

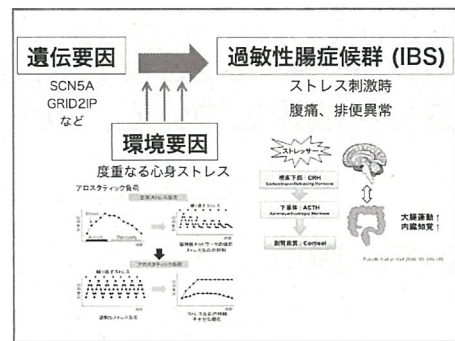
過敏性腸症候群症状出現メカニズムの多層関連解析

東北大学東北メディカル・メガバンク機構人材育成部門

田中 由佳里

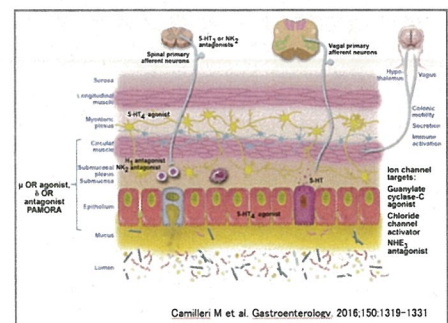
1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome: IBS) は、消化管の運動や知覚異常を呈する機能的消化管疾患である。心理社会的ストレスがIBSの発症に関連するとされ、ストレスを感じる脳と、その脳の刺激を受け症状を呈する消化管について解明が進んできている。IBSは週に1回以上の突然の腹痛と便秘、その際の便性状変化を主症状とし、成人の約15%程度にみられる。度重なるストレス等、心理社会的因子が密接に関与しており、脳腸相関の解明がIBS克服の鍵である¹。IBS患者は腹痛症状出現時に便意が強いため、病院に受診することは多くはない。そのため受診時は、症状を呈しておらず、その際の血液一般検査や腹部レントゲン・CT、消化管内視鏡検査では異常を呈さない。一方、生命予後は良いものの、繰り返される症状によって患者の日常生活に対する苦痛は強く、quality of life (QOL) の障害が強いことが報告されている。



我々はストレスの鍵物質である副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) がIBSの内臓刺激時脳機能に影響を及ぼし、大腸知覚-自律神経-脳扁桃体ネットワークの応答が健常者と異なることを見出した²。更に交感神経活動が健常者と異なることを発見した。申請者らは、既にIBS全ゲノムパイロット研究で、中枢神経・腸管神経叢に共に発現する新規遺伝子候補を得はじめてている。

一方、IBS患者の日常生活における症状出現時の病態は解明されていない。腸内細菌が炎症ならびにストレス情報処理への影響が示唆されてきている。申請者らは、IBS患者便の16SリボソームRNA (16SrRNA) 定量で、LactobacillusとVeillonellaの増加を見出し、菌叢代謝物である短鎖脂肪酸量の差異を見出した³。中でも酪酸は交感神経にも受容体が存在しており、短鎖脂肪酸受容体GPR41を介して交感神経を刺激することが示唆されている。更に、口腔内細菌叢が自己免疫性疾患などへの関連も指摘されてきている。ストレス自覚時に唾液中コルチゾールが上昇するなど、口腔内環境はストレスとも密接な関係にあるが、これまでに殆ど報告がない。腸内と口腔内細菌叢が疾患特異的に重複し、更に治療後に部分的に変化することが示されるなど⁴、多部位の細菌叢ネットワークの疾患発現への影響が示唆されている。しかし、IBSにおいて日常生活中における腹部症状出現時に、特異的に変化する細菌叢ならびに代謝産物、宿主-細菌叢相関は不明である。近年、動的物質である腸内細菌叢と、静的物質であるゲノムの関連について、大腸がん患者で疾患関連ゲノムSNP数と腸内細菌叢の関連も示唆されている。IBSでは欧米のゲノムコホート研究により、イオンチャネル関連部位、神経伝達物質受容体関連SNP異常などが示唆されているが、慢性的なストレス刺激に対する、動的-静的物質間の変性過程、脆弱部位など多層間関連は不明である。



IBSの症状発現において、腸内細菌叢を軸とした、症状トリガー出現時に生じる、菌叢の転写活性変化、それらの機能発現経路、さらに宿主代謝産物やゲノムとの関連について、症状出現、非出現

時の便細菌叢と代謝物や自律神経の動的変化、そして遺伝子背景との関連を観察する。

2. 方法

1. 下痢型IBSに対する、IBS腹部症状に関連する便- 口腔内細菌叢の解析

本研究では、IBS患者において、IBS症状出現時において、口腔内・腸管内環境に異常が生じる機序を主に細菌叢を調べる。健常者、下痢型IBS患者(全員男性)を対象とした。内科専門医が身体診察、血液検査を行い、IBSはRome III基準にて診断した。歯科医師がう歯や歯周病など口腔環境を診察した。被験者は通常排便時の便、口腔内プラーク、唾液を採取した。更にIBS患者は、症状出現時に同様の方法で検体を採取した。尚、便は貯蔵水のコンタミネーションを防ぐキットを使用して採便した。

(a) 便、口腔内細菌叢 16SrRNA 解析を用いた細菌叢の解析

共同研究者らは口腔内プラークを用いたDNA抽出技法、ならびに次世代シーケンサー(Illumina Miseq)による細菌叢解析の系を確立している(Yamagishi J. PLoS ONE 2016)。口腔内プラークのサンプリング条件について、時間や食事の影響なども検証が済んでいる。サンプルから16SリボソームDNAを抽出し、V4領域についてイルミナMiseqを用いたシーケンスを行い、配列を決定した。得られた配列を用いて、健常者とIBS患者群、IBS症状出現時で有意に増減する細菌叢を調べる。尚、統計解析にはR(vegan)を用いて行った。

2. 下痢型IBSに特徴的なIBS関連既報SNP解析

被験者からの血液検体よりバフィーコートを採取し、DNAを抽出した。日本人の遺伝子をマッピングした、ジャポニカアレイ(V2、東芝)を用いて遺伝子型を決定、解析した。ジャポニカアレイ(V2)では、国内外で既報のIBS関連SNPについて追加搭載されたものである。ジェノタイプは全検体において解析品質を満たしていた。同一人物の重複、近親検体がないことを確認して解析を行った。V2アレイでのIBS関連既報SNPについてそれぞれ、IBSの有無について重回帰解析を行った。

3. 結果 研究成果

被験者は健常男性40名、下痢型IBS男性43名であった。尚、両群において、IBSの症状程度を表すIBSSIスコア、特性不安(STAI-trait)スコアで有意差は認められた。(下表)

	IBS (n=43)	HC (n=40)	P Value
age	21.8 ± 1.7	22.1 ± 1.3	.481
IBSSI	188.7 ± 65.4	38.0 ± 38.7	<.001
STAI-state	41.2 ± 10.1	38.0 ± 38.7	.086
STAI-trait	46.7 ± 8.4	41.2 ± 9.0	.005
SDS	37.8 ± 6.6	35.2 ± 7.3	.086

1. 下痢型IBSに対する、IBS腹部症状に関連する便- 口腔内細菌叢

a) 細菌叢の多様性

健常者群、IBS通常排便時群、IBS腹痛時群について、便、歯垢、唾液の細菌叢OTUを用いて多様性を調べた。 α 多様性について、Chao1指標では便細菌叢について健常者群とIBS通常時群、IBS通常時群と腹痛時群でそれぞれ有意差を認められた。Shannon指標では歯垢について、健常者群とIBS通常時群で有意差を認められた。 β 多様性においては、歯垢の健常者群とIBS通常時群、並びに腹痛時群で有意群間差を認められた。

b) 各検体採取部位内での、群間で異なっていた細菌叢

便：健常者群はIBSの通常排便時には比して、*Bacteroides*属X種や*Porphyromonadaceae*属Y種が多く見られた。更に、IBSの通常排便時と腹痛出現時の糞便細菌叢の比較では、腹痛出現時に細菌X、*Ruminococcus*属Y種などについて有意増加を認められた。

歯垢：健常者群と比較してIBS群で有意増加の菌が多く見られた。*Prevotella*属のOTUや*Neisseria*属

などを複数有意増加を認めた。一方、IBS 腹痛症状出現時と通常時の比較で、有意細菌種は認めなかった。唾液： IBS 通常排便時群では健常者群とくらべて有意に、*Streptococcus* 属 X などの有意増加の菌種を複数認めた。IBS の腹痛出現時では通常時に比べて、*Fusobacterium* 属 Y などの有意増加を認めた。

2. 下痢型 IBS に特徴的な、既報 IBS 関連 SNP 部位の解析

既に創薬にも応用されている、遺伝子 X の SNP について、 $p = 0.0002$ 、オッズ比 1.8 と有意差を認めた。それ以外については、有意差を認めなかった。

4. 考察 まとめ

今回我々の研究において、健常者とIBSにおいて、構成細菌叢が異なること、更にIBSの症状出現、非出現時で菌叢が異なっていることを見出した。消化管のみならず、口腔内でも変化が生じていた。IBS症状時の便中で有意に増加していた細菌Aは、IBS患者では健常者より減少との報告がある。細菌Aは酪酸酸性を行うとされる。一方、IBSでは酢酸増加が報告されており、消化管粘膜周辺環境が易刺激性に傾く可能性が示唆されていた。今回、IBSの有症状時に増えた理由として、大腸粘膜からの水分放出、または吸収低下により粘膜表面環境が変化して、細菌Aが剥がれやすくなった可能性なども考えられる。今回は16Sリボソーム解析のみのため、これらが死菌なのか、症状出現時の転写活性を有していたかは評価できなかったが、今後詳細解析が必要である。

遺伝子解析結果について、本邦の遺伝子背景により合致したIBS関連SNPのreplicationについて報告はない。既に創薬化されている薬剤について、臨床現場では効果が出すぎるケースも問題となっていた。本研究結果を併せ考えると、遺伝子XがSNPか否かで、最適薬量を調整できる可能性もあり、今後さらなる研究が必要である。また本研究では、被験者総数が少なかったため、ゲノムワイド解析までは至っていないが、今後被験者数が増えた段階で大規模解析を行う予定である。

本研究により、IBS症状出現時には消化管細菌叢に変化が生じていること、背景に遺伝的要因も関連している可能性が示唆されることを見出した。今後、これらの各層の情報を縦断的に解析し疾患発現ネットワークの解明を目指す。

5. 発表論文、参考文献

- 1) Tanaka Y, Kanazawa M, Fukudo S, Drossman DA. Biopsychosocial model of irritable bowel syndrome. *J Neurogastroenterol Motil.* 2011;17:131-139.
- 2) Tanaka Y, Fukudo S, et. al. Differential Activation in Amygdala and Plasma Noradrenaline during Colorectal Distention by Administration of Corticotropin-Releasing Hormone between Healthy Individuals and Patients with Irritable Bowel Syndrome. *PLoS One.* 2016;11:e0157347.
- 3) Tana C, Fukudo S, et. al. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2010;22:512-519.
- 4) Zhang X, Wang J, et. al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat Med.* 2015;21:895-905.