

氏 名 西野 恭平

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士甲博士第 841 号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

学 位 授 与 年 月 日 平成 3 1 年 3 月 8 日

学 位 論 文 題 目 Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease.

(炎症性腸疾患患者における粘膜関連細菌叢の検討)

審 査 委 員 主査 教授 西 英一郎

副査 教授 村田 喜代史

副査 教授 遠山 育夫

論文内容要旨

※整理番号	848	(ふりがな) 氏 名	にし の きょうへい 西野 恭平
学位論文題目	Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. (炎症性腸疾患患者における粘膜関連細菌叢の検討)		
<p>【目的】</p> <p>近年の DNA シークエンシング技術の革新的進歩により、数百兆個の細菌から構成されるヒト腸内細菌叢の集合ゲノムの網羅的で高速な解析が可能となった。それによって、ヒト腸内細菌叢の基本的な全体構造や機能、食事などの環境因子による影響や様々な疾患における腸内細菌叢の構成と機能の異常“dysbiosis”が明らかとなってきた。炎症性腸疾患(IBD)においても dysbiosis がその病態に関与していると考えられている。これまでの多くの研究では、糞便中の細菌叢を対象として解析が行われてきた。しかしながら、糞便中の細菌叢よりも腸管粘液、粘膜内に潜む細菌叢である粘膜関連細菌叢が宿主免疫により大きな影響を与えることが示唆されている。今回我々は、内視鏡下に消化管ブラシを用いて腸管粘液を採取し、IBD における粘膜関連細菌叢の解析を行った。</p> <p>【方法】</p> <p>当院で下部消化管内視鏡検査を行った潰瘍性大腸炎(UC)患者 43 例、クローン病(CD)患者 26 例、健常人 14 例を対象とした。下部消化管内視鏡施行時に、消化管ブラシ(CCB-7-240-3-S、COOK 社)を用いて粘液(合計 174 サンプル)を採取した。採取部位は、回腸末端、盲腸および S 状結腸とした。DNA 抽出は QIAamp UCP Pathogen Mini Kit (QIAGEN 社)を用い、ビーズ法を併用して抽出した。細菌叢の解析は、次世代シーケンサーを用いて 16S rRNA 遺伝子領域のシーケンスにより行った。</p> <p>【結果】</p> <p>採取部位別での検討を行ったところ、健常人、UC および CD とも採取部位(回腸末端、盲腸および S 状結腸)による細菌構成に有意差は認められなかった。一方で、同一患者では採取部位に関わらず細菌構成が近く、個人ごとに個人を特徴づける細菌構成を持つと考えられた。α 多様性については健常人、UC および CD とも採取部位による有意差は認められなかった。</p> <p>次に疾患別に検討を行ったところ、健常人、UC および CD の間では、細菌構成に有意差が認められた。また、CD と健常人の細菌構成の違いは、UC と健常人の細菌構成の違いより著明であった。α 多様性については UC および CD では、健常人と比較して有意に低下していた。</p> <p>細菌構成の違いを門レベルで比較すると、CD では健常人と比較して Proteobacteria が有意に増加</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2 千字程度でタイプ等を用いて印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

しており、Firmicutes と Bacteroidetes の有意な減少が認められた。細菌構成の違いを属レベルで検討すると、CD では健常人と比較して、*Escherichia*、*Ruminococcus* (*R. gnavus*)、*Cetobacterium*、*Actinobacillus* および *Enterococcus* で有意な増加を認め、*Faecalibacterium*、*Coprococcus*、*Prevotella* および *Roseburia* で有意な減少が認められた。CD と UC の属レベルでの比較では、CD において *Escherichia*、*Ruminococcus* (*R. gnavus*)、*Clostridium*、*Cetobacterium*、*Peptostreptococcus* が有意に多く存在し、UC においては *Faecalibacterium*、*Blautia*、*Bifidobacterium*、*Roseburia* および *Citrobacter* が有意に多く存在した。Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUST)ソフトウェアを用いて予測される細菌叢の機能解析を行うと、CD において健常人と比較して lipopolysaccharide(LPS)合成経路の発現上昇を認めた。

【考察】

今回、我々は内視鏡下に消化管ブラシを用いて腸管粘液を採取し、粘膜関連細菌叢の検討を行った。これまでの粘膜関連細菌叢の研究の多くは生検鉗子を用いた粘膜生検によるものである。しかし、粘膜生検には予期せぬ出血リスクがあり、また、サンプルの大部分はヒト組織であることよりシーケンズの結果に影響を与える可能性も考えられる。その点で、消化管ブラシを用いて粘液を採取することは、低侵襲であり、ヒト組織の混入を減らすことができるという利点がある。また、下部消化管内視鏡を用いたことで同一患者の複数の部位からサンプルを採取することが可能であった。採取部位別での検討では、採取部位による細菌構成に有意差は認められなかった。一方で同一患者では検体採取部位に関わらず細菌構成が近く、個人毎に個人を特徴づける細菌構成を持つことが明らかとなった。

疾患別の比較では、粘膜関連細菌叢においても IBD 患者では健常人と異なる細菌構成、多様性の低下を認め、その変化は UC よりも CD で著明であった。CD と健常人における細菌構成の属レベルでの比較では、CD において *Escherichia*、*Ruminococcus* (*R. gnavus*) などの炎症を惹起しうる菌の有意な増加を認め、*Faecalibacterium*、*Coprococcus*、*Roseburia* など腸管において保護的な役割を担うと考えられる酪酸産生菌の有意な減少を認めた。さらに CD と UC における細菌構成の属レベルの比較では、CD と健常人との比較の場合と同様に CD において *Escherichia*、*Ruminococcus* (*R. gnavus*) などの炎症を惹起しうる菌が多く存在し、UC において *Faecalibacterium*、*Blautia*、*Bifidobacterium*、*Roseburia* など腸管において保護的に働くとされる菌が多く存在し、CD の方が UC よりも細菌叢として炎症を惹起しやすい細菌構成であると考えられた。さらに、PICRUST ソフトウェアを用いた細菌叢の機能解析では CD において健常人と比較して LPS 合成経路の発現上昇を認めた。LPS はグラム陰性桿菌に由来する宿主の免疫反応を誘導する内毒素であり、細菌叢の機能解析からも CD の細菌叢は炎症を惹起しやすい状態であることが示唆された。

【結論】IBD 患者では、粘膜関連細菌叢において dysbiosis が認められた。また、粘膜関連細菌叢の解析を行うことで、CD と UC の鑑別診断ができる可能性が示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	8 4 8	氏 名	西野 恭平
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと</p> <p>本論文では、炎症性腸疾患（IBD）患者を対象として、内視鏡下に消化管ブラシを用いて腸管粘液を採取し、次世代シーケンサーを用いて粘膜関連細菌叢の解析を行い、以下の点を明らかにした。</p> <p>1) 16S rRNA 遺伝子領域の配列情報から得られた粘膜関連細菌叢の解析結果から、その細菌構成は、同一個人内では採取部位に関わらず類似した構成を示した。一方で、個人間では個人ごとに異なる細菌構成を示した。</p> <p>2) IBD 患者では、炎症粘膜と非炎症粘膜における粘膜関連細菌叢の構成に有意な差は認めなかった。</p> <p>3) 健常人との比較では、IBD の粘膜関連細菌叢の構成は異なっており、特にクローン病においては顕著な違いを認めた。</p> <p>4) クローン病の粘膜関連細菌叢は、健常人および潰瘍性大腸炎患者と比較して、<i>Faecalibacterium</i> の減少および <i>Escherichia</i> の増加が認められた。</p> <p>5) PICRUST ソフトウェアを用いて細菌叢の機能解析を行ったところ、クローン病においてリポポリサッカライド合成経路の発現上昇を認めた。</p> <p>本論文は、炎症性腸疾患患者の粘膜関連細菌叢について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士（医学）の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 544 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 31 年 1 月 29 日)</p>			