

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：27103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00930

研究課題名(和文) 腸内細菌叢と非アルコール性脂肪性肝炎の病態進展との関連に関する基礎的検討

研究課題名(英文) Study on the Relationship Between Intestinal Microbiota and Pathological Development of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH)

研究代表者

中村 強 (Nakamura, Tsuyoshi)

福岡女子大学・国際文理学部・教授

研究者番号：30581912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：酢酸セロース(WSCA)は新規な無色無臭の水溶性食物繊維である。WSCAは炎症性腸疾患に抵抗性を示す細菌群を増加させ、血中中性脂肪を低減することを報告した。次いでNASH病態モデルマウス(STAMマウス)に投与し、腸内細菌叢の変化、あるいは病態の改善効果について検討した。その結果、WSCA摂取は腸内細菌叢、肝機能や血糖値を改善した。具体的には、腸内細菌叢に有益なClostridium subcluster XIVaを含むOTU 940の増加させた。このものは制御性T細胞の増殖と分化に寄与することが示唆されており、NASH病態下の腸内細菌叢や肝機能などを改善効果に寄与したものと判断した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の発症機序や病状、病態進展に極めて類似した病態動物(STAMマウス)を用い、正常な状態からNASHの病態進展、さらには腸内細菌叢との関連性やその改善が本疾患の発症予防もしくは治療に及ぼす影響を中心に検討した。

その結果、腸内細菌とNASH発症との関連性を見出すとともに、酢酸セロース(WSCA)摂取による腸内細菌叢の改善効果や本疾患の予防に有効な「機能性食品」や「医薬品」等への開発に向けた可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Water-soluble cellulose acetate (WSCA) is a novel colorless, odorless, dietary fiber. It reduces blood triglycerides by supporting the growth of inflammatory bowel disease-resistant bacteria. In this study, we administered WSCA to nonalcoholic steatohepatitis (STAM) mice, then measured changes in intestinal microbiota and pathological conditions. WSCA intake improved intestinal microbiota, liver function, and blood glucose levels. Specifically, it increased the growth of Clostridium subcluster XIVa (operational taxonomic unit 940), which is beneficial to intestinal microbiota. WSCA reportedly contributes to the proliferation and differentiation of regulatory T cells. We conclude that WSCA improved intestinal microbiota and liver function in NASH mice.

研究分野：栄養学

キーワード：水溶性セルロース 腸内細菌叢 非アルコール性脂肪性肝炎 機能性食品 医薬品

## 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 (NAFLD) は非飲酒者にもかかわらず肝臓への脂肪沈着を認める疾患の総称であり、単純性脂肪肝から、より重篤な肝細胞障害さらに肝線維化、非代償性肝硬変へと続発することが知られている。特に、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は NAFLD に向かひの障害 (要因) が加わって発症すると考えられている。

また、腸内細菌叢と肝疾患あるいは肥満との関連報告 (Yoshimoto et al., Nature, 499, 97(2013), (L. Zhu et al., Pediatric Res., 77, 245(2015)) は以下のとおりである。

(1) 腸内細菌叢の変化とデオキシコロール酸の生成増加および肝がんの発生。

(2) 腸内細菌群である Clostridium クラスター XI 菌群の増加や肥満との関連性。

(3) 健常人、肥満患者、NASH 患者の 3 群間での腸内細菌におけるクラスターの相違。

(1) ~ (3) は正常から肥満さらには NASH へと進展する際の腸内細菌叢の悪化が発症要因の一つであるとの指摘がなされているものの、逆に腸内細菌叢を改善し、NASH の発症が抑制されたとした報告は見当たらない。

### 2. 研究の目的

本研究では、NASH 病態モデルマウス (STAM マウス: Iida A et al: Exp Anim 68: 417, 2019) を用い、NASH 発症が確認されている病態下における腸内細菌叢の変化を明らかにすることを目的とした。また、上記の (2) を中心に新規な食物繊維である水溶性セルロース (WSCA) 摂取が NASH の腸内細菌叢を改善すること、さらには発症改善 (予防効果や治療効果) に対する影響を検討した。

### 3. 研究の方法

WSCA に関連した実験は 2 回実施し、その方法は以下に示すとおりである。

#### (1) STAM マウスにおける腸内細菌叢の変化【実験 1】

##### 実験群および飼育方法

実験群は Normal 群 2 群、STAM マウス (上記と同じ) を用いた STAM 群 2 群の計 4 群とした。Normal 群 2 群は STZ を接種しないマウスとし、Normal 群 2 群のうち、離乳直後から AIN93G を与えた群 (NA 群)、離乳直後に HFD32 を与えた群 (NH 群) とした。また、STAM 群 2 群は離乳 1 週間後の 5 週齢で群分けを行い、HFD32 を解剖まで与えた群 (SH 群)、HFD32 の 2% の WSCA を置換した飼料を与えた群 (SW 群) とした。

##### 腸内細菌叢解析

腸内細菌叢の解析は機能性食品と薬理栄養 (2020 年: 掲載予定) に詳細に記載した。

#### (2) 水溶性食物繊維の違いが STAM マウスの NASH 病態に及ぼす影響【実験 2】

##### 実験群および飼育方法

実験群は Normal 群 1 群、STAM 群 3 群の計 4 群とした。STAM 群 (Control 群)、WSCA 投与群 (WS 群)、DE 投与群 (DE 群) とした。

##### 血液生化学検査

血清生化学検査は富士ドライケム 7000 を用い、肝機能 (AST, ALT)、空腹時血糖 (GLU)、脂質代謝 (TG, TCHO) および栄養指標 (ALB, TP) に関する項目を測定した。

#### (3) 統計学的解析法

すべての統計解析は一元配置分散分析を行い、各群間の有意差は Tukey-Kramer の多重比較法により検定した。有意水準は 5% 以下 (両側検定) とし、また相関分析にはピアソンの積率相関係数を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) STAM マウスにおける腸内細菌叢の変化【実験 1】

主な腸内細菌叢 (phylum level) の系統アサインの変化を Figure 1. に示した。

#### (2) 水溶性食物繊維の違いが STAM マウスの NASH 病態に及ぼす影響【実験 2】

##### 体重の経時変化および組織重量体重比

解剖時体重、ならびに肝臓、脾臓、腎臓および脂肪組織における各組織重量の体重比を Table 1. に示した。

##### 血液生化学検査

血清生化学検査の結果を Table 2 に、血清 ALT と GLU の相関関係を Figure 2 に示した。血清 ALT と GLU には有意な正の相関が認められた。

#### (3) 成果

腸内細菌叢は炎症性腸疾患を含め肥満や糖尿病など種々の疾患で変化することが明らかになりつつある (飯島英樹ら: 日本消化器病学会雑誌 115(3): 244, 2018)。肝疾患においても、腸内細菌ならびにその代謝物は組織損傷および炎症を促進する可能性があると考えられている。本研究で使用した WSCA は新規な食物繊維であり、セルロースのヒドロキシ基の一部をアセチル基に置換 (アセチル基総置換度 0.4~1.1) した水溶性酢酸セルロースである (Shimamoto S, et al: Patent no. W02018093067A1, 2016)。加えて、これまで我々は WSCA 投与が内細菌叢に有益な Clostridium subcluster XIVa などを増加させる機能があること、Clostridium cluster IV, XIVa 及び XVII は制御性 T 細胞の増殖と分化に寄与することを示唆している。

従って、新規の食物繊維である WSCA の摂取は炎症性疾患の一つである NASH の腸内細菌叢を変化させ、病態を改善するのではないかと仮定した。

その結果、WSCA 摂取は NASH 病態下の腸内細菌叢、肝機能および血糖値を改善する効果が示唆された。実験 1 では、Normal 群間に変化はほぼ認めず、健常マウスへの 4 週間程度の高脂肪食 (HFD) の投与は腸内細菌叢に大きな影響を及ぼさないことが示唆された。一方、SH 群は Normal 群に比べ、Proteobacteria 及び Actinobacteria の割合が有意に増加し、Bacteroidetes の割合がやや減少していた。

ヒト NASH では健常者や肥満に比べ Proteobacteria が有意に上昇 Bacteroidetes が減少し、本研究と一致した。しかし、2% を WSCA に置換して飼料を STAM マウスに摂取させた結果、Normal 群の菌叢に復することが明らかとなった。すなわち、WSCA は NASH の腸内細菌叢を改善することが示唆された。次いで、WSCA 摂取による STAM マウスの栄養状態ならびに肝機能や血糖値に及ぼす影響を実験 2 にて検討した。その結果、WSCA 摂取は栄養状態に大きな影響を及ぼさないことが示唆された。肝機能は WSCA 摂取により STAM 群間の AST を低とさせた。また、肝肥大化が抑制した。また、血清 GLU は WSCA 摂取により有意な低値を示した。さらに、血清 ALT と GLU は正の相関関係にあることも認められ、WSCA 摂取は NASH の肝機能および血糖値を改善する効果を有することが示唆された。

本研究において、WSCA 投与は STAM マウスの腸内の SCFAs 産生に優位に働き、GLP-1 産生の亢進に影響した可能性も示唆された。今回の新規な成果として STAM マウスの高血糖や肝脂肪化の抑制に寄与し、肝機能も改善することを見出した。今後、ヒト臨床試験にて検討していく。

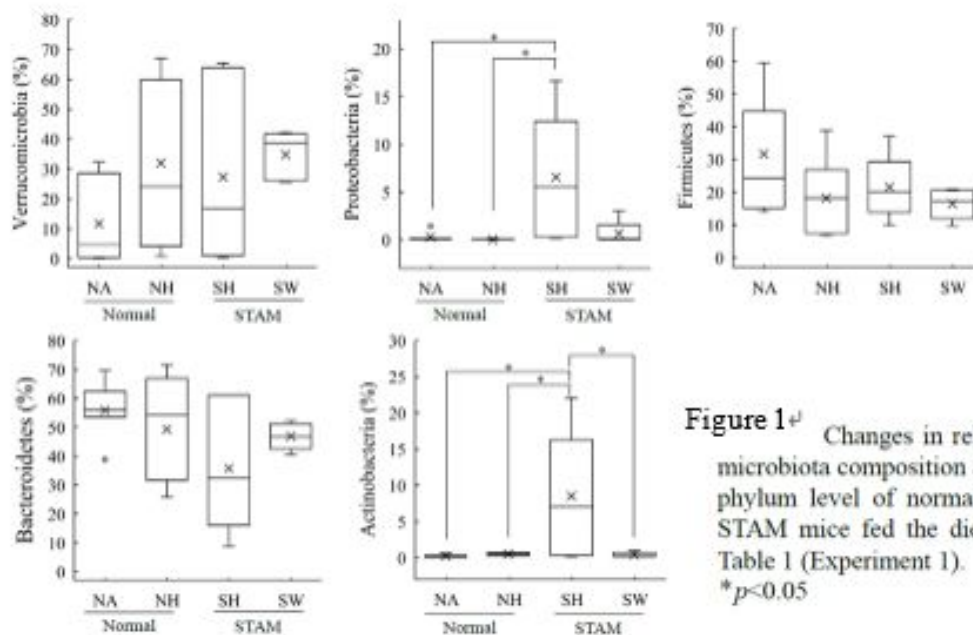


Figure 1<sup>†</sup> Changes in relative microbiota composition at the phylum level of normal and STAM mice fed the diets in Table 1 (Experiment 1). \**p*<0.05

Table 1<sup>†</sup> Comparison of liver, spleen, and fat weights in normal and STAM mice fed the diets in Table 2 (Experiment 2).

	Normal	STAM		
		Control	WS	DE
Number of mice	6	5	7	6
Body weight (g)	20.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	15.9 ± 0.9 <sup>b</sup>	16.9 ± 0.8 <sup>b</sup>	16.0 ± 0.5 <sup>b</sup>
Liver weight (%BW)	3.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	6.7 ± 0.3 <sup>bc</sup>	5.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	6.8 ± 0.2 <sup>c</sup>
Spleen weight (%BW)	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>ab</sup>
Fat* weight (%BW)	2.2 ± 0.2	2.1 ± 0.4	1.4 ± 0.2	2.7 ± 0.5

Values are expressed as the mean ± standard error of the mean. Different superscript letters indicate significant differences (*p* < 0.05).

\*Fat was white adipose tissue of the parorchis and retroperitoneum.

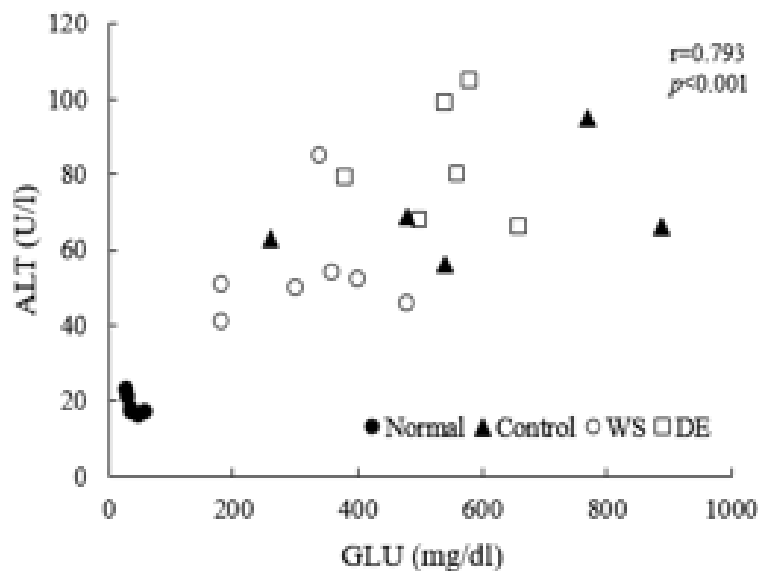
BW: body weight

**Table 2<sup>d</sup>** Comparison of serum levels of AST, ALT, TCHO, TG, GLU, ALB and TP in normal and STAM mice fed the diets in Table 2 (Experiment 2).

	Normal	STAM		
		Control	WS	DE
AST (U/l)	51.0 ± 1.8 <sup>a</sup>	135.8 ± 12.1 <sup>b</sup>	145.6 ± 14.7 <sup>b</sup>	174.5 ± 11.2 <sup>b</sup>
ALT (U/l)	18.7 ± 1.1 <sup>a</sup>	69.8 ± 6.7 <sup>bc</sup>	54.1 ± 5.4 <sup>b</sup>	82.8 ± 6.5 <sup>c</sup>
TCHO (mg/dl)	100.7 ± 3.2 <sup>a</sup>	188.2 ± 9.2 <sup>b</sup>	153.4 ± 12.9 <sup>b</sup>	175.5 ± 12.8 <sup>b</sup>
TG (mg/dl)	171.0 ± 13.7 <sup>a</sup>	104.2 ± 10.8 <sup>ab</sup>	87.6 ± 10.9 <sup>b</sup>	160.0 ± 29.6 <sup>a</sup>
GLU (mg/dl)	40.3 ± 5.0 <sup>a</sup>	588.0 ± 110.9 <sup>b</sup>	320.0 ± 41.9 <sup>c</sup>	536.7 ± 38.1 <sup>b</sup>
ALB (g/dl)	2.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.9 ± 0.0	1.8 ± 0.2
TP (g/dl)	4.7 ± 0.1	4.6 ± 0.2	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.2

Values are expressed as the mean ± standard error of the mean. Different superscript letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; TCHO, total cholesterol; TG, triglyceride; GLU, fasting blood sugar; ALB, albumin; TP, total protein



**Figure 2<sup>d</sup>** . The correlation between ALT (U/l) and GLU (mg/ml) in normal and STAM mice fed the diets in Table 2 (Experiment 2).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iida, A., Kuranuki, S., Nakamura, T. et.al.	4. 巻 68
2. 論文標題 Analysis of amino acid profiles of blood over time and biomarkers associated with non-alcoholic steatohepatitis in STAM mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Animals.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 飯田綾香, 倉貫早智, 田中芳明, 中村 強	4. 巻 12
2. 論文標題 分岐鎖アミノ酸投与がNAFLD/NASH 病態モデルマウスの 肝脂肪蓄積に及ぼす影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 機能性食品と薬理栄養学会誌	6. 最初と最後の頁 243-250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 実旺, 飯田 綾香, 太田 雅規, 中村 強
2. 発表標題 TSODマウスを用いたNASH病態モデルの可能性及び自発運動による発症予防効果
3. 学会等名 日本栄養改善学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋実旺, 飯田綾香, 中村強
2. 発表標題 TSODマウスによる自発運動もしくは強制運動がNASHの発症に及ぼす影響について
3. 学会等名 第12回 TSOD（肥満・糖尿病）マウス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯田綾香、秋山 萌、上芝原志織、芳丸美佳子、大谷まどか、山下紗生、山内良子、島本 周、中村 強
2. 発表標題 新規な水溶性食物繊維の投与がNASH発症に及ぼす影響
3. 学会等名 第68回日本栄養・食糧学会大会（沖縄）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村 強、飯田綾香、沈 穎イ、都地未希、幸 里美、吉田佳歩、太田雅規、梅野 彩、堀江祐範、七里元督、室富和俊、吉田康一
2. 発表標題 自発的運動が健常マウス及びNASH病態モデルマウスの酸化ストレスに及ぼす影響
3. 学会等名 第68回日本栄養・食糧学会大会（沖縄）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯田綾香、山内良子、倉貫早智、中村 強
2. 発表標題 網羅的解析によるNASHモデルマウスの炎症関連遺伝子の探索
3. 学会等名 第64回日本栄養改善学会学術総会（徳島）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 沈 穎イ、飯田綾香、太田雅規、中村 強
2. 発表標題 自発的運動が健常及びNASH病態マウスの体組成ならびに酸化ストレスに及ぼす影響
3. 学会等名 第64回日本栄養改善学会学術総会（徳島）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋実旺, 飯田綾香, 太田雅規, 中村 強
2. 発表標題 TSODマウスを用いたNASH病態モデルの可能性、及び自発運動による発症予防効果
3. 学会等名 第12回TSOD(肥満・糖尿病)マウス研究会(つくば)
4. 発表年 2018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	飯田 綾香  (Iida Ayaka)  (70739169)	神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・助教   (22702)	
研究分担者	北垣 浩志  (Kitagaki Kouji)  (70372208)	佐賀大学・農学部・教授   (17201)	