

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09015

研究課題名(和文) C型肝炎の病態増悪に関わる腸内細菌叢由来因子の同定

研究課題名(英文) Identification of the factor derived from gut microbiota associated with the progress of chronic hepatitis C

研究代表者

井上 貴子 (Inoue, Takako)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00431700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：C型慢性肝疾患(CHC)患者の腸内細菌叢を、健常人と比較した。腸内細菌叢の変化は病初期から見られ、多様性が失われていた。無症候性キャリアでは一時的にBacteroidesやEnterobacteriaceaeが増加し、病期が進むにつれストレプトコッカス・サリバリウスなどが持つウレアーゼ遺伝子が増加した。慢性肝炎・肝硬変患者の便ではpHの上昇が見られ、ストレプトコッカス・サリバリウスなどのアンモニア生産菌が便中アンモニアの増加に関与していると考えられた。CHCは病初期から腸内細菌叢の破綻を引き起こし、アンモニア生産菌の異常な増加がCHCで見られる高アンモニア血症の一因と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed a comparative study of gut microbiota composition between chronic hepatitis C (CHC) patients and healthy individuals. Compared with healthy individuals, bacterial diversity was lower in persons with HCV infection, with a decrease in the order Clostridiales and an increase in Streptococcus and Lactobacillus. Microbiota dysbiosis already appeared in the persistently normal serum alanine aminotransferase (PNALT) stage with the transient increase of Bacteroides and Enterobacteriaceae. Predicted metagenomics showed an increase in the urease gene mainly encoded by viridans streptococci during the progression of clinical stages, consistent with a significantly higher fecal pH in chronic hepatitis (CH) and liver cirrhosis (LC) than in healthy individuals or in the PNALT stage.

HCV infection is associated with gut dysbiosis, even in patients with mild liver disease. Additionally, overgrowth of viridans streptococci can account for hyperammonemia in CH and LC.

研究分野：gastroenterology

キーワード：chronic hepatitis C gut microbiota dysbiosis

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの大腸には多種多様な細菌が常在し、複雑な腸内細菌叢を形成している。21世紀に入り他分野と同様に腸内細菌叢研究においても、分子生物学的手法として**次世代シーケンサー**を用いた**多様性解析**が行われるようになった(中山二郎 他、腸内細菌学雑誌 2006年 20巻2号:168-171)。特に欧米において、**ヒトの microbiome(微生物叢)**解析は大きなプロジェクトとして扱われるようになった(アメリカ国立衛生研究所、Human Microbiome Project)。近年、腸、皮膚、膣などの常在微生物は、健常人であっても個体間で大きく異なることが分かってきた。また**全身疾患と腸内細菌叢との関係**については、**肥満や炎症性腸疾患では腸内細菌の多様性が低下し、膣炎では膣内細菌の多様性が増加している**ことが報告されている(Human Microbiome Project Consortium, Nature. 2012. 486: 207-14)。

生体内における腸管と肝臓のつながりは密接である。生体物質や薬物などが胆汁とともに十二指腸内に分泌されたのち小腸や大腸から再吸収され、門脈を経て肝臓に戻る経路のことを**腸肝循環(enterohepatic circulation)**という。この過程において、**腸内細菌が重要な役割**を果たしていると考えられている。研究開始当初、肝疾患の中では非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)についての研究が最も進んでいた。NASHは非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)患者に、腸内細菌由来のエンドキシンなどの増悪因子が作用し病態が進行することが報告されている(Imajo K. et al., Cell Metab. 2012. 16(1):44-54)。また肥満状況下の肝臓では、**レプチン**を介して**腸内細菌へ過剰応答**する結果、肝炎が進展することが示唆されていた(Ahmed AS. et al.,

Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2010. 7:691-701)。しかしウイルス性肝疾患の病態進行と腸内細菌叢の関係についての報告はほとんどなく、研究はまだ進んでいなかった。

## 2. 研究の目的

近年 HCV を駆逐する新しい直接作用型抗ウイルス剤(DAAs)が開発され、2014年9月に保険適応となった。インターフェロンを使わない経口剤2剤の併用療法で、SVR24(抗ウイルス治療終了24週後にHCVが検出されない率)は85%程度と高治癒率を示し、HCVは排除できる時代となる。しかし**肝硬変症例への治療は十分とは言えず、ウイルス駆逐後も肝硬変は不可逆的な病態**として今後も残存する。一方で**C型肝炎ではインスリン抵抗性、脂肪肝化と肝病態進展が深く関連している**ことがわかってきた(Sheikh MY. et al., Hepatology. 2008. 47(6):2127-33)。実際に抗HCV療法が奏功した患者は、飲酒や過栄養により肥満から脂肪肝へと至る症例も多い。これらの背景から本申請研究の計画立案において、まずアプローチする肝疾患としてC型肝炎を選んだ。

申請者らは腸肝循環に着目し、以下の目標を設定した。

- ・**腸内細菌が肝病態進展に及ぼす影響を探索する。**
- ・**進展した肝病態(肝硬変)が腸内細菌叢に与える影響を解明する。**
- ・**HCV排除後の腸内細菌叢の変化と予後について検討する。**
- ・**腸内細菌叢を利用した新規の肝疾患治療法の確立、および肝病態進行マーカーを開発する。**

本研究では**腸内細菌に由来する肝病態増悪因子**を明らかにし、その**作用機序**を解

**明**する。国内外を見ても現在までウイルス性肝炎における腸内細菌叢の役割についての研究報告はなく、独創性が高い。

以上を本研究期間 3 年間で明確にし、その後**肝硬変の新たな治療法の確立**(腸内細菌叢への介入)、**腸内細菌または菌産生物質を利用した肝疾患進行マーカーの開発**、**HCV 排除後の発がん**と**腸内細菌叢との関係**へ研究を発展させる。

### 3. 研究の方法

#### 腸内細菌叢の同定

**方法**...九州大学農学研究院管理の**次世代型超高速 DNA シークエンサー Illumina**

**MiSeq** を使って、腸内細菌叢を同定した。九州大学中央分析センター報告 第 30 号 (2012 年) に従い、実験を行なった。

・名古屋市立大学病院および共同研究施設に通院中の HCV 感染症例で、糞便提供に同意した患者 (Persistently normal serum alanine aminotransferase [PNALT] 8 名、慢性肝炎 84 名、肝硬変 40 名、肝癌合併肝硬変 24 名) を対象者とした。またコントロールとして、23 名の健康人からも糞便の提供を受けた。

・腸内細菌ゲノム DNA を鋳型に **16S rRNA 遺伝子** を網羅的に増幅させる PCR を行い、PCR 産物を塩基配列決定のテンプレートに用いた (日本乳酸菌学会誌 2012. 23[1]:24-34 中山二郎、他)。

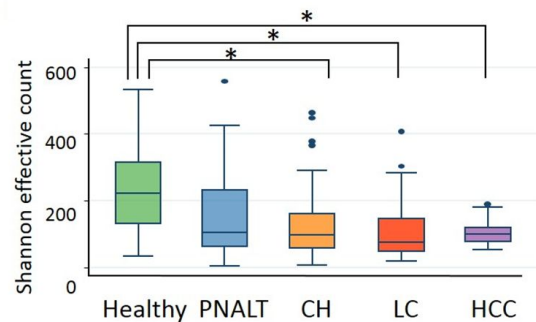
・得られた塩基配列はミシガン州立大学 **RDP pyrosequencing pipeline** を用いて、菌叢データに変換した。

・解析は群集解析、多変量分析、Lefse (多重検定)、PICRUST (予測メタゲノム) などで行なった。

本研究は当院と研究協力機関の倫理審査委員会の承認を得ている。

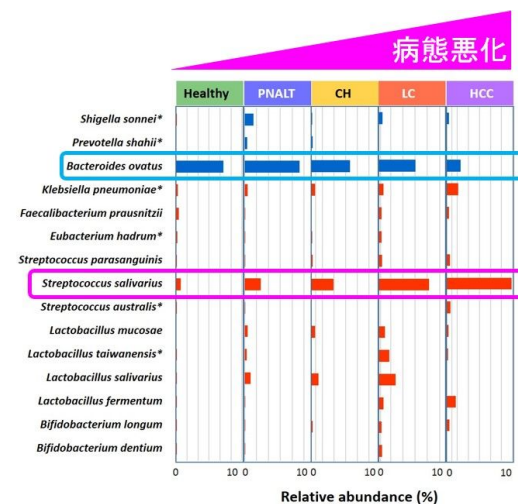
### 4. 研究成果

CHC 患者では腸内細菌叢の多様性が失われていた (**図 1**)。



**図 1** -diversity (多様性の評価)

CHC 患者での腸内細菌叢の変化は病初期から見られ、PNALT では一時的にバクテロイデス属 (*Bacteroides*) や腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) が増加した (**図 2**)。



**図 2** 腸内細菌叢での各菌種の割合

予測メタゲノムから、病期が進むにつれて主にストレプトコッカス・サリバリウス (*S. salivarius*) が持つウレアーゼ遺伝子が増

加することが分かった(図3)。

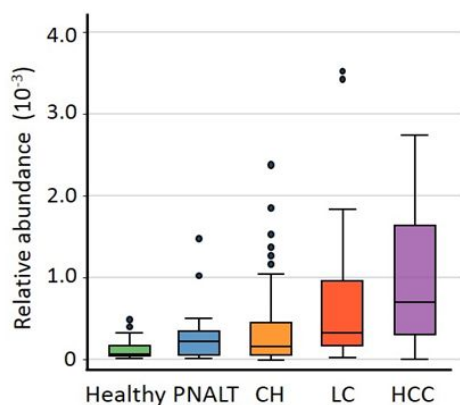


図3 PICRUST(予測メタゲノム)

それを裏付ける結果として、健常人・PNALTと比べて、慢性肝炎・肝硬変患者の便 pH の有意な上昇が見られ(図4)、*S. salivarius* を中心とするアンモニア生産菌が便中アンモニアの増加・高アンモニア血症に関与していると考えられた。

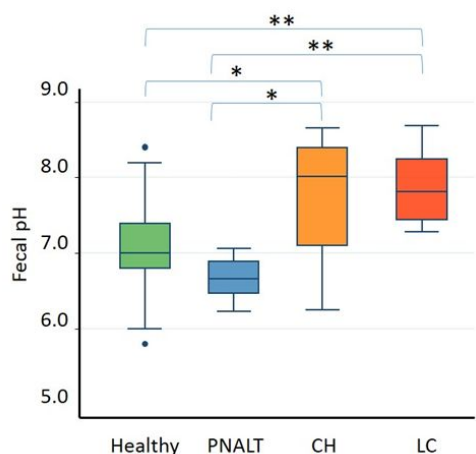


図4 慢性肝炎・肝硬変患者の便 pH の有意な上昇

HCV 感染は病初期から腸内細菌叢の破綻(Dysbiosis)を引き起こす。さらに腸内での *S. salivarius* などのアンモニア生産菌の異常な増加が、病期の進行した肝硬変患

者での高アンモニア血症の一因と考えられる。したがって、より早期からの腸内細菌叢への介入(プロバイオティクスや抗生剤など)が、肝性脳症の予防のみならず、CHCの病態進展・肝癌の発生を抑える可能性が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計1件)

Inoue T, Nakayama J, Moriya K, Kawaratani H, Momoda R, Ito K, Iio E, Nojiri S, Fujiwara K, Yoneda M, Yoshiji H and Tanaka Y. Gut dysbiosis associated with hepatitis C virus infection. Clin Infect Dis. 査読有 2018. (in press) doi: 10.1093/cid/ciy205

(学会発表)(計0件)

(図書)(計0件)

(産業財産権)

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

(その他)

ホームページ等(計0件)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

井上貴子(INOUE Takako)

名古屋市立大学大学院医学研究科・助教

研究者番号:00431700

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

田中靖人 (TANAKA Yasuhito)

名古屋市立大学医学(系)研究科(研究  
院)・教授

研究者番号:90336694

中山二郎 (NAKAYAMA Jiro)

九州大学(連合)農学研究科(研究院)・准  
教授

研究者番号:40217930

(4)研究協力者

なし