

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09434

研究課題名(和文) NASH由来肝細胞癌における腸内細菌の役割を検討する

研究課題名(英文) Evaluation of the role of gut-microbiota in NASH-associated HCC pathogenesis

研究代表者

今城 健人 (IMAJO, KENTO)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：30600192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)由来肝細胞癌(HCC)の病態進展機序における腸内細菌及び腸管由来エンドトキシン(ET)の役割を検討することであった。便メタゲノム解析により、NASH由来HCCモデルマウスの便中では非HCCマウスに比しFaecalibacteriumの占拠率が低下していた。この結果はヒトHCC患者と同様の結果であった。また、このHCCモデルマウスへのFaecalibacterium投与によりHCCの個数の減少及び大きさの低下を認めた。NASH由来HCCの進展機序として腸管透過性の亢進が考慮されるが、Faecalibacteriumの投与により改善を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASH由来肝細胞癌は増加の一途を辿っている。本研究は腸内細菌がNASH由来肝細胞癌に関わることのみならず、腸内細菌の是正がNASH由来肝細胞癌を抑制できる可能性を示唆するものである。将来的に肝細胞癌の予防や治療において、腸内細菌や腸管透過性へのアプローチといったこれまでとは全く異なる選択肢へとつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study was to investigate the role of gut-microbiota and endotoxin (ET) in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)-associated hepatocellular carcinoma (HCC). By fecal metagenomic analysis, the occupation rate of Faecalibacterium was lower in the feces of NASH-associated HCC model mice than in non-HCC mice. This result was similar to that of human HCC patients. Moreover, administration of Faecalibacterium to these HCC model mice resulted in a decrease in the number and size of HCC. Although increased intestinal permeability is considered as a mechanism of progress of NASH-derived HCC, improvement was observed by administration of Faecalibacterium.

研究分野：肝臓

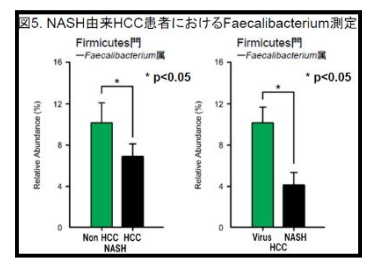
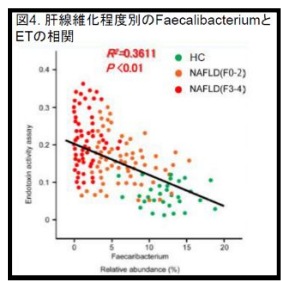
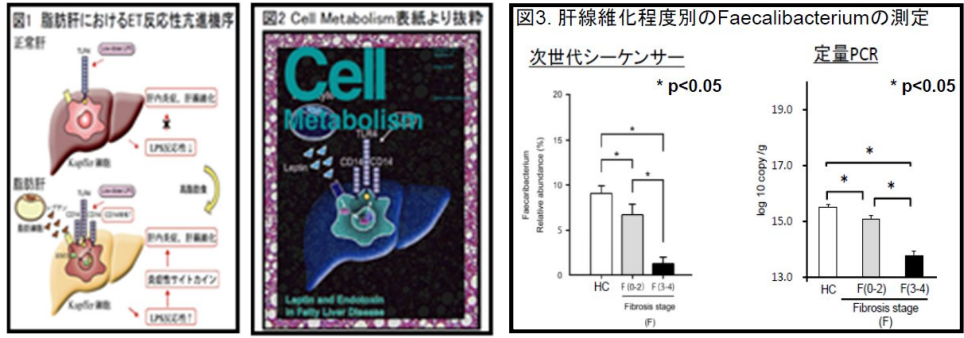
キーワード：NASH由来肝細胞癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初の背景

NASHは肥満、糖尿病、高脂血症、高血圧などの生活習慣病をbaseに発生するため近年劇的に増加している。NASHの約50%が進行性で、10年間で20%が肝硬変に移行し、最終的に肝細胞癌(hepatocellular carcinoma: HCC)に進行することが報告されている。事実、B型肝炎もC型肝炎も原因でないNASH由来のHCCの割合が増加している(文献1)。しかしながら、その発症機序の詳細はわかっておらずそのため化学予防など行えないのが現状である。NASH由来HCCも背景に肝線維化を伴うことが多いが、その線維化のリスクとしては炎症が挙げられる。NASHにおける炎症には腸内細菌由来のETが関与することが知られている。ETによるNASH病態進展機序に関しては、肥満者では腸管内における細菌の異常増殖が生じ、ET絶対量増加による炎症がNASH病態進展に関与すると信じられてきた(文献2)。しかし、門脈中ET量は肥満者においてもせいぜい健常者の二倍程度でありこの現象のみではNASH病態を説明することはできない。ここで我々は肝臓でのET感受性に着目した。即ち、我々は健常人では肝炎を起こさない微量のETに対して肥満者では肝臓で過剰に応答して肝炎を起こすET感受性亢進機序の解明といった肝臓側の因子に着目し報告した(文献3)(図1,図2)。



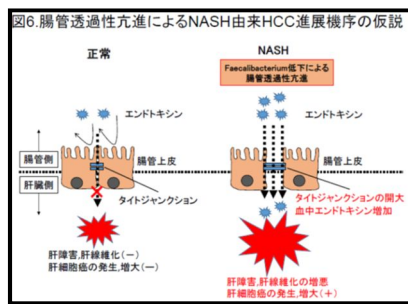
Host側の因子に着目したET過剰応答機序はこれまで報告がなされておらず、新規性が高くかつ独創的であるとされ、Cell MetabolismのEditorialにも取り上げられている。即ち、NASHではET絶対量の増加に加えてET過剰応答が病態進展に関与すると考えられる。さらに我々は最近、ETの絶対量増加の原因

として腸内細菌叢の変化が関係することを示しつつある。次世代シーケンサーを用いた便の解析により、NASHでは腸内細菌叢の異常(dysbiosis)があること、また腸内細菌の異常に伴い腸管透過性の亢進が生じること(Leaky Gut Syndrome(LGS)と呼ばれる)を証明しつつある。具体的には、肝生検を施行したNASH患者の便メタゲノム解析を行ったところ、軽度線維化進行例に対して高度線維化進行例ではFecalibacterium属の著明な占拠率の低下を認めた(図3)。

さらに同患者に対して血中ET活性を測定し、高度線維化進行例においては著明なETの増加を認めた(図4)。さらにFecalibacterium属の占拠率と血中ET活性は有意な負の相関を示していた(図4)。即ち、Fecalibacteriumは善玉腸内細菌であり、本菌の低下がNASH病態進展に関与すると考える。ここで我々は、NASH由来HCC患者においても便のメタゲノム解析を行うこととした。コントロールとして非発癌NASH及びウイルス性のHCC患者の便との比較を行ったところ、数種類の腸内細菌に差を認めたが、Fecalibacterium属も明らかな低下を認めていた(図5)。やはりFecalibacterium属の低下がNASH病態進展のみならずNASH由来HCCにも影響することを示唆する所見であった。

2. 研究の目的

本研究は、ヒトNASH由来HCCにおける腸内細菌叢及び腸管由来ETの関与を検討し、さらに得られた腸内細菌、現時点ではFecalibacterium属が有力であるが、これらがNASH由来HCCマウスでも同様に増加し、本菌への介入によりHCCがどのように変化するのかを検討していくことを目的としている(図6)。



3. 研究の方法

- 1) NASH由来HCC患者における便メタゲノム解析; NASH由来HCC患者の便検体を増やし、コントロール(非発がんやウイルス由来HCC)との比較を多数の検体で行う。
- 2) NASH由来HCC患者における血中ET活性測定及び腸管透過性の検討; NASH由来HCC患者における血中ET活性の測定及び腸管透過性の検査として知られるラクトコース・マンニトール試験を行う。
- 3) ヒトNASH類似HCCモデルマウスの便メタゲノム解析;

NASH 由来 HCC モデルマウスに対して便中メタゲノム解析を行い、非肝がんマウスとの腸内細菌叢の組成を検討する。また、同マウスで FITC dextran を用いた腸管透過性の検討を行う。

4) ヒト NASH 類似 HCC モデルマウスへの Fecalibacterium 投与による検討；NASH 由来 HCC モデルマウスに対して Fecalibacterium をノトバイオト下で投与することで起こる肝臓の表現型を検討する。

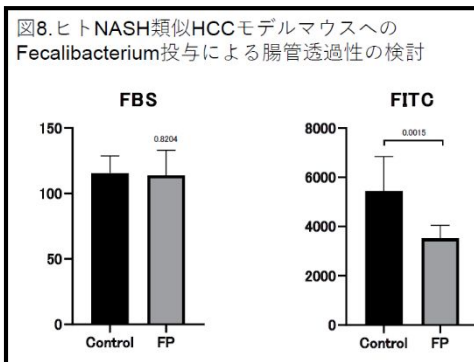
#### 4. 研究成果

1) NASH 由来 HCC 患者における便メタゲノム解析；NASH 由来 HCC 患者の便検体を用いて、NGS(Illumina MiSeq)を用いたメタゲノム解析を行い、HCC 患者の便中には非 HCC 患者及び非 NASH 由来の HCC 患者に比し Faecalibacterium の占拠率が低下していた。

2) NASH 由来 HCC 患者に対してラクツロース・マンニトール試験を 10 例で行った。非 HCC 患者及び非 NASH 由来の HCC 患者に比し、腸管透過性亢進が示唆された。また、血中 ET 活性は腸管透過性と相関していた。

3) ヒト NASH 類似 HCC モデルマウスの便メタゲノム解析；NASH 由来 HCC モデルマウスの便及び非 HCC マウスの便検体を用いて、NGS(Illumina MiSeq)を用いたメタゲノム解析を行ったところ、ヒト HCC 患者同様、HCC モデルマウスの便中では非 HCC マウスに比し Faecalibacterium の占拠率が低下していた。

4) ヒト NASH 類似 HCC モデルマウスへの Fecalibacterium 投与による検討；NASH 由来 HCC モデルマウスに対してゾンデを用いて Fecalibacterium の経口投与を行ったところ、HCC の個数の減少及び大きさの低下を認めた(図 7)。さらに、FITC dextran を用いた腸管透過性の評価を行ったところ、本マウスでは非発がんマウス(コントロール；普通食負荷 B6 マウス)に比し腸管透過性が亢進し、かつ Fecalibacterium の投与により腸管透過性が改善していた(図 8)。また、同時に腸管透過性に関与する Zo-1 や Claudin の改善も認めた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 結束貴臣、今城健人、中島淳
2. 発表標題 高果糖や高コレステロール食がもたらすLeaky gut syndromeに対するFaecalibacterium prausnitzii治療の検討
3. 学会等名 JDDW 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 結束貴臣、今城健人、中島淳
2. 発表標題 Faecalibacterium improves pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis via controlling Treg induced gut-permeability
3. 学会等名 EASL 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 結束貴臣、今城健人
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎とその関連病態に対するFaecalibacterium prausnitziiの効果
3. 学会等名 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takaomi Kessoku, Kento Imajo
2. 発表標題 Faecalibacterium improves pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis via controlling Treg induced gut-permeability
3. 学会等名 European Association for the Study of the Liver 2018 (国際学会)
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	斉藤 聡 (Saito Satoru)  (00275041)	横浜市立大学・附属病院・准教授  (22701)	
研究分担者	留野 涉 (Tomeno Wataru)  (00644957)	横浜市立大学・医学研究科・客員講師  (22701)	
研究分担者	本多 靖 (Honda Yasushi)  (00784844)	横浜市立大学・附属病院・助教  (22701)	
研究分担者	米田 正人 (Yoneda Masato)  (10423831)	横浜市立大学・附属病院・講師  (22701)	
研究分担者	小川 祐二 (Ogawa Yuji)  (20644959)	横浜市立大学・医学部・助教  (22701)	
研究分担者	中島 淳 (Nakajima Atsushi)  (30326037)	横浜市立大学・医学研究科・教授  (22701)	
研究分担者	結束 貴臣 (Kessoku Takaomi)  (30738620)	横浜市立大学・附属病院・助教  (22701)	