、回腸末端、盲腸、S 状結腸、クローン病では回腸末端と S 状結腸、潰瘍性大腸炎では盲腸と S 状結腸からサンプルを採取した。採取した粘液サンプルからの DNA 抽出を、QIAamp UCP Pathogen Mini Kit（QIAGEN, Germantown, MD, USA）および Pathogen Lysis Tube S（QIAGEN）を用いて行った。

### C. 研究結果

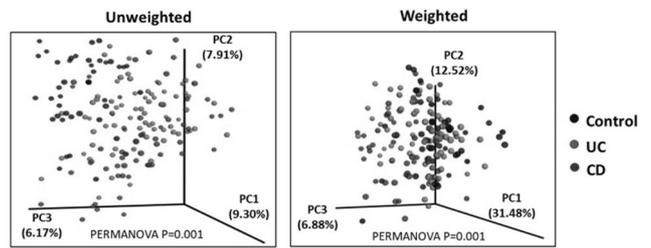
#### （1）対象患者

|   | Non-IBD (n = 14) | CD (n = 26)       | UC (n = 43)      |
|---|------------------|-------------------|------------------|
| Female/male                             | 5/9              | 5/21              | 17/26            |
| Age, years, mean (range)                | 44.1 (32-68)     | 38.6 (19-66)      | 43.4 (18-76)     |
| BMI, mean (range)                       | 22.2 (15.6-28.1) | 22.6 (17.2-34.3)  | 21.8 (16.8-33.4) |
| Sample number                           | 42               | 52                | 80               |
| CDAI, mean (range)                      | -                | 103.2 (7.1-249.2) | -                |
| Mayo score, mean (range)                | -                | -                 | 2.95 (0-9)       |
| Type of disease, no.                    | -                | -                 | -                |
| Ileitis/ileocolitis/colitis             | -                | 12/13/1           | -                |
| Proctitis/left-sided colitis/pancolitis | -                | -                 | 9/1/22           |
| Medications, no. (%)                    | -                | -                 | -                |
| 5-ASA/SASP                              | -                | 23 (88.5%)        | 41 (97.6%)       |
| Prednisolone                            | -                | 2 (7.7%)          | 2 (4.7%)         |
| AZA/6MP                                 | -                | 13 (50.0%)        | 11 (25.6%)       |
| Anti-TNF $\alpha$ antibody              | -                | 13 (50.0%)        | 4 (9.3%)         |

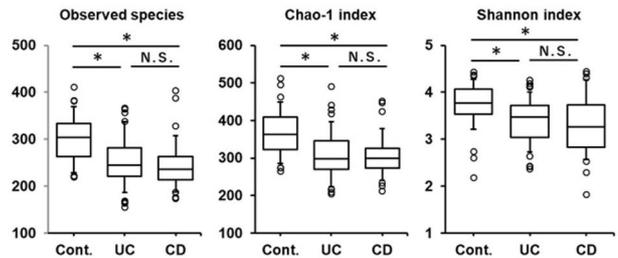
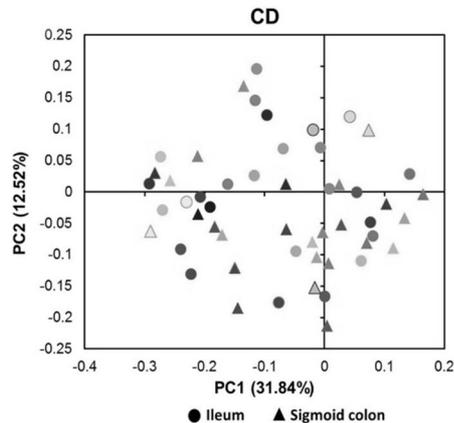
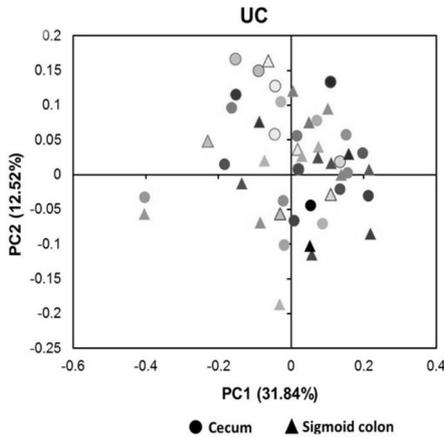
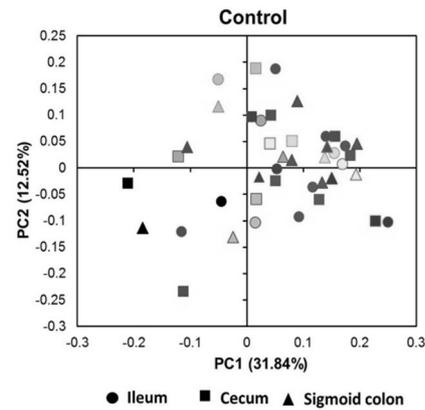
#### （2）部位別による粘膜関連細菌叢 （Control 群の 多様性）



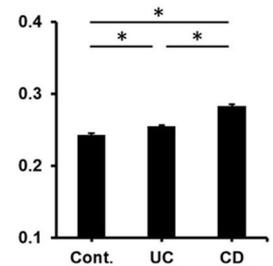
(3) Control 群、UC 群、CD 群での粘膜関連細菌叢の構成の解析



(control 群、UC 群、CD 群での 多様性)



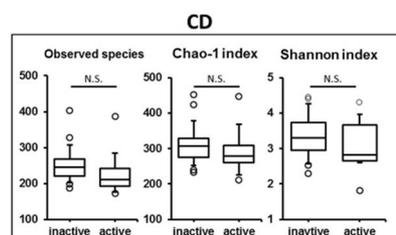
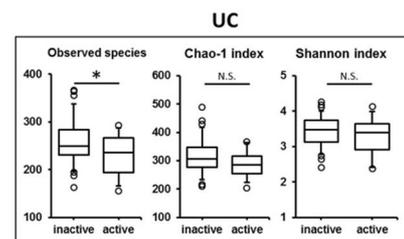
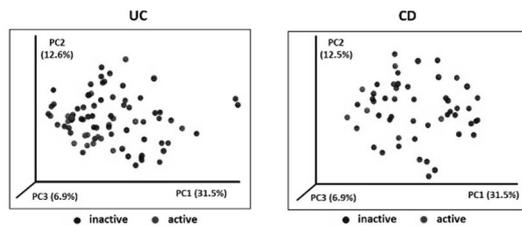
Weighted UniFrac distance



Control 群、UC 群、CD 群

における粘膜関連腸内細菌叢の構成に対して UniFrac 解析を行ったところ、これらの3群で粘膜関連細菌叢の構成は有意に異なっていた。

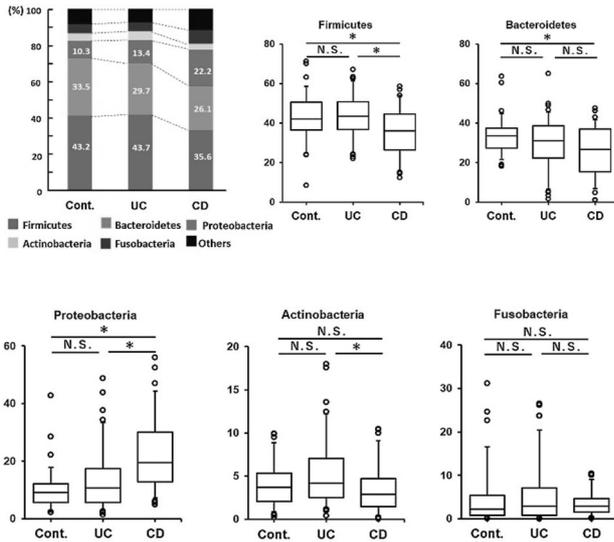
(4) 炎症部位および非炎症部位での検討



Control 群および UC 群、CD 群のいずれにおいても、同一個人内では部位別による腸内細菌叢の違いは認められなかった。

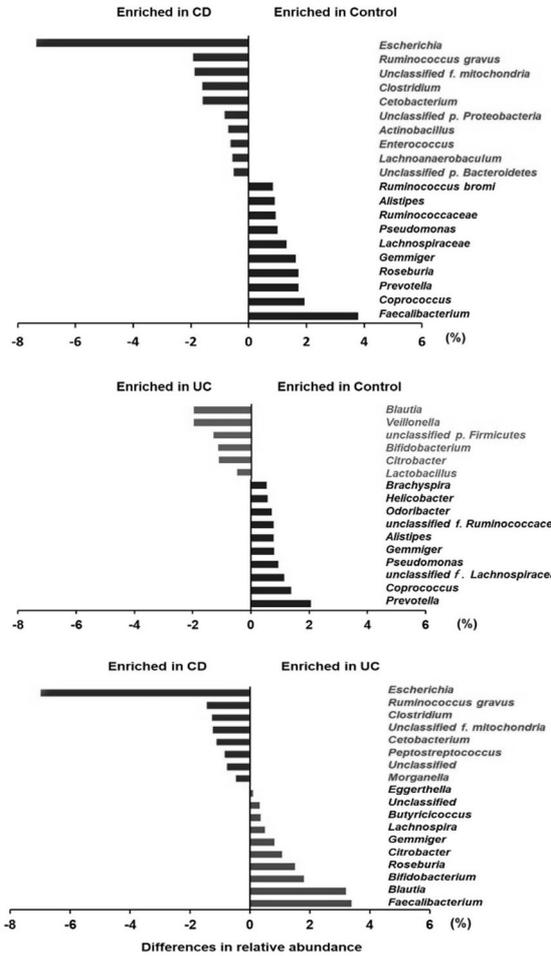
UC 群および CD 群における、炎症性と非炎症性部位における粘液関連細菌叢の解析では、両疾患とも炎症部位と非炎症部位では 多様性および多様性ともに有意差は認められなかった。

( 5 ) 粘膜関連細菌叢の門レベルでの解析



Control 群と UC 群および CD 群において、門レベルで粘膜内細菌叢の解析を行った。CD 群において Firmicutes 門は UC 群および Control 群と比較して有意に減少しており、UC 群と Control 群との比較では有意差は認められなかった。Bacteroidetes 門は、CD 群で有意な減少を認めた。それに対して Proteobacteria 門は CD 群において UC 群および Control 群と比較して有意に増加していた。Actinobacteria 門は CD 群において UC 群と比較して有意に減少していた。

( 6 ) 属レベルでの解析



Control 群と UC 群および CD 群において、属レベルで粘膜内細菌叢の解析を行った。

CD 群と Control 群との比較では、15 菌種で CD 群において有意な増加が認められ、40 菌種で有意な減少が認められた。Escherichia, Ruminococcus (R. gnavus)、Cetrobacterium、Actinobacillus および Enterococcus で有意な増加が認められ、Faecalibacterium, Coprococcus, Prevotella, Roseburia, Gemmiger, Alistipes、および Ruminococcus (R. bromii) で有意な減少が認められた。

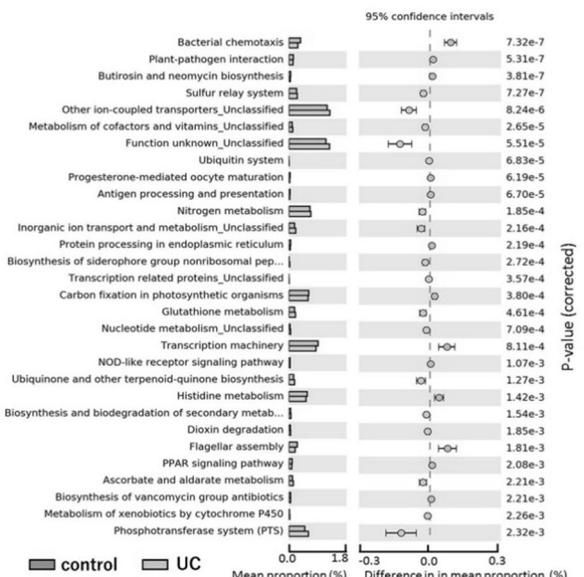
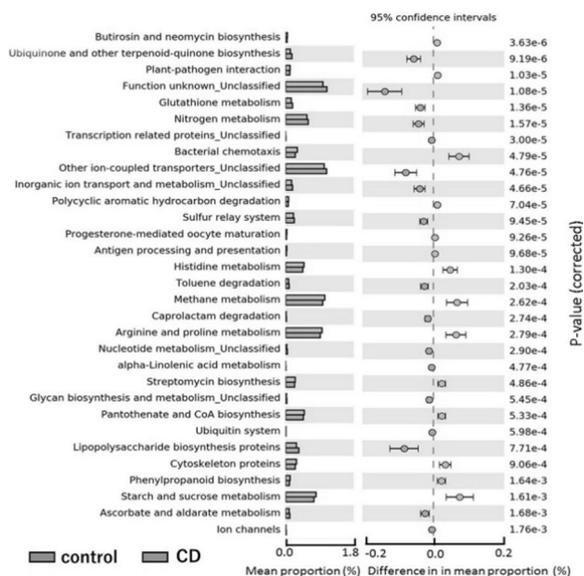
UC 群と Control 群との比較では、8 菌種で有意な増加が認められ、42 菌種で有意な減少が認められた。Blautia, Veillonella, Bifidobacterium, Citrobacter および Lactobacillus で有意な増加を認め、Prevotella, Coprococcus, Pseudomonas、および Alistipes の有意な減少が認められた。

UC 群と CD 群との比較では、Escherichia,

*Ruminococcus* (*R. gnavus*)、*Clostridium*、*Cetobacterium* および *Peptostreptococcus* が CD 群において有意な増加を認め、*Faecalibacterium*、*Blautia*、*Bifidobacterium*、*Roseburia* および *Citrobacter* が UC 群において有意な増加を認めた。

### (7) 粘膜内細菌叢の機能予測解析

PICRUSt software を用いて粘膜内細菌叢の機能の解析を行った。



CD 群と Control 群との比較では、ubiquinone およびその他の terpenoid-quinone biosynthesis、glutathione metabolism、nitrogen metabolism、ion-coupled transporter および lipopolysaccharide biosynthesis に関与する細菌の CD 群での有意な増加が認められた。

Bacterial chemotaxis、histidine metabolism、methane metabolism、starch および sucrose metabolism に関与する細菌が Control 群で有意な増加を認めた。

UC 群と Control 群との比較では、ion-coupled transporter、nitrogen metabolism および glutathione metabolism に関与する細菌の増加が UC 群において認められ、bacterial translocation、transcription machinery、histidine metabolism および flagellar assembly に関与する細菌が Control 群で増加を認めた。

### D. 考察

内視鏡下ブラシ粘液採取は、生検サンプル採取と比較して、非侵襲的であり、また解析サンプルにヒト DNA の混入が極めて少ないと考えられる。

粘膜関連細菌叢は、採取部位による相違は少なく、個々の細菌叢の特徴を有していた。また、UC 群と CD 群の炎症部位と非炎症部の粘膜関連細菌叢の検討においては、炎症部位と非炎症部位で細菌構成に有意な差は認められなかった。このことから、炎症性腸疾患における dysbiosis は、腸管炎症の結果生じた可能性よりも、IBD の病態形成において極めて重要な因子であることが示唆される。

CD 群の粘膜関連細菌叢では、非炎症性腸疾患および UC 群と比較して、炎症惹起性の細菌叢が増加しており、腸管保護的な細菌叢の減少が認められた。このことから、CD 群では、非炎症性腸疾患、また UC に比較してより炎症惹起性の腸内環境であることが示唆される。

PICRUSt software の細菌機能の解析では、IBD と非炎症性腸疾患との比較では、histidine 代謝の有意な減少が認められている。

Histidine は腸炎モデルに対して抗炎症に働くことが報告されていることから、IBD における histidine 代謝の減少は、腸管炎症に関与していることが考えられた。また、CD にお

いては、LPS biosynthesis pathway の有意な上昇が認められた。LPS は強力な免疫賦活物質であるため、CD では、腸内環境は炎症惹起性であることが示唆された。

#### E. 結論

IBD では、粘膜関連細菌叢に dysbiosis が認められた。さらに、CD と UC においても粘膜関連細菌叢に違いが認められた。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kusaka S, Nishida A, Takahashi K, Bamba S, Yasui H, Kawahara M, Inatomi O, Sugimoto M, Andoh A. Expression of human cathelicidin peptide LL-37 in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*. 2018 Jan;191(1):96-106. doi: 10.1111/cei.13047. Epub 2017 Sep 28. PubMed PMID: 28872665; PubMed Central PMCID:PMC5721246.
2. Takaoka A, Sasaki M, Nakanishi N, Kurihara M, Ohi A, Bamba S, Andoh A. Nutritional Screening and Clinical Outcome in Hospitalized Patients with Crohn's Disease. *Ann Nutr Metab*. 2017 Dec 14;71(3-4):266-272. doi: 10.1159/000485637. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29241167.
3. Hirai F, Andoh A, Ueno F, Watanabe K, Ohmiya N, Nakase H, Kato S, Esaki M, Endo Y, Yamamoto H, Matsui T, Iida M, Hibi T, Watanabe M, Suzuki Y, Matsumoto T. Efficacy of endoscopic balloon dilation for small bowel strictures in patients with Crohn's disease: A nationwide, multi-center, open-label, prospective cohort study. *J Crohns Colitis*. 2017 Nov 29. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx159. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29194463.
4. Naganuma M, Sugimoto S, Mitsuyama K, Kobayashi T, Yoshimura N, Ohi H, Tanaka S, Andoh A, Ohmiya N, Saigusa K, Yamamoto T, Morohoshi Y, Ichikawa H, Matsuoka K, Hisamatsu T, Watanabe K, Mizuno S, Suda W, Hattori M, Fukuda S, Hirayama A, Abe T, Watanabe M, Hibi T, Suzuki Y, Kanai T; INDIGO Study Group. Efficacy of Indigo naturalis in a Multicenter Randomized Controlled Trial of Patients with Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2017 Nov 22. pii: S0016-5085(17)36382-5. doi: 10.1053/j.gastro.2017.11.024. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29174928.
5. Bamba S, Nishida A, Imaeda H, Inatomi O, Sasaki M, Sugimoto M, Andoh A. Successful treatment by fecal microbiota transplantation for Japanese patients with refractory *Clostridium difficile* infection: A prospective case series. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017 Nov 5. pii: S1684-1182(17)30235-9. doi: 10.1016/j.jmii.2017.08.027. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29158082.
6. Park DI, Hisamatsu T, Chen M, Ng SC, Ooi CJ, Wei SC, Banerjee R, Hilmi IN, Jeon YT, Han DS, Kim HJ, Ran Z, Wu K, Qian J, Hu PJ, Matsuoka K, Andoh A, Suzuki Y, Sugano K, Watanabe M, Hibi T, Puri AS, Yang SK. Asian Organization for Crohn's and Colitis and Asia Pacific Association of Gastroenterology consensus on tuberculosis infection in patients with inflammatory bowel disease receiving anti-tumor necrosis factor treatment. Part 2: management. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017 Oct 10. doi:

- 10.1111/jgh.14018. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID: 29024102.
7. Park DI, Hisamatsu T, Chen M, Ng SC, Ooi CJ, Wei SC, Banerjee R, Hilmi IN, Jeon YT, Han DS, Kim HJ, Ran Z, Wu K, Qian J, Hu PJ, Matsuoka K, Andoh A, Suzuki Y, Sugano K, Watanabe M, Hibi T, Puri AS, Yang SK. Asian Organization for Crohn's and Colitis and Asia Pacific Association of Gastroenterology consensus on tuberculosis infection in patients with inflammatory bowel disease receiving anti-tumor necrosis factor treatment. Park 1: risk assessment. J Gastroenterol Hepatol. 2017 Oct 10. doi: 10.1111/jgh.14019. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID: 29023903.
  8. Ohno M, Nishida A, Sugitani Y, Nishino K, Inatomi O, Sugimoto M, Kawahara M, Andoh A. Nanoparticle curcumin ameliorates experimental colitis via modulation of gut microbiota and induction of regulatory T cells. PLoS One. 2017 Oct 6;12(10):e0185999. doi: 10.1371/journal.pone.0185999. eCollection 2017. PubMed PMID: 28985227; PubMed Central PMCID: PMC5630155.
  9. Nishino K, Nishida A, Inoue R, Kawada Y, Ohno M, Sakai S, Inatomi O, Bamba S, Sugimoto M, Kawahara M, Naito Y, Andoh A. Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. J Gastroenterol. 2017 Aug 29. doi: 10.1007/s00535-017-1384-4. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28852861.
  10. Fujii M, Nishida A, Imaeda H, Ohno M, Nishino K, Sakai S, Inatomi O, Bamba S, Kawahara M, Shimizu T, Andoh A. Expression of Interleukin-26 is upregulated in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2017 Aug 14;23(30):5519-5529. doi: 10.3748/wjg.v23.i30.5519. PubMed PMID: 28852311; PubMed Central PMCID: PMC5558115.
  11. Bamba S, Sasaki M, Takaoka A, Takahashi K, Imaeda H, Nishida A, Inatomi O, Sugimoto M, Andoh A. Sarcopenia is a predictive factor for intestinal resection in admitted patients with Crohn's disease. PLoS One. 2017 Jun 23;12(6):e0180036. doi: 10.1371/journal.pone.0180036. eCollection 2017. PubMed PMID: 28644887; PubMed Central PMCID: PMC5482469.
  12. Nishida A, Imaeda H, Ohno M, Inatomi O, Bamba S, Sugimoto M, Andoh A. Efficacy and safety of single fecal microbiota transplantation for Japanese patients with mild to moderately active ulcerative colitis. J Gastroenterol. 2017 Apr;52(4):476-482. doi: 10.1007/s00535-016-1271-4. Epub 2016 Oct 11. PubMed PMID:27730312.
  13. Asada A, Bamba S, Morita Y, Takahashi K, Imaeda H, Nishida A, Inatomi O, Sugimoto M, Sasaki M, Andoh A. The effect of CYP3A5 genetic polymorphisms on adverse events in patients with ulcerative colitis treated with tacrolimus. Dig Liver Dis. 2017 Jan;49(1):24-28. doi: 10.1016/j.dld.2016.09.008. Epub 2016 Sep 21. PubMed PMID: 27717793.
2. 学会発表  
西田淳史、今枝広丞、安藤 朗 ワークショップ5「腸内細菌を標的とした消化管疾患の治療と実際」潰瘍性大腸炎に対する糞便移植法の安全性および効果の検討 第103回日本消化器病学会総会（東京）2017年4月

20日

西野恭平、今枝広丞、酒井滋企、藤井 誠、森田幸弘、大野将司、高橋憲一郎、西田淳史、稲富 理、馬場重樹；辻川知之；杉本光繁；安藤 朗 クロウン病腸内細菌叢における *Clostridium hathewayi* の臨床的意義に関する検討 第103回 日本消化器病学会総会（東京）2017年4月21日

西田淳史、今枝広丞、馬場重樹、安藤 朗 シンポジウム13「臨床応用された腸内細菌研究の進歩」潰瘍性大腸炎に対する糞便移植法の効果と安全性の検討 第17回 日本抗加齢医学会総会（東京）2017年6月3日

西野恭平、西田淳史；井上 亮；酒井滋企、大野将司、高橋憲一郎、今枝広丞、稲富 理、馬場重樹；杉本光繁；内藤裕二；安藤 朗 炎症性腸疾患の mucosa-associated microbiota の検討 第54回 日本消化器免疫学会総会、第45回 日本臨床免疫学会総会 合同（東京）西野恭平、西田淳史、酒井滋企、大野将司、高橋憲一郎、今枝広丞、馬場重樹；杉本光繁；安藤 朗 内視鏡下ブラシで採取した腸管粘液を用いた炎症性腸疾患の

mucosa-associated microbiota の検討 第59回 日本消化器病学会大会（福岡）2017年10月12日

馬場重樹、西田淳史、今枝広丞、稲富 理；佐々木雅也；杉本光繁；安藤 朗 難治性 *Clostridium difficile* 腸炎・感染症に対する糞便細菌叢移植の有用性について 第59回 日本消化器病学会大会（福岡）2017年10月13日

西田淳史、今枝広丞、馬場重樹、安藤 朗 潰瘍性大腸炎術後回腸嚢炎に対する糞便移植法の安全性および効果の検討 第72回 日本大腸肛門病学会学術集会（福岡）2017年11月10日

西田淳史、今枝広丞、馬場重樹、安藤 朗 パネルディスカッション5「IBDに対する新しい治療とその応用」軽症～中等症潰瘍性大腸

炎に対する糞便移植法の安全性および効果の検討 第72回 日本大腸肛門病学会学術集会（福岡）2017年11月11日

馬場重樹、西田淳史、今枝広丞、稲富 理；佐々木雅也；杉本光繁；安藤 朗 難治性 *Clostridium difficile* 腸炎・感染症に対する糞便細菌叢移植について 第72回 日本大腸肛門病学会学術集会（福岡）2017年11月10日

西田淳史、今枝広丞、馬場重樹、安藤 朗 潰瘍性大腸炎術後回腸嚢炎に対する糞便移植法の安全性と有効性についての検討 第8回 日本炎症性腸疾患学会学術集会（東京）2017年12月1日

西野恭平、西田淳史；井上 亮；酒井滋企、大野将司、高橋憲一郎、今枝広丞、稲富 理、馬場重樹；杉本光繁；内藤裕二；安藤 朗 内視鏡ブラッシング法を用いた炎症性腸疾患における mucosa-associated microbiota の解析 第8回 日本炎症性腸疾患学会学術集会（東京）2017年12月1日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし