

日本人 IBD 患者の腸内真菌叢解析

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 が認められる。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、腸内細菌叢の dysbiosis のみならず、腸内真菌叢が炎症性腸疾患の病態に関与している事が報告された。本研究課題では、日本人の炎症性腸疾患の腸内真菌叢解析を検討することを目的とした。

共同研究者

井上 亮（京都府立大学生命環境科学研究科）

馬場 重樹（滋賀医科大学消化器内科）

西田 淳史（滋賀医科大学消化器内科）

（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。（29-256）

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、炎症性腸疾患の腸内真菌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）18 例、クローン病（CD 群）20 例、非炎症性腸疾患（Control 群）20 例から 58 サンプル採取した。

（サンプル採取）抗生剤や整腸剤などの腸内微生物に影響を及ぼす治療を受けていない対象者から便を回収した。便の DNA 抽出は、Quick Gene DNA tissue kits(Kurabo, Osaka, Japan)を用いて行った。

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

（真菌叢解析）Miseq を用いて ITS シークエンスを行った。

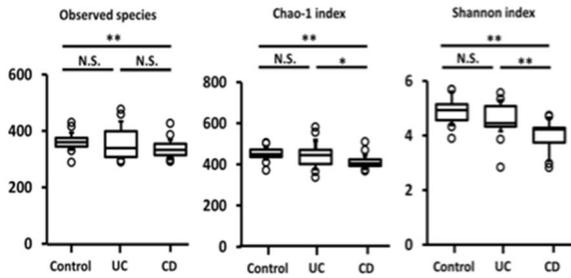
C. 研究結果

（1）対象患者

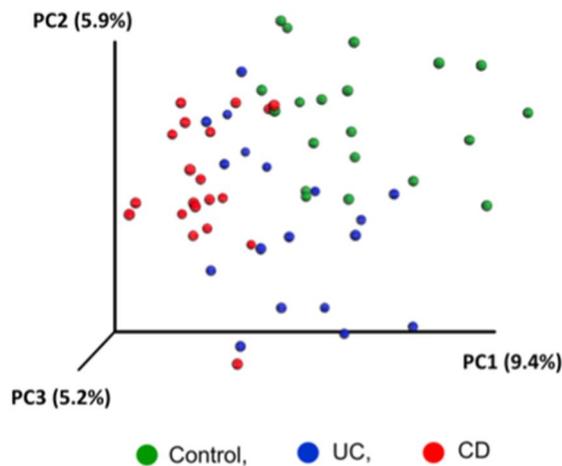
	HC (n = 20)	UC (n = 18)	CD (n = 20)
Female/male	7/13	7/11	7/13
Age (years) mean (range)	32.0 (23-47)	32.1 (20-65)	32.1 (20-58)
CDAI mean (range)	-	-	65.0 (12.0-147.1)
Mayo score, mean (range)	-	3.1 (1-5)	-
Type of disease (number)			
Ileitis/ileocolitis/colitis	-	-	7/10/3
Proctitis/left-sided colitis/pancolitis	-	9/6/3	-
Medications, number (%)			
5-ASA/SASP	-	17 (94.4)	17 (85)
Prednisolone	-	1 (5.6)	3 (15)
AZA/6-MP	-	5 (27.8)	8 (40)
Anti-TNF α antibodies	-	1 (5.6)	15 (75)

(2) Control 群、UC 群、CD 群による腸内細菌叢の構成の解析

(Control 群、UC 群、CD 群での 多様性)



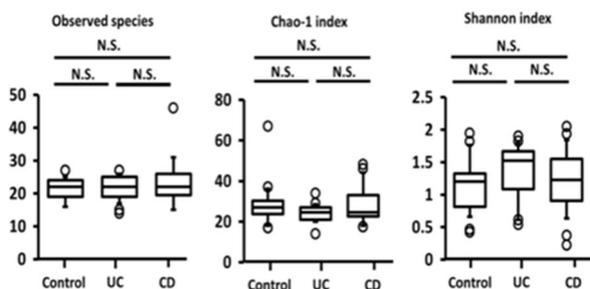
(Control 群、UC 群、CD 群での 多様性)



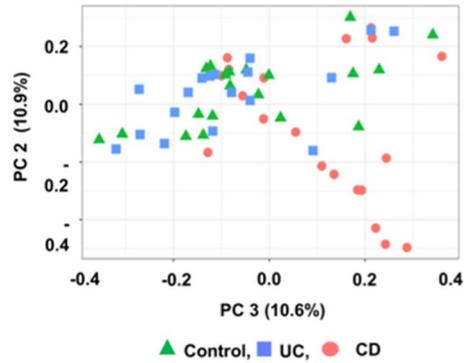
Control 群と比べて UC 群よりも CD 群において腸内細菌叢の違いを認めた。

(3) Control 群、UC 群、CD 群での腸内真菌叢の構成の解析

(Control 群、UC 群、CD 群での 多様性)

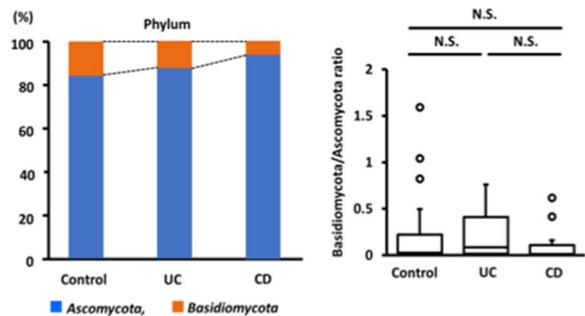


(Control 群、UC 群、CD 群での 多様性)



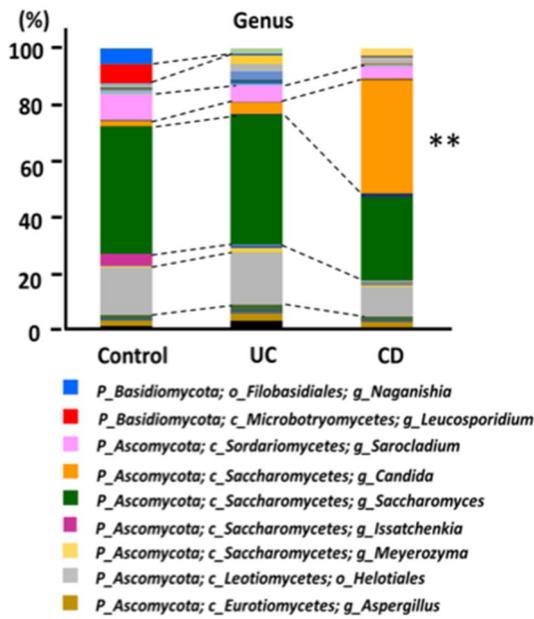
Control 群、UC 群、CD 群における腸内真菌叢の構成について、多様性では優位な差は認めなかったが、多様性の検討ではこれらの3群で腸内真菌の構成は有意に異なっていた。

(4) 腸内真菌叢の門および属レベルでの解析 (門レベルの解析)

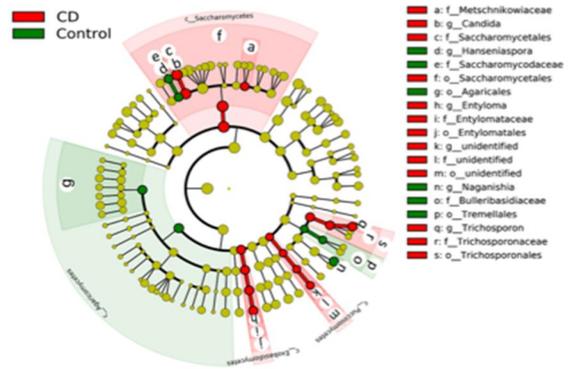


日本人の健常者の腸内真菌叢の構成は、Ascomycota 門が多数派を占め、次に Basidiomycota 門が多かった。Control 群と UC 群および CD 群において、門レベルでの解析では有意な差は認められなかった。

(属レベルの解析)



属レベルでの解析では、Control 群や UC 群と比較して CD 群において優位に *Candida* 属を多く認めた。



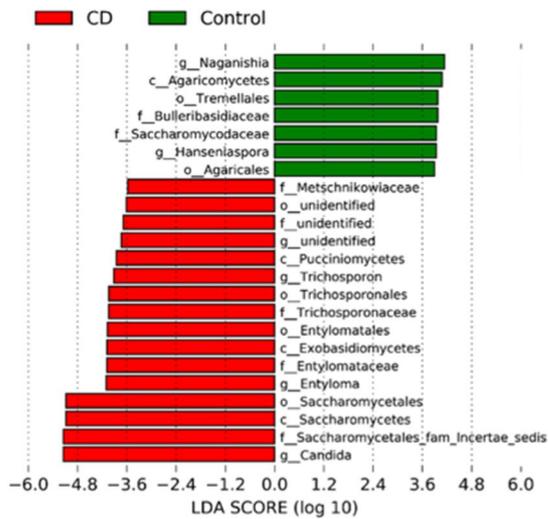
LEfSe(LDA Effect Size) での解析では、Control 群と CD 群を比較すると CD 群において *Candida*、*Entyloma* や *Trichosporon* が優位に増加を認めた。

(6) Control 群、UC 群、CD 群での属レベルでの解析

	HC	UC	CD
P. Ascomycota, C. Saccharomycetes, F. Dipodascaceae, G. Dipodascus	0	39*	10
P. Ascomycota, C. Saccharomycetes, F. Saccharomycodaceae, G. Hanseniaspora	30	6	0*
P. Basidiomycota, C. Agaricomycetes, F. Lyophyllaceae, G. Hypsizygus	35	0*	0*
P. Basidiomycota, C. Exobasidiomycetes, F. Entylomataceae, G. Entyloma	5	50*	30
P. Basidiomycota, C. Wallemiomycetes, F. Wallemiaceae, G. Wallemia	10	44	0*

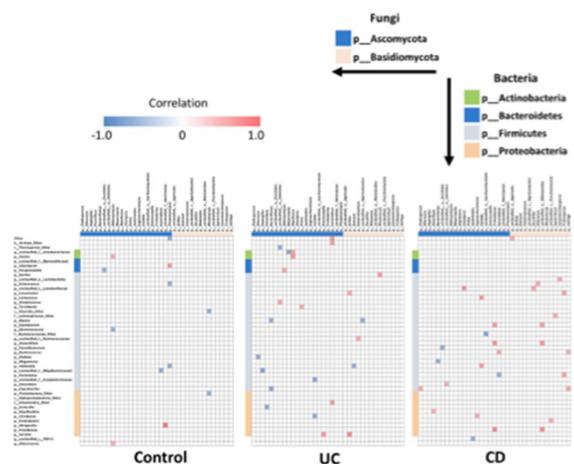
HC Healthy control, UC ulcerative colitis, CD Crohn's disease
*P < 0.05 compared to healthy control

(5) 腸内真菌叢の Control 群と CD 群の検討



Control 群と比較して UC 群で *Dipodascus* や *Entyloma* の有意な増加を認めた。これらの変化は CD でも認めたが、有意な差はなかった。一方 CD 群において *Hanseniaspora*、*Hypsizygus*、*Wallemia* は Control 群と比較して優位な減少を認めた。

(7) 腸内細菌叢と腸内真菌叢の関連性



腸内細菌叢および腸内真菌叢と関連性を示す目的に、Spearman's correlation を行い、関連

性を heatmap で示した。Control 群と比べて UC 群さらに CD 群でより細菌と真菌の相関が強い事がわかった。

D. 考察

日本人の腸内真菌叢は、門レベルでは欧米とは変わらないものの、属レベルでは欧米との違いを認めた。日本および欧米で共通に認められる属として *Saccharomyces* が挙げられる一方で、欧米では有意な *Debaryomyces* や *Penicillium* が日本人では認めず、*Sarocladium* や *Leucosporidium* は日本人でのみ認められた。この違いは、遺伝的背景、生理機能、食事、衛生環境などの影響によって生じていると考えられた。

腸内微生物叢は、UC 群よりも CD 群で Control 群と比較して細菌叢および真菌叢の違いを認めた。このことは既報と同様で、CD 群でより顕著に dysbiosis を認めた。また腸内細菌と腸内真菌との相関も、UC 群よりも CD 群で強く認められた。細菌および真菌を含めた dysbiosis が UC 群よりも CD 群で顕著に認められ、これらの結果は、欧米では UC 群、CD 群で共に Control 群と比較して dysbiosis を認めたが、日本人においては CD 群で dysbiosis を認める事が示せた。IBD の病態形成に細菌叢と真菌層の関連がある可能性が示唆された。

IBD 患者の真菌叢の解析では、*Basidiomycota* が少なく *Ascomycota* が多い傾向にあり、この変化は CD 群で強く認められた。しかし、欧米からの報告では、IBD では、*Basidiomycota* が多く *Ascomycota* が少ない傾向であった。さらに日本人の CD 群において *Candida* 属が優位な増加を認めたが、欧米では認められなかった。一方、*Saccharomyces* が欧米の IBD で優位に認められたが、日本では認められなかった。これらの結果から日本人と欧米人の IBD 患者において真菌の dysbiosis の構成はかなり異なっ

ている事が示された。これらの変化は、日本人と欧米人の真菌叢の違いによる可能性が考えられた。

E. 結論

日本人での腸内真菌叢は欧米と異なり、また IBD では、腸内真菌叢に dysbiosis 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. Takahashi K, Bamba S, Morita Y, Nishida A, Kawahara M, Inatomi O, Sugimoto M, Sasaki M, Andoh A. pH-Dependent 5-Aminosalicylates Releasing Preparations Do Not Affect Thiopurine Metabolism. Digestion. 2019 Jan 2;1-9. doi: 10.1159/000495690. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30602158
2. Sakai S, Nishida A, Ohno M, Inatomi O, Bamba S, Sugimoto M, Kawahara M, Andoh A. Ameliorating effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, on development of dextran sulfate sodium-induced murine colitis. J Clin Biochem Nutr 2018 Nov;63(3):217-223. doi: 10.3164/jcbrn.18-42. Epub 2018 Jun 8. PubMed PMID: 30487672; PubMed Central PMCID: PMC6252295
3. Imai T, Inoue R, Kawada Y, Morita Y, Inatomi O, Nishida A, Bamba S, Kawahara M, Andoh A. Characterization of fungal dysbiosis in Japanese patients with inflammatory bowel disease. J Gastroenterol. 2018 Nov 26. doi: 10.1007/s00535-018-1530-7. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30478724

4. Gotoda T, Takano C, Kusano C, Suzuki S, Ikehara H, Hayakawa S, Andoh A. Gut microbiome can be restored without adverse events after *Helicobacter pylori* eradication therapy in teenagers. *Helicobacter*. 2018 Dec;23(6):e12541. doi: 10.1111/hel.12541. Epub 2018 Oct 12. PubMed PMID: 30311721
5. Nakamura S, Imaeda H, Nishikawa H, Imuro M, Matsuura M, Oka H, Oku J, Miyazaki T, Honda H, Watanabe K, Nakase H, Andoh A. Usefulness of fecal calprotectin by monoclonal antibody testing in adult Japanese with inflammatory bowel diseases: a prospective multicenter study. *Intest Res*. 2018 Oct;16(4):554-562. doi: 10.5217/ir.2018.00027. Epub 2018 Oct 10. PubMed PMID: 30301337 PubMed Central PMCID: PMC6223455
6. Hisamatsu T, Kunisaki R, Nakamura S, Tsujikawa T, Hirai F, Nakase H, Watanabe K, Yokoyama K, Nagahori M, Kanai T, Naganuma M, Michimae H, Andoh A, Yamada A, Yokoyama T, Kamata N, Tanaka S, Suzuki Y, Hibi T, Watanabe M; CERISIER Trial group. Effect of elemental diet combined with infliximab dose escalation in patients with Crohn's disease with loss of response to infliximab: CERISIER trial. *Intest Res*. 2018 Jul;16(3):494-498. doi: 10.5217/ir.2018.16.3.494. Epub 2018 Jul 27. PubMed PMID: 30090050 PubMed Central PMCID: PMC6077314
7. Bamba S, Takahashi K, Imaeda H, Nishida A, Kawahara M, Inatomi O, Sugimoto M, Sasaki M, Andoh A. Effect of fermented vegetable beverage containing *Pediococcus pentosaceus* in patients with mild to moderate ulcerative colitis. *Biomed Rep*. 2018 Jul;9(1):74-80. doi: 10.3892/br.2018.1099. Epub 2018 May 18. PubMed PMID: 29930808 PubMed Central PMCID: PMC6007040
8. Kakuta Y, Kawai Y, Okamoto D, Takagawa T, Ikeya K, Sakuraba H, Nishida A, Nakagawa S, Miura M, Toyonaga T, Onodera K, Shinozaki M, Ishiguro Y, Mizuno S, Takahara M, Yanai S, Hokari R, Nakagawa T, Araki H, Motoya S, Naito T, Moroi R, Shiga H, Endo K, Kobayashi T, Naganuma M, Hiraoka S, Matsumoto T, Nakamura S, Nakase H, Hisamatsu T, Sasaki M, Hanai H, Andoh A, Nagasaki M, Kinouchi Y, Shimosegawa T, Masamune A, Suzuki Y; MENDEL study group. NUDT15 codon 139 is the best pharmacogenetic marker for predicting thiopurine-induced severe adverse events in Japanese patients with inflammatory bowel disease: a multicenter study. *J Gastroenterol*. 2018 Jun 19. doi: 10.1007/s00535-018-1486-7. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29923122 PubMed Central PMCID: PMC6132901
9. Koga A, Matsui T, Takatsu N, Takada Y, Kishi M, Yano Y, Beppu T, Ono Y, Ninomiya K, Hirai F, Nagahama T, Hisabe T, Takaki Y, Yao K, Imaeda H, Andoh A. Trough level of infliximab is useful for assessing mucosal healing in Crohn's disease: a prospective cohort study. *Intest Res*. 2018 Apr;16(2):223-232. doi: 10.5217/ir.2018.16.2.223. Epub 2018 Apr 30. PubMed PMID: 29743835 PubMed Central PMCID: PMC5934595
10. Kobayashi T, Hisamatsu T, Suzuki Y, Ogata H, Andoh A, Araki T, Hokari R,

Iijima H, Ikeuchi H, Ishiguro Y, Kato S, Kunisaki R, Matsumoto T, Motoya S, Nagahori M, Nakamura S, Nakase H, Tsujikawa T, Sasaki M, Yokoyama K, Yoshimura N, Watanabe K, Katafuchi M, Watanabe M, Hibi T. Predicting outcomes to optimize disease management in inflammatory bowel disease in Japan: their differences and similarities to Western countries. *Intest Res.* 2018 Apr;16(2):168-177. doi: 10.5217/ir.2018.16.2.168. Epub 2018 Apr 30. PubMed PMID: 29743830 PubMed Central PMCID: PMC5934590

2. 学会発表

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104回 日本消化器病学会総会（東京）平成30年4月20日

西野恭平、西田淳史、安藤 朗 シンポジウム1「臨床検体を用いたトランスレーショナルリサーチ」 炎症性腸疾患の新たな診断バイオマーカーとしての粘膜関連 Dysbiosis の検討 第104回 日本消化器病学会総会（東京）平成30年4月19日

安藤 朗 シンポジウム7「腸内微生物を用いた治療戦略の新展開」 炎症性腸疾患における Dysbiosis の特徴と糞便微生物移植法の現況 第38回 日本炎症・再生医学会（東京）平成30年7月12日

安藤 朗 教育講演 腸内細菌をめぐる最近のトピックス 日本消化器病学会東北支部第20回教育講演会（仙台）平成30年11月25日

西田淳史；井上 亮（京府大・生命環境）；杉谷義彦、大野将司、稲富 理；馬場重樹（滋医大・栄）；内藤裕二（京府医大・消内）；安藤 朗 成分栄養剤の腸内細菌に対する効果の検討 第16回 日本機能性食品医学学会（新潟）平成30年12月16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