

令和 2 年 9 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04165

研究課題名(和文) NAFLD病態における腸内細菌と腸内代謝物の役割解明

研究課題名(英文) Role of Microbiota and Metabome in NAFLD

研究代表者

中島 淳(Atsushi, Nakajima)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：30326037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,680,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、線維化が進行したNAFLD患者において、Faecalibacterium Prausnitzii (FP)の減少、腸管透過性の亢進、エンドトキシン高値を見出した。マウスモデルでは、FP投与により腸管バリア機能が改善され、肝機能障害だけでなく、脂質異常症、インスリン抵抗性、アテローム性動脈硬化症の発症を予防ができた。肝コリンの取り込み障害に起因する血漿コリンが、大腸に逆流することを示した。このコリンの流出はトリメチルアミンを増加させ、血漿中のトリメチルアミン-N-オキシド濃度を上昇させ、動脈硬化を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身疾患であるNASH/NAFLDにおける腸内細菌を軸とした病態異常の根底に腸管透過性の亢進があり、腸管のバリア機能の改善が全身疾患の治療につながるという点で当該研究領域にパラダイムシフトをもたらす結果である。現在治療薬のない本疾患の新規治療法につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We found the decreased Faecalibacterium Prausnitzii (FP) abundance, hyper-intestinal permeability and high plasma endotoxin level in NAFLD patients with advanced fibrosis. In a mouse NAFLD model, the FP administration improved the intestinal barrier function and eventually prevented from developing not only liver dysfunctions but also dyslipidaemia, insulin resistance and atherosclerosis. Here we show that the high level of plasma choline that was attributable to an impaired hepatic choline uptake could travel back into the colon under the leaky gut condition. This efflux of choline increased trimethylamine which was biotransformed by intestinal microbiota and plasma level of trimethylamine-N-oxide, subsequently promoting atherosclerosis. Thus, this study implicated a novel therapeutic approach; improvement of intestinal barrier function by the FP administration as a central management for NAFLD.

研究分野：肝臓病学

キーワード：腸管透過性 腸内細菌 NAFLD NASH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患(Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: NAFLD)は肝臓疾患中患者数最多の疾患であるがその病態は依然不明な点が多く、治療法に関しては国内外で精力的に新薬治験が行われているがまだ承認された新薬はない。以上の背景から本疾患の病態解明と新規治療法の開発は肝臓病学分野での喫緊の課題である。NAFLDの病態形成には過栄養などによる肝臓への過剰な脂肪蓄積に加えインスリン抵抗性、遺伝的多型、酸化ストレスさらにはグラム陰性桿菌由来のエンドトキシンの関与が推定されている (Day CPらの two hits theory)。エンドトキシンは腸管内に多量にあるが腸管壁が非常に強固なバリア機能を有しておりどのようにして腸管内から肝臓へ暴露されるかが不明であったが近年 Gut-Liver Axis に関する研究から NAFLD 患者では腸管バリア機能が異常となっており透過性の亢進 (いわゆる Leaky Gut) を認めるとする報告が散見されるようになってきた。我々も患者及び動物モデルで腸管透過性の亢進と低レベルエンドトキシン血症を確認している。

2. 研究の目的

今回の研究で 肝生検で線維化グレード別の患者腸内細菌解析を行い臨床パラメーターから NAFLD 病態進展と強く相関する腸内細菌の同定と、その菌の病態における役割解明のために動物モデルを用いた検証を行い、これまでに知られていない新規病態メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

患者糞便を用いた次世代シーケンサーによる菌叢解析を用いる。臨床解析は通常臨床学的検査結果を用いる、腸管透過性はラクツロースマンニトール比を検討する動物モデルでは過栄養のアニリン負荷マウスを用いて検討を行った。

4. 研究成果

肝生検で線維化グレード別の患者腸内細菌解析を行い臨床パラメーターから NAFLD 病態進展と強く相関するのは *faecalibacterium praeuittzii* (FP) の減少であることを突き止めた (Figure 1)。臨床解析では線維化の進行とともに血清エンドトキシン活性の上昇と腸管透過性の亢進を認めた (Figure 1a)。腸内細菌の解析で腸管透過性及び血清エンドトキシンその他肝機能障害などの臨床パラメーターと最も強く相関したのは FP の減少であった (Figure 1 b)。FP の減少は同じ患者で2年後に採取した糞便中の腸内細菌解析でも有意に低下しており長期的に病態と深い関係にあると推定された。

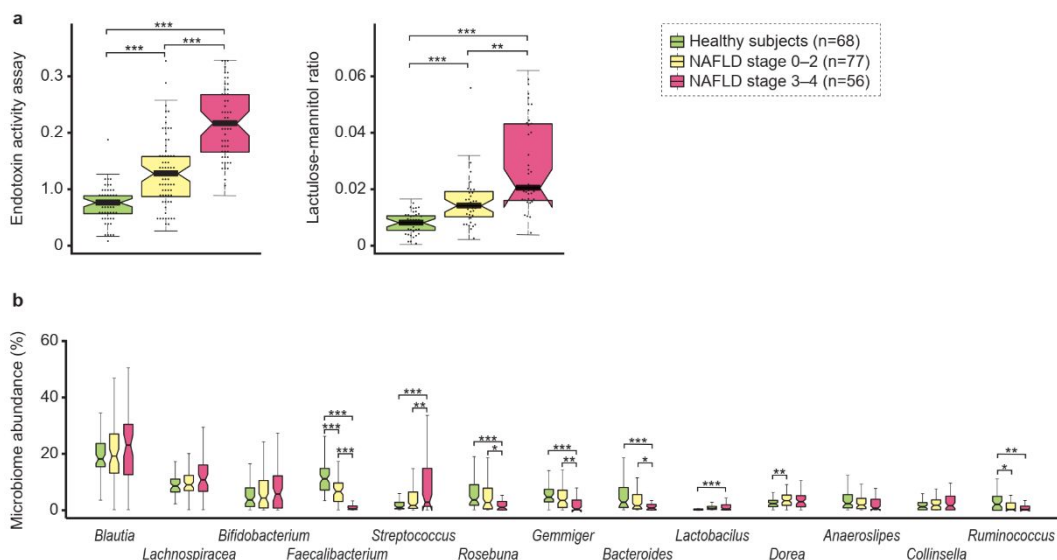


Fig 1. Microbiome analysis and laboratory measurements in patients with non-alcohol fatty liver

disease (NAFLD).

a. The patients with NAFLD stage 3–4 displayed the highest endotoxin level and lactulose-mannitol ratio (LMR). b. *Faecalibacterium* abundance was lower in patients in NAFLD.

次に FP の低下がどのように病態発症とかかわるかをマウス NAFLD モデルを用いて解析を行った (Figure2)。マウスモデルはアニリンモデル (AMLN) を用いた。このモデルは過栄養モデルで、マウスに高脂肪・高果糖・高コレステロールの負荷を行ってモデルを作成するものである。Figure2 はその結果を示しており、モデルマウスでは著明な肝臓の脂肪蓄積と線維化及び血清脂質異常や耐糖能異常を普通食マウスに比較して示すが、FP 投与によりこれらの病態異常が改善することを認めた。

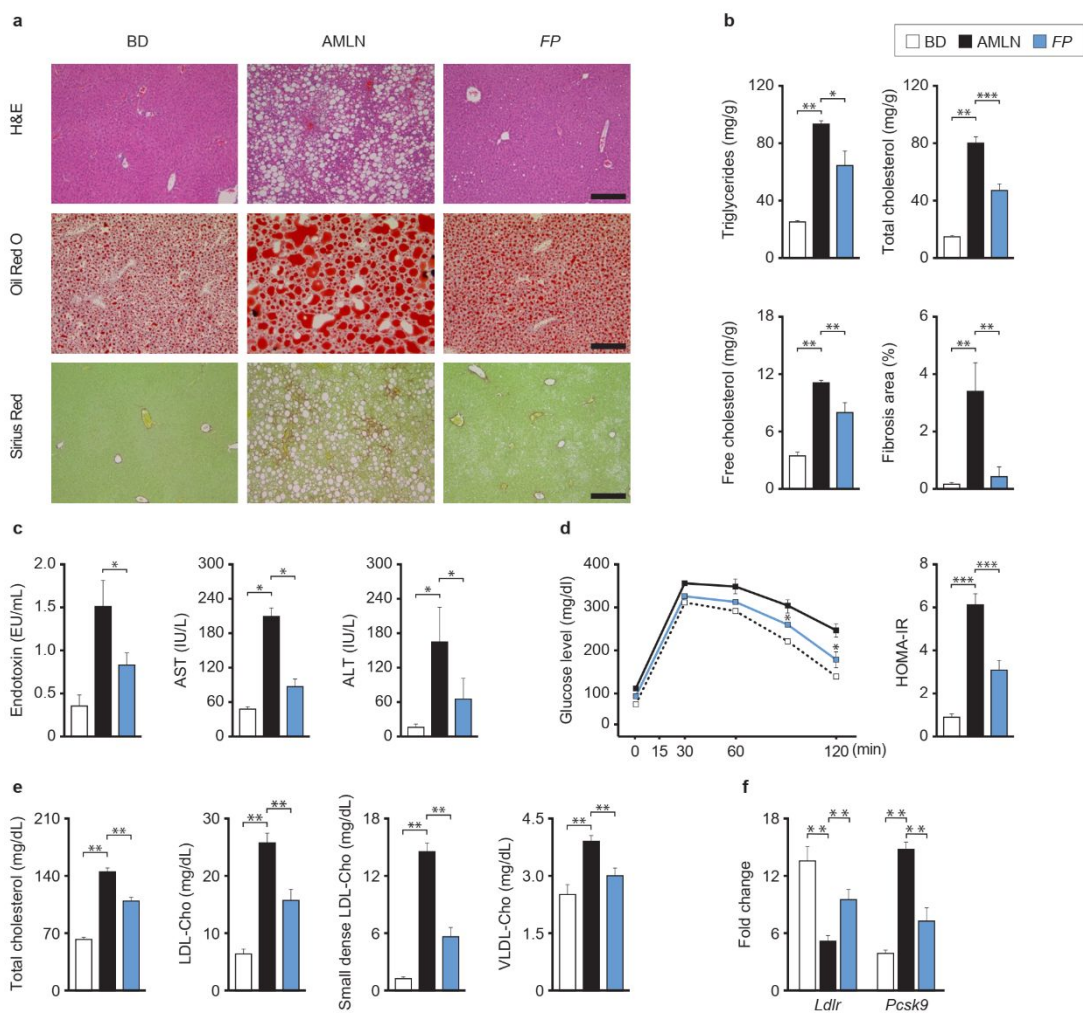


Fig 2. The effects of the administration of FP for 20 weeks in the AMLN mice.

a. The AMLN mice who were fed a high-fat, high-cholesterol and high-fructose diet for 20 weeks showed fatty liver (Oil red O staining) and fibrosis (Sirius red staining) which were not observed by the administration of *faecalibacterium praunitzii* (FP). Scale bar, 200 μ m. b. Hepatic lipid levels and fibrosis area. c. Serum concentrations of endotoxin, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). d. Oral glucose tolerance test (OGTT, left) and homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR, right). e. Serum cholesterol levels. f. Relative expression

levels of *Ldlr* and *Pcsk9* genes to β -actin.

Each bar or square and error bar indicate mean + standard error (SE)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

AMLN, Amylin liver non-alcoholic steatohepatitis model; BD, basal diet; LDL-cho, low-density lipoprotein cholesterol; VLDL-cho, very low-density lipoprotein cholesterol

FP 投与による動物モデルでの治療効果を確認後我々はその機序がマウスモデルでの腸管透過性の改善にあることを確認することができた (data not shown)。その機序は腸管粘膜での制御性 T 細胞 (Treg) の誘導でそれによるタイトジャンクションの修副作用であると思われた。また動脈硬化マウスを用いた検討では ApoE 欠損マウスにアニン食負荷をしたところ FP 投与で動脈硬化性病変の改善を認めた (data not shown)。動脈硬化の発生にはエンドトキシンやコレステロールの関与が高値の事実であるが、FP 投与はこれらの異常を是正する。さらに動脈硬化惹起性分子である血清 TMAO (トリメチルアミノオキサイド) 濃度も有意に低下させた。TMAO は腸管内でコリンの腸内細菌による代謝により産生されるがマウスモデルでは腸管内コリンが高濃度であることを発見した。このコリンは食事由来ではなく、消化吸収で小腸より取り込まれたコリンの肝臓への吸収障害による血清高コリン血症の結果腸管透過性の高い大腸粘膜で血管から腸管内へ漏出する機序があることの端緒をつかんでいる (data not shown)。今後はこの機序の詳細な解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 498.Chan WK, Treeprasertsuk S, Imajo K, Nakajima A, Seki Y, Kasama K, Kakizaki S, Fan JG, Song MJ, Yoon SK, Dan YY, Lesmana L, Ho KY, Goh KL, Wong VW	4. 巻 47
2. 論文標題 Clinical features and treatment of nonalcoholic fatty liver disease across the Asia Pacific region-the GO ASIA initiative	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Aliment Pharmacol Ther	6. 最初と最後の頁 816-825
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/apt.14506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 47.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
2. 発表標題 CHARACTERISTICS OF FECAL MICROBIOTA IN JAPANESE PATIENTS WITH NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE: A CONNECTION AMONG GUT-PERMEABILITY, ENDOTOXIN AND NAFLD.
3. 学会等名 AASLD（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	今城 健人 (Imajo Kento) (30600192)	横浜市立大学・附属病院・助教 (22701)	