

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 13 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20392

研究課題名(和文) 口腔細菌を起因とするNAFLD病態形成機序の解明

研究課題名(英文) Effect of oral pathogens on the progression of NAFLD in high caloric diet-fed mice.

研究代表者

大坂 利文(Osaka, Toshifumi)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：70514470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肥満個体における免疫応答および腸内細菌叢の質的・量的な変化に着眼し、口腔細菌の異所性感染が非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)の病態形成の関連性を調べることを目的とした。口腔病原体の持続投与は回腸および大腸などの下部消化器内の細菌叢のバランス異常を誘発し、この腸内細菌叢の質的变化に対して肝臓は鋭敏に感知し、炎症応答を惹起し、NAFLD病態進展リスクの増加に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is considered to be a hepatic manifestation of metabolic syndrome. Recently, dysbiotic alteration in the gut microbiota has been highlighted as one possible driving forces for the progression of NAFLD. However, the mechanisms causing gut dysbiosis remain obscure. Thus, this study aimed to investigate whether oral pathobionts-induced alteration in the gut environments is the contributing factor of NAFLD progression. C57BL/6J mice were fed with a high caloric diet to develop obesity, and intragastrically administrated with *Porphyromonas gingivalis* or *Streptococcus intermedius* for 12 weeks. Intragastric administration of oral pathobionts led to enhance the inflammatory response in the liver, while had no effect on gut physiology. These results suggest that the liver was highly sensitive to gut environmental alteration. In conclusion, oral pathobionts-induced gut environmental alteration confers the susceptibility to NAFLD progression.

研究分野：細菌学

キーワード：非アルコール性脂肪肝疾患 口腔病原体 腸内細菌叢

### 1. 研究開始当初の背景

近年、難治性あるいは慢性炎症を伴う内科疾患の多くで、腸内細菌叢のバランス異常が生じていることが報告され、腸内細菌や口腔細菌などの常在細菌と疾患の関連性について調べられております。本研究課題で対象とする非アルコール性脂肪肝疾患 (**Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD**) はメタボリックシンドロームの肝表現型である。約 2 割の NAFLD 患者は、予後不良な非アルコール性脂肪肝炎 (**Non-Alcoholic Steatohepatitis, NASH**) を発症し、肝硬変および肝癌への進展リスクが高い。NAFLD の病態形成機構としては、肥満やインスリン抵抗性を起因とした脂肪肝に、腸管由来のエンドトキシン、サイトカイン、酸化ストレスなどが 2nd hit として加わることで、非アルコール性脂肪肝炎 NASH へと進行する **Two-hit theory** に基づいた検討が多くなされてきた。また、肝臓の脂肪化と炎症が同時に進行する **Multiple parallel hit hypothesis** も提唱されている。さらに、高脂肪食やアルコールの過剰摂取に伴う腸管上皮透過性の亢進によって生じる **Bacterial translocation (BT)** や代謝性エンドトキシン血症が、肝臓内において自然免疫系を中心とした炎症応答を惹起し、NAFLD 病態を進展させる重要な要因の一つとして注目されている。

慢性感染症である歯周病罹患者の口腔は、大腸に匹敵する病原性細菌、エンドトキシン、炎症性メディエーターのリザーバーであることから、NAFLD の病態進展に大きな影響を与えている可能性が高い。NAFLD 病態が進展するインフラマソーマ機能不全マウスにおいて、腸内の *Porphyromonadacea* 科と *Prevotellaceae* 科のポピュレーションが増加していることが報告された (Henao-Mejia et al. *Nature*, 2012)。さらに、肝硬変患者の糞便中に口腔由来の細菌が多く含まれ、肝硬変患者においては口腔細菌が下部消化器にまで定着していることが報告された (Qin et al. *Nature*, 2014)。また、NAFLD 患者の口腔では、歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* が高頻度に検出されることや、マウスに *P. gingivalis* を経口投与した場合、肝臓および脂肪組織における脂肪蓄積、炎症応答の増強、インスリン抵抗性を生じることが報告された (Arimatsu et al. *Sci Rep*, 2014)。すなわち、肝臓などの遠隔臓器における病態進展に関わる口腔細菌の BT およびエンドトキシンの流入経路として、歯肉溝だけでなく腸管も検討していく必要があると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、肥満個体における免疫応答および腸内細菌叢の質的・量的な変化に着眼し、口腔細菌の異所性感染などの内因性感染症と NAFLD 病態形成の関連性を解明することを目的とした。

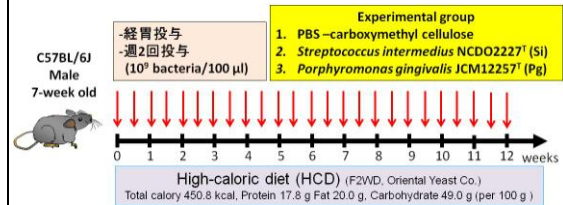
### 3. 研究の方法

#### (1) 食餌誘導性肥満モデル

本実験では、7 週齢の C57BL/6J マウス (オス、日本クレア) に対して、高カロリー食 F2WD (オリエンタル酵母) を給餌した。

#### (2) 供試した口腔病原体

嫌気条件下で Brain heart infusion (BHI) 液体培地で増殖させた *Streptococcus intermedius* (NCDO2227) あるいは *Porphyromonas gingivalis* (JCM12257) の生菌を PBS-carboxymethyl cellulose に  $1 \times 10^{10}$  cells/ml となるように調製した。この細菌懸濁液を週 2 回経胃投与 ( $100 \mu\text{l}$ 、 $1 \times 10^9$



cells/ml) した。

図 1 実験系

#### (3) 腸管透過性評価

6 時間のエサおよび水の給餌を停止したマウスに対して FITC-デキストラン ( $600 \text{ mg/kg-body wt}$ ) を経口投与した。1 時間後、尾静脈より採血を行い、血漿を保存した。血漿サンプルは PBS で希釈を行い、蛍光スペクトロメーターで分析を行った (Excitation 485nm, Emission 535nm)。

#### (4) 血清バイオマーカーの測定

セボフルラン吸入麻酔下で、心採血 (全血採取) を行い、血清を回収した。また、肝臓、回腸、結腸を採材し、 $-80^\circ\text{C}$  で凍結保存した。凍結状態の各組織片 ( $50 \text{ mg}$  程度) に  $500 \mu\text{l}$  の Buffer [HBSS(-), Triton-X(0.1%), Protease/Phosphatase inhibitor] を加えて、ホモジナイズを行った。その後、遠心分離 ( $15000 \text{ rpm}$ ,  $5 \text{ min}$ ) を行い、上清を回収した。血清中の総コレステロール濃度、グルコース濃度、ALT、AST、トリグリセリドは、スポットケムを用いて分析を行った。また、血清および組織 (回腸、結腸、肝臓) に含まれる炎症性サイトカイン (IL-6, TNF, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-12, MCP-1) は CBA Mouse Inflammation kit (BD) を用いて分析を行った。

#### (5) 腸内細菌叢解析

マウス回腸内容物および糞便中の細菌叢解析を行うため、ISOFEAL (ニッポンジーン) を利用しマウス糞便から Total DNA を抽出した。抽出 DNA ( $1 \text{ ng}$ ) をテンプレートとして、16S rRNA 遺伝子の可変領域 V1-V2 を標的としたプライマー (Ion PGM 用アダプター配列、バーコード配列付加) を用いて PCR を行った。得られたアンプリコンを等量ずつ混合したものをテンプレートとして、Ion PGM シーケンサーを用いて、メタ 16S rRNA 配列解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 口腔病原体の投与による食餌誘導性肥満マウスの生化学バイオマーカーの評価

実験開始から 12 週間後の各マウスの血清中の生化学バイオマーカーを調べたところ、*P. gingivalis* 投与群 (Pg 群) では、総コレステロールやトリグリセリドの値が増加する傾向にあった。また、肝機能マーカーである ALT, AST では一部のマウス個体での増加が確認された。とくに、*S. intermedius* 投与群 (Si 群) においては、肝硬変が確認されたマウスで高値を示した (図 2)。

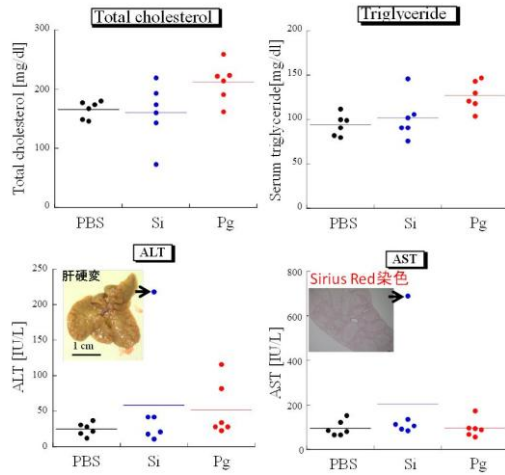


図 2 血清中バイオマーカー

##### (2) 口腔病原体を投与した肥満マウスの血清中の炎症性サイトカインの測定

実験開始から 12 週間後の各マウスの血清中のサイトカインを定量した (図 3)。その結果、IL-6, TNF, MCP-1 では、とりわけ高いものではないが、細菌投与群で増加傾向にあった (有意差はなし)。また、IL-10、IL-12、IFN- $\gamma$  の産生は、各群で同程度であった。

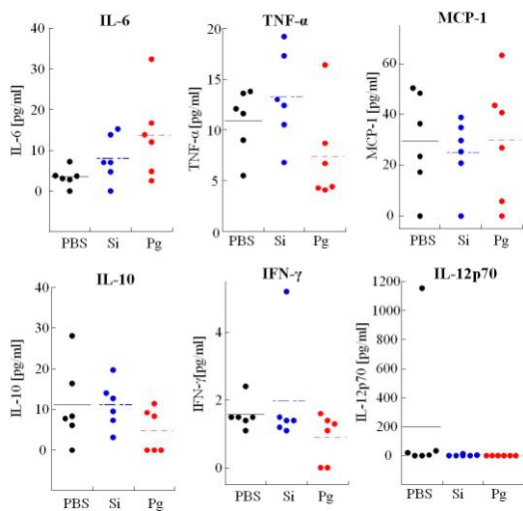


図 3 血清中のサイトカイン・ケモカイン

##### (3) 口腔病原体を投与した肥満マウスの各組織中の炎症性サイトカインの測定

実験開始から 12 週間後の各マウスの肝臓、回腸、結腸組織のホモジネート中のサイトカ

インを測定した。その結果、腸管における炎症応答は確認されなかったが、肝臓においては細菌投与群において炎症性サイトカイン (IL-6, TNF) および単球遊走因子 MCP-1 の産生が亢進していた。つまり、肝臓は口腔病原体の経口侵入による腸内環境の変化を感知していると考えられる。

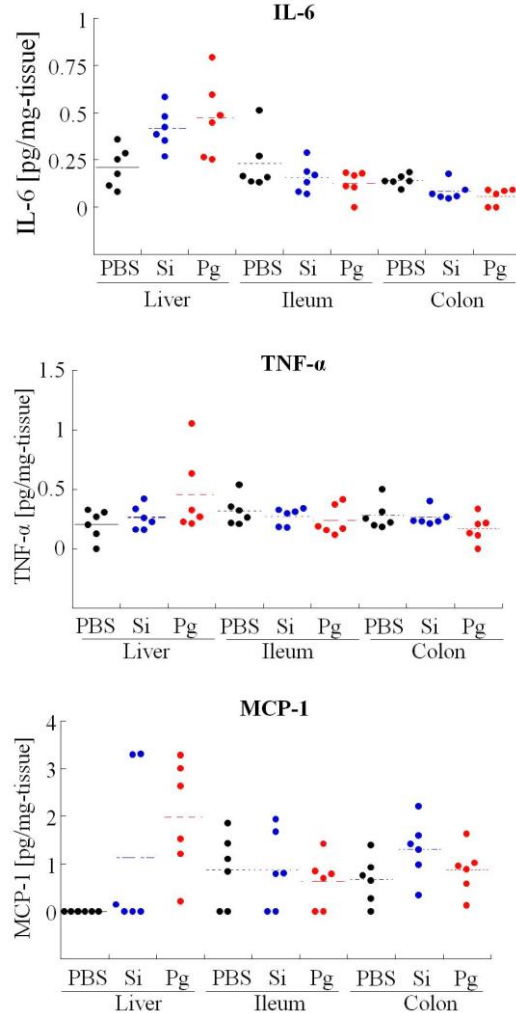


図 4 マウス組織中の IL-6, TNF, MCP-1

##### (4) 腸管透過性の評価

図 4 で確認された口腔病原体の投与による肝臓における炎症応答の要因の一つである腸管透過性について検討した。その結果、実験開始から 12 週間後の各マウスでは、口腔病原体投与による明確な腸管透過性の増大は確認されなかった (図 5)。

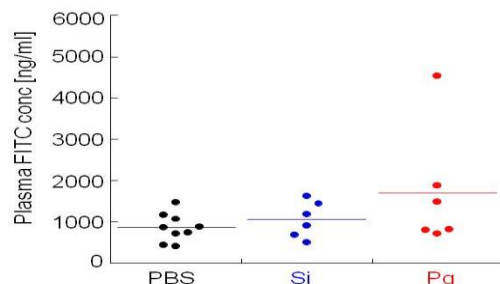


図 5 腸管透過性

(5) 腸内細菌叢の評価

口腔病原体の投与による回腸および結腸の腸内細菌叢の質的な変化を評価した。まず、慢性投与した口腔病原体は回腸および結腸いずれの部位においても検出されなかった。高カロリー食を与えたマウス回腸では、*Romboutsia ilealis* 近縁種が優勢種として顕在化していた。また、口腔病原体投与したマウス回腸では、肝がんのリスクファクターとなる *Clostridium* sp. ARIAKE1333 (Yoshimoto et al, *Nature* 2014) や、腸炎惹起性細菌の *Prevotella* に類縁な細菌群 *Bacteroidales* S24-7 (Palm et al, *Cell*, 2014) が増加していた (図6)。

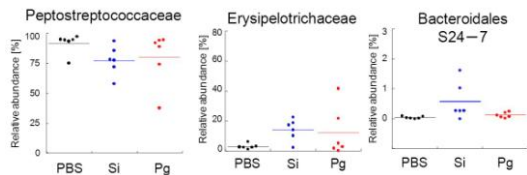


図6 回腸細菌叢の構成種

一方、結腸では、回腸よりも多くの細菌群が影響を受けていた(図7)。口腔病原体投与群では、腸炎惹起性細菌 (*Bacteroidales* S24-7) や *Clostridium* Ariake1333 の増加に加え、*Bacteroides acidifaciens* や *Bacteroides uniformis*, ムチン分解菌である *Akkermansia muciniphila* の増加が確認されました。つまり、こうした回腸および結腸内の細菌叢の質的な変化が肝臓に影響を与えていると考えられる。

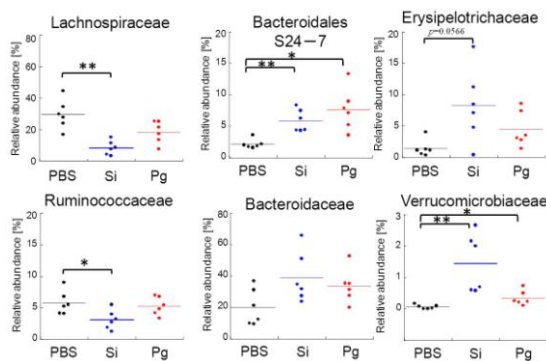


図7 結腸細菌叢の構成種

(6) 結論

口腔病原体は、下部消化器内の細菌叢のバランス異常を誘発し、この腸内細菌叢の質的な変化が、NAFLD 病態進展リスクを増大させると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

- (1) 大坂利文. 口腔病原体が誘引する腸内細菌叢バランス異常が非アルコール性脂肪肝疾患の病態進展に与える影響. 第58回歯科基礎医学会学術大会、2016年8月24日-2016年8月26日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

- (2) 大坂利文. 生活習慣病の病態進展と制御に関する腸内細菌叢の変化. 第92回実験動物コンファレンス、2016年6月18日、日本獣医生命科学大学(東京都・武蔵野市)

- (3) 大坂利文、阿部義廣、上芝秀博、常田聡、八木淳二. Liver senses gut environmental alteration induced by oral pathobionts. 第89回日本細菌学会総会、2016年3月23日-2016年3月26日、大坂国際交流センター(大阪府・大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大坂 利文 (Osaka, Toshifumi)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：70514470