

学位論文の要旨

Dysbiosis of the salivary microbiota in pediatric-onset
primary sclerosing cholangitis and its potential as a biomarker

(小児期発症の原発性硬化性胆管炎の
唾液細菌叢解析と診断的バイオマーカーとしての可能性)

June, 2021

(2021年6月)

Kentaro Iwasawa

岩澤 堅太郎

Pediatrics

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 発生成育小児医療学

(Doctoral Supervisor : Shuichi Ito, Professor)

(指導教員 : 伊藤 秀一 教授)

学位論文の要旨

Dysbiosis of the salivary microbiota in pediatric-onset primary sclerosing cholangitis and its potential as a biomarker

(小児期発症の原発性硬化性胆管炎の
唾液細菌叢解析と診断的バイオマーカーとしての可能性)

<https://www.nature.com/articles/s41598-018-23870-w>

1. 序論

原発性硬化性胆管炎 (Primary Sclerosing Cholangitis, PSC) は、肝内および肝外胆管の慢性炎症と線維化によって、胆管の多発性の狭窄と拡張をきたし、最終的には胆汁性肝硬変に至る予後不良な肝疾患である (Dyson et al., 2018)。潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis, UC) をはじめとする炎症性腸疾患を合併する頻度が高く、その発症要因に腸内細菌の関与も指摘されている。成人ではPSCの腸内細菌叢において、*Veillonella*属などの口腔内で主要な細菌が増加していたことが報告されたが (Kummen et al., 2017)、これまでにPSCの口腔内細菌叢の報告はなく、本研究ではPSC患者の口腔内細菌叢と小児期発症PSCの腸内細菌叢の解析を目的として、PSC患者、PSC非合併UC患者、健常者 (Healthy control, HC) の唾液および糞便の細菌叢構造を比較検証した。

2. 実験材料と方法

2013年5月～2015年10月の間に済生会横浜市東部病院を受診し、発症時年齢が18歳未満であったPSC患者 (PSC群)、PSC非合併UC患者 (UC群) および健常者 (HC群) の唾液および糞便を採取した後に、迅速に嫌気パックし、グリセロール・ストックにより凍結保存することで細菌叢の構成を維持した。細菌DNAを調製し、16SリボソームRNA遺伝子V1-V2領域をPCR増幅しRoche 454 GSシリーズを用いた塩基配列の決定を行った。 α 多様性の評価として、Operational Taxonomic Units (OTU)数、Chao1 index, Shannon's index, また、 β 多様性の評価として、UniFrac 距離解析を用いた細菌叢の系統樹に基づく菌叢構造の類似度を評価した。また、各群における菌種の門・科・属・種レベルの組成比を比較した。さらには、唾液細菌叢の菌種の組成比を用いて、機械学

習であるランダムフォレストを行い、得られた Out-of-back エラー率により受信者動作特性 (Receiver Operating characteristic curve, ROC) 曲線を作成し、その曲線下面積 (Area under the curve, AUC) で診断能を評価した。

3. 結果

サンプル提供の協力を得られたのは、PSC 群は 27 例 (男 19 例, 女 8 例), UC 群 16 例 (男 7 例, 女 9 例), HC 群 24 例 (男 10 例, 女 12 例) であった。また、PSC 群の全例に消化管病変を認め、UC 10 例 (42%)、非特異的腸炎 17 例 (59%) であった。PSC 群は、腸内細菌叢の Unweighted UniFrac 距離解析、および、唾液細菌叢の Weighted UniFrac 距離解析で UC 群とも HC 群とも有意に異なったクラスターを形成した。一方で、PSC 群の腸内細菌叢では Shannon's index が HC 群と比較して有意に低かったが ($p < 0.05$)、唾液細菌叢では Shannon's index を含む α 多様性の指標に差を認めなかった。これらの結果は、PSC 群において、腸内細菌叢では菌種の多様性が減少し、IBD や他の腸内細菌叢の恒常性破綻を来す病態と同じ傾向であることを示唆する一方で、唾液細菌叢においては、菌種数の多様性は保たれているものの、主要細菌菌種の組成比が変化していることを示唆した。腸内細菌叢では、PSC 群は、HC 群と比較して、*Enterococcus* 属が増加し、*Parabacteroides* 属が減少しており、UC 群と比較して、*Ruminococcus* 属、*Faecalibacterium* 属、*Roseburia* 属が増加していた。唾液細菌叢では、PSC 群は、HC 群と比較して、*Rothia* 属と *Haemophilus* 属が減少しており、UC 群と比較して、*Haemophilus* 属の減少と *Oribacterium* 属の増加を認めた ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$)。唾液細菌叢の菌属の組成比を用いると PSC 群と HC 群は AUC 0.7423, PSC 群と UC 群は AUC 0.8756 で分けることができ、菌種の組成比を用いると PSC 群と HC 群は AUC 0.8011, PSC 群と UC 群は AUC 0.7626 で分けることができた (表 1)。

表 1. 交差検証によって得られた各群を区別する平均 AUC

| カテゴリー | AUC | |
|------------|--------|--------|
| | 菌属 | 菌種 |
| PSC vs. UC | 0.8756 | 0.7626 |
| PSC vs. HC | 0.7423 | 0.8011 |
| UC vs. HC | 0.6452 | 0.5314 |

AUC, 曲線下面積; PSC, 原発性硬化性胆管炎; UC, 潰瘍性大腸炎; HC, 健常者

4. 考察

小児期発症のPSCにおいて、腸内細菌叢および唾液細菌叢の菌叢構造は崩れており、その主体は、腸内細菌叢は菌種数の低下で、唾液内細菌叢は主要細菌の組成比の変化であった

唾液細菌叢は、口腔内疾患のみならず、炎症性腸疾患を含めた (Said et al. 2014) 様々な全身疾患でもその関連が報告されている。唾液細菌叢は糞便と比較して採取が簡易で、抗菌薬をなどの環境の影響を受けにくく、侵襲性の低いバイオマーカーとして利用できる可能性が考えられている。我々の検討においてもPSCとHCを13菌種によりAUC 0.8011で、PSCとUCを6菌属でAUC 0.8756で区別することができ、診断的バイオマーカーとなりうることを示唆した。今後、様々な国や地域、合併するIBDの種類、成人期発症の症例も含めたPSC唾液細菌叢データの蓄積が望まれる。

(キーワード)

原発性硬化性胆管炎, 炎症性腸疾患, 唾液細菌叢, 腸内細菌叢, バイオマーカー

【引用文献】

Dyson, J.K., Beuers, U., Jones, D.E.J., Lohse, A.W., and Hudson, M. (2018). Primary sclerosing cholangitis. *Lancet* 391, 2547–2559.

Kummen, M., Holm, K., Anmarkrud, J.A., Nygård, S., Vesterhus, M., Høivik, M.L., Trøseid, M., Marschall, H.U., Schrumpf, E., Moum, B., et al. (2017). The gut microbial profile in patients with primary sclerosing cholangitis is distinct from patients with ulcerative colitis without biliary disease and healthy controls. *Gut* 66, 611–619.

Said, H.S., Suda, W., Nakagome, S., Chinen, H., Oshima, K., Kim, S., Kimura, R., Iraha, A., Ishida, H., Fujita, J., Mano, S., Morita, H., Dohi, T., Oota, H., Hattori, M., (2014). Dysbiosis of salivary microbiota in inflammatory bowel disease and its association with oral immunological biomarkers. *DNA Res* 21, 15–25.

【論文目録】

I 主論文

Dysbiosis of the salivary microbiota in pediatric-onset primary sclerosing cholangitis and its potential as a biomarker.

Iwasawa K, Suda W, Tsunoda T, Oikawa-Kawamoto M, Umetsu S, Takayasu L, Inui A, Fujisawa T, Morita H, Sogo T, Hattori M.

雑誌名 : Scientific Reports. Vol 8, No. 1, Article number 5480, 2018.

II 副論文

Characterisation of the faecal microbiota in Japanese patients with paediatric-onset primary sclerosing cholangitis.

Iwasawa K, Suda W, Tsunoda T, Oikawa-Kawamoto M, Umetsu S, Inui A, Fujisawa T, Morita H, Sogo T, Hattori M.

雑誌名 : Gut. Vol. 66, No.7, Page 1344-1346, 2017.

III 参考論文

1. Modelling human hepato-biliary-pancreatic organogenesis from the foregut-midgut boundary.

Koike H, **Iwasawa K**, Ouchi R, Maezawa M, Giesbrecht K, Saiki N, Ferguson A, Kimura M, Thompson WL, Wells JM, Zorn AM, Takebe T.

雑誌名 : Nature. Vol 574, No. 7776, Page, 112-116, 2019.

2. Single cell transcriptomics identifies a signaling network coordinating endoderm and mesoderm diversification during foregut organogenesis

Han L, Chaturvedi P, Kishimoto K, Koike H, Nasr T, **Iwasawa K**, Giesbrecht K, Witcher PC, Eicher A, Haines L, Lee Y, Shannon JM, Morimoto M, Wells JM, Takebe T, Zorn AM.

雑誌名 : Nature Communications. Vol. 11, No. 1, Article No. 4158, 2020.

3. Hepatitis B (HB) immunoglobulin plus HB vaccine for intrauterine HB virus infection.

Iwasawa K, Inui A, Tsunoda T, Kondo T, Kawamoto M, Sogo T, Komatsu H, Fujisawa T.

雑誌名 : Pediatrics International, Vol. 57, No.3, Page 401-405, 2015.

4. Childhood-onset inflammatory bowel diseases associated with mutation of Wiskott-Aldrich syndrome protein gene.

Ohya T, Yanagimachi M, **Iwasawa K**, Umetsu S, Sogo T, Inui A, Fujisawa T, Ito S.

雑誌名 : World Journal of Gastroenterology. Vol. 23, No. 48, Page 8544-8552, 2017