

氏 名 今井 隆行

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士甲第 869 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 令和 2 年 3 月 1 0 日

学 位 論 文 題 目 Characterization of fungal dysbiosis in Japanese patients with inflammatory bowel disease

(炎症性腸疾患患者における腸内真菌叢の特徴)

審 査 委 員 主査 教授 谷 眞至

副査 教授 久津見 弘

副査 教授 伊藤 俊之

## 論文内容要旨

※整理番号	878	(ふりがな) 氏名	いまい たかゆき 今井 隆行
学位論文題目	Characterization of fungal dysbiosis in Japanese patients with inflammatory bowel disease (炎症性腸疾患患者における腸内真菌叢の特徴)		
<p>【目的】潰瘍性大腸炎やクローン病を代表とする炎症性腸疾患（以下 IBD）は原因不明の慢性再燃性消化管炎症疾患である。IBD の病因としては、細菌やウイルスなどの感染性因子、環境因子、遺伝因子、炎症に対する粘膜免疫の不均衡などが考えられているが、いまだに明らかではない。近年 IBD 患者は増加し、30 年前と比べて IBD の罹患者数は 10 倍近く増加している。その原因としては社会環境の変化(衛生環境の変化、抗生物質の使用などの医療環境の変化など)が日本人の腸内細菌の成立の段階で影響を及ぼし、さらに食事の欧米化(低食物繊維, 高脂肪)や食品添加物などの環境因子が加わって腸内細菌叢の変化につながり、IBD 増加の一因になっている可能性が指摘されている。IBD 患者において腸内細菌叢は健常人と異なり、多様性の低下や構成菌叢の変化 (dysbiosis) を認めている。しかし、腸内環境は腸内細菌のみならず、真菌やウイルスや宿主の相互関係から成り立つものであり細菌のみの解析では限界があると考えられる。近年次世代シーケンサーの登場により、今まで分離培養が困難であった真菌などの検討も可能になってきた。そういった背景から我々は、腸内真菌と IBD の関係についても明らかにすることとした。</p> <p>【方法】当院受診中の方で抗菌薬治療及び整腸剤を内服していない、非活動性の潰瘍性大腸炎(UC)患者 18 例、非活動性のクローン病(CD)患者 20 例、健常人 20 人を対象とした。糞便を採取し当科に保管後、糞便より Quick Gene DNA tissue kits(Kurabo)を用いて、DNA 抽出を行った。次世代シーケンサーを用いて細菌の解析は、16S rRNA 遺伝子領域また真菌の解析は internal transcribed spacer (ITS) 領域のシーケンスにより行った。</p> <p>【結果】初めに細菌構成の検討では、健常人、UC および CD の間では、有意に異なった変化を認め、特に CD 患者で異なった細菌構成を示した。種の多様性を示す <math>\alpha</math> 多様性は、健常人と UC では変化はなかったが、健常人と比較して CD で低下を認めた。細菌構成の違いを検討したところ、健常人と比較して CD では門レベルでは Firmicutes 及び Bacteroidetes が有意な減少を認め、属レベルでは <i>Coprococcus</i> や <i>Roseburia</i> や <i>Faecalibacterium</i> が有意な減少を認めた。CD では健常人と比較して <i>Enterococcus</i> 属の増加を認めた。</p> <p>次に真菌構成の検討では、<math>\alpha</math> 多様性は、健常人、UC、CD では違いは認めなかった。しかし種</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。

の構成の違いを示す $\beta$ 多様性については、健常人とIBDで違いを認めた。健常人とUCでは構成は似通っていたが、CDでは大きく異なった構成を示し、このことはUCよりもCDで腸内真菌の構成が異なっていることを示した。

真菌の門レベルの解析を行うと健常人ではAscomycotaが一番多く次にBasidiomycotaを多く認めた。次に健常人とIBDの検討では、IBDでAscomycotaが多く、Basidiomycotaが少ない傾向であったが、有意差は認めなかった。属レベルの検討では健常人において*Saccharomyces*が一番多く占めており、次に*Sarocladium*が多く認めた。CDでは健常人と比較し*Candida*の増加を認めた。真菌構成の違いを検討したところ、CDでは健常人と比較して属レベルで*Candida*、*Entyloma*、*Trichosporon*の増加を認めた。

最後に属レベルにおいて細菌構成及び真菌構成の相互関係について検討した。相関関係をもつ細菌及び真菌の数は、CDで一番多く、次にUCであり、健常人で一番少なかった。UCでは*Candida*と*Citrobacter*は負の相関を認め、CDでは*Candida*と*Lactococcus*や*Veillonelal*は正の相関を認めた。

【考察】今回初めて次世代シーケンサーを用いて日本人の健常人及びIBDでの腸内真菌叢の解析を行い、構成を明らかにした。日本人の腸内微生物叢は、他の国と大きく異なっており、日本人での検討が必要であった。まず初めに今回の検討では腸内細菌叢の解析を行った。腸内細菌と真菌は相互に関連しているために、腸内細菌のdysbiosisをまず明らかにした。これまでの報告と同様に腸内細菌の $\alpha$ 多様性及び $\beta$ 多様性の低下を認めた。

腸内真菌の解析では日本人の腸内真菌叢の構成を明らかにした。欧米からの腸内真菌の報告と比較し、門レベルでは構成に差は認めなかったが、属レベルでは大きく異なっていた。日本人と欧米人ともに*Saccharomyces*が一番多い真菌であったが、日本人でのみ*Sarocladium*や*Leucosporidium*を認めた。一方で*Debaryomyces*や*Penicillium*は、日本人では認めず、欧米人でのみ認めた。これらの違いは、人種の違いや食事、衛生環境、免疫の違いなどのいくつかの要因で起こっていると考えられる。

今回の真菌叢解析では、UCよりもCDで真菌構成の違いを認めた。日本人では特にCDで真菌のdysbiosisを認めていることを示している。腸内細菌叢の解析についての既報では、UCよりもCDで細菌のdysbiosisを認めていた。それに加え、今回の検討では腸内細菌と真菌の関係性は、UCよりもCDで相関を認めた。属レベルでの真菌は、CDで*Candida*の増加を認めたが、この変化は欧米では認めず、また*Saccharomyces*が欧米ではIBDで増加を認めたが、日本ではこの変化は認められなかった。これらの構成の違いは日本人と欧米人の健常人の違いを反映している可能性があると考えられる。

【結論】日本人の腸内真菌叢は欧米と大きく異なっていることがわかった。日本人のIBD患者での腸内真菌の特徴を示すことができた。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	878	氏名	今井 隆行
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>本論文では炎症性腸疾患 (IBD) である潰瘍性大腸炎 (UC) やクローン病 (CD) と腸内細菌と腸内真菌との関係について次世代シーケンサーでの検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) 細菌構成において、<math>\alpha</math>多様性は、CD でのみ低下を認めた。</li><li>2) 健常人と比較して CD では門レベルでは Firmicutes 及び Bacteroidetes が減少を認め、属レベルでは <i>Coprococcus</i> や <i>Roseburia</i> や <i>Faecalibacterium</i> が減少を認めた。CD では健常人と比較して <i>Enterococcus</i> 属の増加を認めた。</li><li>3) 真菌構成において、<math>\alpha</math>多様性は健常人、UC、CD で違いは認めなかったが、<math>\beta</math>多様性は UC よりも CD で腸内真菌の構成が異なっていた。</li><li>4) 真菌の門レベルの解析では、IBD で Ascomycota が多く、Basidiomycota が少ない傾向であった。属レベルの検討では健常人において <i>Saccharomyces</i> が一番多く、次に <i>Sarocladium</i> が多く認めた。CD では健常人と比較し <i>Candida</i> の増加を認め属レベルで <i>Candida</i>、<i>Entyloma</i>、<i>Trichosporon</i> の増加を認めた。</li><li>5) 属レベルにおいて相関関係をもつ細菌及び真菌の数は、CD で一番多く、健常人は一番少なかった。UC では <i>Candida</i> と <i>Citrobacter</i> は負の相関を認め、CD では <i>Candida</i> と <i>Lactococcus</i> や <i>Veillonella</i> は正の相関を認めた。</li></ol> <p>本論文は、IBD 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 592 字) (令和 2 年 1 月 28 日)</p>			