

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19357

研究課題名(和文) NASH病態における腸内細菌の役割

研究課題名(英文) NASH and gut microbiota

研究代表者

結末 貴臣 (KESSOKU, Takaomi)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：30738620

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)：我々は以前、NASH患者の腸内細菌叢解析を施行したところ高度線維化進展例において、糞便中のFaecalibacterium prausnitzii (F.B)が有意に低下していることを発見した。本検討では、NASHマウスモデルにおけるF.Bの効果を検討したところF.BのNASH病態への改善、特に肝脂肪化と線維化への効果が示された。その機序としては腸管内の炎症性サイトカインやタイトジャンクション遺伝子を改善することで腸管透過性を制御している可能性が示された。したがって、腸内細菌に注目した新たなNASH治療の候補として、F.Bが重要な役割を担う可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Up to 25% of NAFLD patients develop a progressive inflammatory liver disease termed non-alcoholic steatohepatitis (NASH) that may progress towards cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and the need for liver transplantation. In recent years, several lines of evidence suggest that the gut microbiome plays important roles for the pathogenesis of NASH. We demonstrated faecalibacterium (FB) was significantly decreased with exacerbated liver fibrosis in human study. The aim of our study was to assess if FB improves NASH pathogenesis in mice and mechanism between FB and improving NASH-pathogenesis. Our study indicated that FB-administration improves NASH pathogenesis via ameliorating gut-permeability by inducing Treg in colon. Our results suggest that FB could be a candidate agent for the treatment of NASH through the improving leaky-gut.

研究分野：腸内細菌と非アルコール性脂肪肝

キーワード：腸内細菌 非アルコール性脂肪肝炎

1. 研究開始当初の背景

- (1) 非アルコール性脂肪性肝障害 (Nonalcoholic fatty liver disease: 以下 NAFLD), および非アルコール性脂肪肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis: 以下 NASH) は食生活の欧米化により今後増加することが予想される疾患である。現在 NAFLD は国内で 1000 万人以上, NASH は 100 万人以上存在することが報告され, 発症原因の解明, 治療法の開発は急務である。NAFLD/NASH の病態解明, 治療開発が困難な原因として同疾患の発症, 増悪因子が多岐にわたり全身疾患と関連しているため合併疾患により病態や治療法が異なることが挙げられる。
- (2) 我々のグループは, 腸管由来のエンドトキシン(ET)に着目し, 研究をしてきた。NASH 病態に影響を及ぼす ET には腸管側の要因と肝臓側の要因が考えられており, これまでの業績として我々は ET の肝臓側の要因における NASH の病態異常として肝臓での ET 感受性の亢進があることを論文で報告した (Cell Metab 2012)。しかしながら ET の供給源となる「腸内細菌」を含む腸管側の機序としては, 腸内細菌叢の異常, 腸管透過性の亢進による ET の上昇が重要と考えられており, これらの制御は NASH 治療における新たな可能性と考える。
- (3) 研究代表者らは肝生検を施行したすべての NASH 患者(100 例)を高度線維化進行例(50 例)と軽度線維化進行例(50 例)に分類し, 血中 ET 値の解析を行ったところ, 線維化進行例では有意な ET の増加を認めた。ET 産生の主な腸内細菌はグラム陰性桿菌であるため, 次世代シーケンサーを用いて同様の患者に便メタゲノム解析を行ったところ, グラム陰性桿菌でもエンドトキシンの産生能を持たない *Fecalibacterium* 属 (FB) の有意な占拠率の低下を認め, さらに FB の占拠率と血中 ET 値は有意な負の相関を示していた

2. 研究の目的

- (1) NASH 線維化病態において FB の効果を検討する。
- (2) FB の腸管透過性への分子機序を解明する
- (3) ヒト健常コントロールと NASH 患者の腸管透過性と便中ムチン、有機酸解析を行う。

3. 研究の方法

- (1) C57BL/6 マウスを通常飼育 (Oriental 酵母社製; 360kcal/100g, 13.3%脂質, 26.2%蛋白質, 60.5%炭水化物), High-fat+high cholesterol+high fructose (HFCD) 食 (リサーチダイエット社製 D09100301 使用: 905kcal/100g, 40%脂質, 20%タンパク質, 40%炭水化物) 下に 20 週間飼育する。通常飼育マウスを B 群, HFCD 食飼育下のマウスを H 群とし, HFCD 負荷マウスに *Faecalibacterium prausnitzii* ATCC2788 を嫌気培養し 1 日 1 回の経口投与を 20 週間行いった群を F 群とし肝病態への影響を検討した。
- (2) 各群マウスの血漿中の ET の測定を行う。ET 測定キットは、Hycult biotech 社の Limulus amoebocyte lysate chromogenic endpoint assay を用いて測定した。
- (3) 各群マウスの腸管透過性を評価するため 4KDa の FITC-dextran を経口投与し, 1 時間絶食後、血漿を採取し吸光度を測定した。
- (4) 各群マウスの透過性亢進のメカニズムを評価するため、便中ムチン、有機酸の測定を行った。
- (5) 各群マウスの腸粘膜の炎症性サイトカインやタイトジャンクションを qPCR を用いて測定する。
- (6) ヒト腸管透過性測定はラクツロース・マンニトールテストがゴールドスタンダードであるため本試験を用いて評価した。便ムチン、有機酸もマウス同様にテクノスルガ社に外注し

た。

4. 研究成果

- (1) 我々のヒトでの検討において健常コントロール群の糞便では約 10%、FB が占拠していたことから、1 回量となるように FB を調整し HFCD 負荷マウスに経口投与した。その結果、H 群では脂肪化、肝線維化をきたしていたのに対して、F 群では脂肪化、線維化ともに改善していた。これらの結果から、NASH 病態に対して FB は予防効果を示すことが示唆された。
- (2) H 群では B 群に比較し有意に ET の有意な増加を認めた。さらに F 群では、H 群に比較し有意に低下していた。以上の結果から、FB は NASH 病態に関わる高 ET 血症を有意に改善することが示唆された。
- (3) H 群では B 群に比較し有意に FITC absorbance の有意な増加を認めた。さらに F 群では、H 群に比較し有意に低下していた。以上の結果から、NASH モデルでは腸管透過性が亢進しており、さらに FB は腸管透過性を改善させることが示唆された。
- (4) 便中ムチンに関しては、各群で有意な差は認めなかった。便中有機酸解析に関しては、H 群では B 群に比較し酢酸、酪酸、プロピオン酸の有意な低下を認め、F 群で改善を認めた。そのため、便中ムチンは腸管透過性や NASH 病態に関連がないことが示唆された反面、有機酸の関与が示唆された。
- (5) H 群では腸粘膜の TNF α や IL-6 の有意な増加を認め、F 群では改善していた。さらにタイトジャンクション mRNA の中でも OCLDN, CLDN4, CLDN8, CLDN15 において H 群で増悪し、F 群で有意な改善を認めた。以上から、FB は腸粘膜に起きている炎症性サイトカインの増加とタイトジャンクションの破壊を改善していることが示唆された。
- (6) NASH 患者では尿中のラクツロース・マンニトール比が有意に亢進していた。そのため

マウス同様にヒト NASH でも腸管透過性が亢進していることが示唆された。しかしながら、便中ムチンや有機酸に関しては、健常コントロールとヒト NASH の間では有意な差が示されなかった。

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 3 件)

Kessoku T, Imajo K, Kobayashi T, Honda Y, Kato T, Ogawa Y, Tomeno W, Kato S, Higurashi T, Yoneda M, Kirikoshi H, Kubota K, Taguri M, Yamanaka T, Usuda H, Wada K, Saito S, Nakajima A. Efficacy, safety, and tolerability of lubiprostone for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adult patients with constipation: The LUBIPRONE, double-blind, randomised, placebo-controlled study design. *Contemp Clin Trials*. 2018 Jun;69:40-47. doi: 10.1016/j.cct.2018.04.002. Epub 2018 Apr 5. 査読あり。

Kessoku T, Honda Y, Sumida Y, Kobayashi T, Kato T, Ogawa Y, Tomeno W, Imajo K, Fujita K, Yoneda M, Kataoka K, Taguri M, Yamanaka T, Seko Y, Tanaka S, Saito S, Ono M, Oeda S, Eguchi Y, Aoi W, Sato K, Itoh Y, Nakajima A. *BMC Gastroenterol*. 2017 Aug 8;17(1):96. doi: 10.1186/s12876-017-0652-3. 査読あり。

Kessoku T, Imajo K, Honda Y, Kato T, Ogawa Y, Tomeno W, Kato S, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Nagashima Y, Saito S, Wada K, Nakajima A. Resveratrol ameliorates fibrosis and inflammation in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Rep*. 2016 Feb

25;6:22251. doi: 10.1038/srep22251. 査読あり。

〔学会発表〕(計6件)

結束 貴臣、今城 健人、本多 靖、小川 祐二、留野 涉、田 正人、嶋川 真木、田中良紀、川原 知浩、斉藤 聡、臼田 春樹、和田孝一郎、中島 淳:(優秀発表者賞受賞) 非アルコール性脂肪肝疾患病態進展における腸内細菌叢と腸内代謝産物の役割. 第36回 アルコール医学生物学研究会学術集会 一般演題3, 横浜, 2017年, 1月.

結束 貴臣、今城 健人、中島 淳:非アルコール性脂肪肝炎の線維化進展に寄与する腸内代謝産物の検討. 第103回日本消化器病学会総会 シンポジウム 3:腸内細菌からみた消化器疾患の病態解析 基礎と臨床, 新宿, 2017年, 4月.

Takaomi Kessoku : The role of gut-microbiota and metabolome in nonalcoholic fatty liver disease. 第103回日本消化器病学会総会 The 4th JSGE International Topic Conference, 新宿, 2017年, 4月.

結束 貴臣、今城 健人、本多 靖、小川 祐二、留野 涉、米田 正人、嶋川 真木、田中良紀、川原 知浩、斉藤 聡、臼田 春樹、和田孝一郎、中島 淳:非アルコール性脂肪肝疾患における腸内細菌叢と腸内代謝産物の役割 - 肝病態進展と肝外合併症発祥のメカニズム - . 第1回 消化器臓器間ネットワーク研究会 session4, 新宿, 2017年, 4月.

Takaomi Kessoku, Kento Imajo, Yasushi Honda, Takayuki Kato, Yuji Ogawa, Wataru Tomeno, Takuma Higurashi, Masato Yoneda, Masaki Shimakawa, Yoshiki Tanaka, Tomohiro Kawahara, Satoru Saito, Usuda Haruki, Koichiro Wada, Atsushi Nakajima : CHARACTERISTICS OF FECAL MICROBIOTA IN JAPANESE PATIENTS

WITH NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE: A CONNECTION AMONG GUT-PERMEABILITY, ENDOTOXIN AND NAFLD. AASLD Poster Liver Diseases and Transplantation, Chicago, 2017, May.

結束 貴臣、今城 健人、本多 靖、小川 祐二、留野 涉、米田 正人、嶋川 真木、田中良紀、川原 知浩、斉藤 聡、臼田 春樹、和田孝一郎、中島 淳:腸内細菌および腸内代謝産物の解析による非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) の病態解明. 第3回 Gut microbiota 研究会. (2017年4月)(東京).

〔図書〕(計3件)

今城 健人、本多 靖、結束 貴臣、小川 祐二、米田 正人、斉藤 聡、中島 淳: NASH / NAFLD の遺伝子素因. 消化器・肝臓内科, 1(2):176-182, 2017年.

結束 貴臣、今城 健人、本多 靖、小川 祐二、米田 正人、中島 淳:特集 腸内細菌と消化器疾患の新たな展開 NAFLD と腸内細菌. メディカル・サイエンス・ダイジェスト, 2017年4月号(第43巻第4号通巻563号): p.17-20, 2017年.

結束 貴臣、今城 健人、本多 靖、加藤 孝征、小川 祐二、留野 涉、馬渡 弘典、遠藤 宏樹、藤田 浩司、米田 正人、斉藤 聡、中島 淳、和田孝一郎:アルコール性肝障害、非アルコール性脂肪肝疾患患者の腸内細菌叢に関する検討. アルコール医学生物学, vol.35:p.60-61, 2017年.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称:脂肪関連疾患及び/又は炎症の予防又は治療剤

発明者:結束 貴臣

権利者:ピオフェルミン製薬

種類:
番号:2017-118686
出願年月日:2017年6月16日
国内外の別: 外国出願及び国内優先権主張出願

名称:非アルコール性脂肪性肝疾患の診断方法、又は診断用キット

発明者:結束貴臣

権利者:ピオフェルミン製薬

種類:

番号:2017-003327

出願年月日:2017年1月12日

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://ycu-hepabiligi.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

結束 貴臣 (KESSOKU Talaomi)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号:30738620

(2)研究分担者

特記事項なし

(3)連携研究者

特記事項なし

(4)研究協力者

特記事項なし