

## 炎症性腸疾患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：炎症性腸疾患患者の糞便中の真菌叢を次世代シーケンサーを用いて解析することにより真菌叢の変化と病態との関連を明らかにした。日本人健常人の便中真菌叢は健常欧米人のそれと大きく構成が異なることがまず明らかになった。また、炎症性腸疾患、特にクローン病において真菌叢の構成が健常人と比較して統計学的な有意性をもって異なっていた。

### 共同研究者

井上 亮（京都府立大学 動物機能学研究室）

内藤 裕二（京都府立医科大学消化器内科）

### A. 研究目的

ヒト腸内微生物叢は、細菌だけでなく真菌やウイルス（バクテリオファージ）からなる。ヒトの糞便中真菌叢に関する報告はほとんどなく欧米人との差違についてもほとんど明らかになっていない。健常日本人の腸内真菌叢を解析するとともに、健常人と炎症性腸疾患患者の便中真菌叢の差について次世代シーケンサーを用いて検討した。

### 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 シーケンスを行った。

（真菌叢解析）Miseq を用いて ITS シーケ

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。（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。

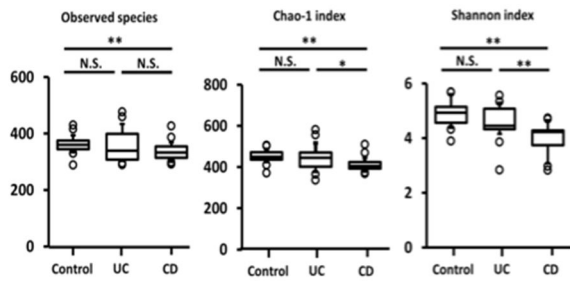
### C. 研究結果

#### （1）対象患者

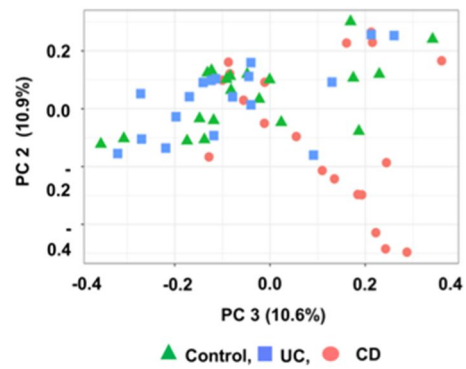
	HC (n = 20)	UC (n = 18)	CD (n = 20)
Female/male	7/13	7/11	7/13
Age (years) mean (range)	32.0 (23-47)	32.1 (20-65)	32.1 (20-58)
CDAI mean (range)	-	-	65.0 (12.0-147.1)
Mayo score, mean (range)	-	3.1 (1-5)	-
Type of disease (number)			
Ileitis/ileocolitis/colitis	-	-	7/10/3
Proctitis/left-sided colitis/pancolitis	-	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 $\alpha$ 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

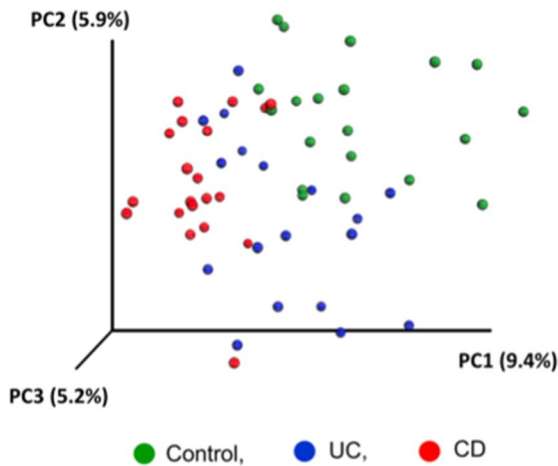
（control 群、UC 群、CD 群での 多様性）



(control 群、UC 群、CD 群での 多様性)

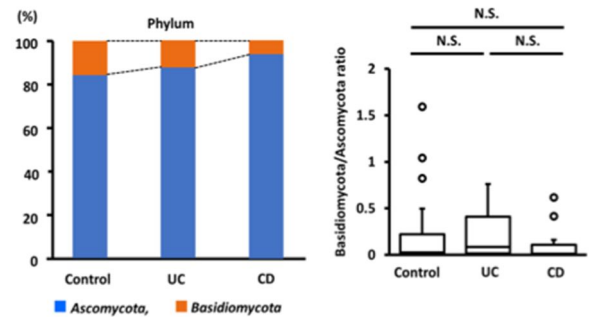


Control 群、UC 群、CD 群における腸内真菌叢の構成について、多様性の検討ではこれらの3群で腸内真菌の構成は有意に異なり、特にCD群で構成が大きく異なっていた。



(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)

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。

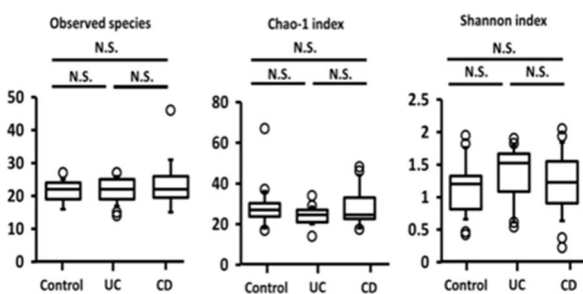


(3) Control 群、UC 群、CD 群での腸内真菌叢の構成の解析

日本人の健常者の腸内真菌叢の構成は、Ascomycota 門が最も多く、次に Basidiomycota 門が多かった。

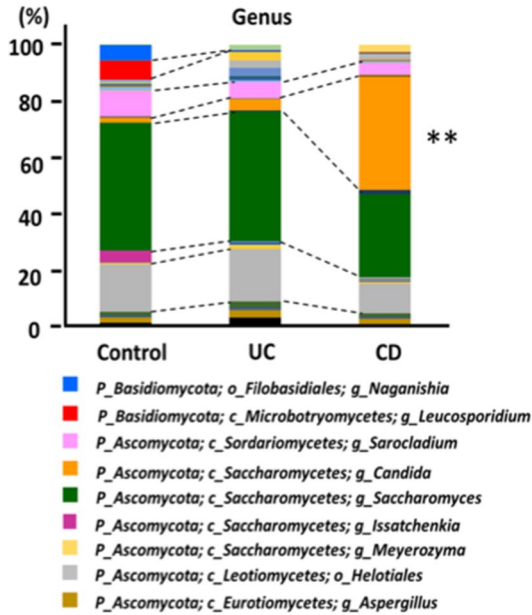
(control 群、UC 群、CD 群での 多様性)

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。



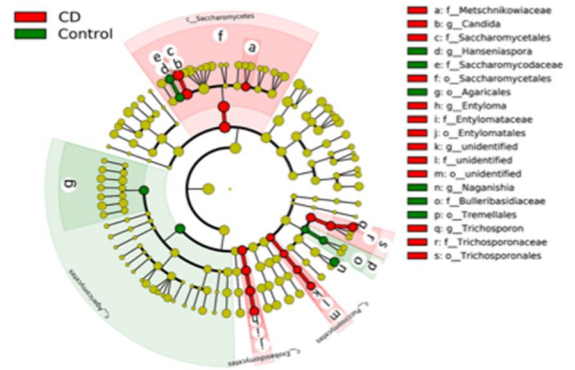
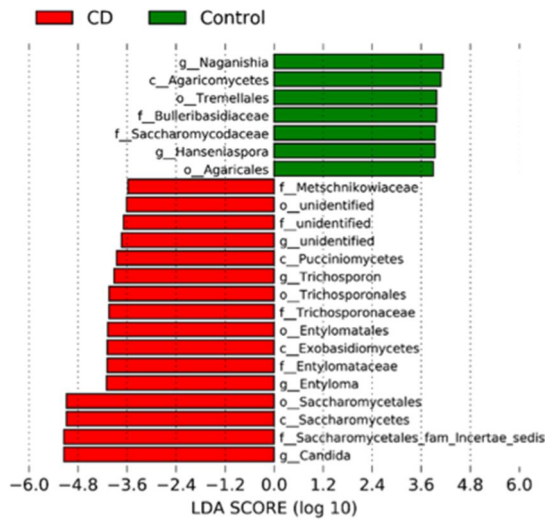
(属レベルの解析)

(control 群、UC 群、CD 群での 多様性)



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。

(5) 腸内真菌叢の Control 群と CD 群の検討



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。

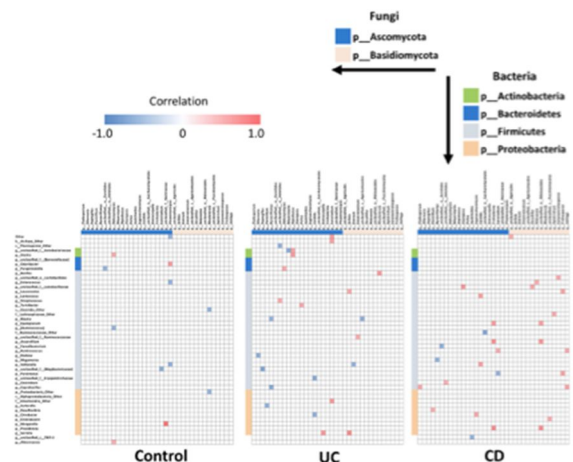
(6) Control 群、UC 群、CD 群での属レベルでの解析

	HC	UC	CD
<i>P_Ascomycota, C_Saccharomycetes, F_Dipodascaceae, G_Dipodascus</i>	0	39*	10
<i>P_Ascomycota, C_Saccharomycetes, F_Saccharomycodaceae, G_Hanseniaspora</i>	30	6	0*
<i>P_Basidiomycota, C_Agaricomycetes, F_Lyophyllaceae, G_Hypsizygos</i>	35	0*	0*
<i>P_Basidiomycota, C_Exobasidiomycetes, F_Entylomataceae, G_Entyloma</i>	5	50*	30
<i>P_Basidiomycota, C_Wallemiomycetes, F_Wallemiaceae, G_Wallemia</i>	10	44	0*

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

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*、*Hypsizygos*、*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

日本人の健常者の腸内真菌叢は、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が合わさ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。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叢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. [Andoh A.](#), Inoue R, Kawada Y, Morishima S, Inatomi O, Ohno M, Bamba S, Nishida A, Kawahara M, Naito Y. Elemental diet induces alterations of the gut microbial community in mice. *J Clin Biochem Nutr.* 2019 Sep;65(2):118-124. doi: 10.3164/jcbr.19-8. Epub 2019 Jul 19. PubMed PMID 31592206
2. Tatsumi G, Kawahara M, Imai T, Nishishita-Asai A, Nishida A, Inatomi O, Yokoyama A, Kakuta Y, Kito K, [Andoh A.](#) Thiopurine-mediated impairment of hematopoietic stem and leukemia cells in Nudt15R138C knock-in mice. *Leukemia.* 2019 Oct 24. doi: 10.1038/s41375-019-0583-9. [Epub ahead of print] PubMed PMID 31645647
3. Chatani M, Kishita M, Inatomi O, Takahashi K, Sugimoto M, Sonoda A, Kawahara M, Bamba S, Kito K, Kushima R, [Andoh A.](#) Severe Colitis with Portal Venous Gas Caused by *Brachyspira pilosicoli* Infection. *Intern Med.* 2019;58(23):3409-3413.

doi: 10.2169/internalmedicine.3254-19. Epub 2019 Dec 1. PubMed PMID 31787630

4. Morita Y, Imai T, Bamba S, Takahashi K, Inatomi O, Miyazaki T, Watanabe K, Nakamura S, Yoshida A, Endo Y, Ohmiya N, Tsujikawa T, Andoh A. Clinical relevance of innovative immunoassays for serum ustekinumab and anti-ustekinumab antibody levels in Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec 20. doi: 10.1111/jgh.14962. [Epub ahead of print] PubMed PMID 31860733
5. Sugitani Y, Nishida A, Inatomi O, Ohno M, Imai T, Kawahara M, Kitamura K, Andoh A. Sodium absorption stimulator prostasin (PRSS8) has an anti-inflammatory effect via downregulation of TLR4 signaling in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2020 Jan 8. doi: 10.1007/s00535-019-01660-z. [Epub ahead of print] PubMed PMID 31916038
6. Bamba S, Sakemi R, Fujii T, Takeda T, Fujioka S, Takenaka K, Kitamoto H, Umezawa S, Sakuraba H, Inokuchi T, Fukata N, Mizuno S, Yamashita M, Shinzaki S, Tanaka H, Takedatsu H, Ozaki R, Moriya K, Ishii M, Kinjo T, Ozeki K, Ooi M, Hayashi R, Kakimoto K, Shimodate Y, Kitamura K, Yamada A, Sonoda A, Nishida Y, Yoshioka K, Ashizuka S, Takahashi F, Shimokawa T, Kobayashi T, Andoh A, Hibi T. A nationwide, multi-center,

retrospective study of symptomatic small bowel stricture in patients with Crohn's disease. *J*

*Gastroenterol*. 2020 Jan 27. doi: 10.1007/s00535-020-01670-2. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31989252

## 2.学会発表

1. 高橋憲一郎；馬場重樹（滋医大・栄）；村田雅樹、西田淳史、稲富 理；佐々木雅也（同・栄）；杉本光繁（同・光診）；安藤 朗 当院クローン病患者の粘膜治癒達成と長期経過 第105回 日本消化器病学会総会（金沢） 令和1年5月9日
2. 杉谷義彦（滋医大・消内／草津総合病院・消内）；西田淳史、森田康大、米倉伸彦、今井隆行、酒井滋企、西野恭平、大野将司、稲富 理；馬場重樹（滋医大・栄）；杉本光繁（同・光診）；安藤 朗 プレナリーセッション「IBD」 炎症性腸疾患におけるプロスタシン（PRSS8）の機能解析 第105回 日本消化器病学会総会（金沢） 令和1年5月11日
3. 安藤 朗 ポストグラデュエイトコース I 基礎研究 炎症性腸疾患の病態と腸内細菌の関わり 第105回 日本消化器病学会総会（金沢） 令和1年5月11日
4. 高橋憲一郎；馬場重樹（滋医大・栄）；村田雅樹、大野将司、杉本光繁；佐々木雅也（同・栄）；辻川知之（東近江総医セ）；安藤 朗 クローン病患者の粘膜治癒の臨床的意義について 第57回 日本小腸学会学術集会（大阪） 令和1年11月9日

5. 大野将司（滋医大・消内ノミシガン大・病理）安藤 朗；猪原直弘（ミシガン大・病理） 遺伝子組み換え大腸菌のプロバイオティクスへの応用 第10回 日本炎症性腸疾患学会学術集会（福岡） 令和1年11月29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