

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19780

研究課題名（和文）大規模調査による非アルコール性脂肪性肝疾患と腸内細菌叢の関連の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the relationship between non-alcoholic fatty liver disease and gut flora by large number of participants

研究代表者

遠藤 哲（ENDO, Tetsu）

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00322933

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：1,148人の腸内細菌を解析した。腸内細菌は便検体を用いて16srRNA遺伝子塩基配列より菌群の帰属を推定した。ウイルス性肝炎やアルコール飲酒（男性30g/日、女性20g/日以上）、特定の薬剤内服を除外した874人を対象とし、腹部超音波検査にて脂肪肝を認めたものをNAFLDとし、NAFLD群と正常群を比較した。全体の1%以上の存在率を認めたのは4門、6綱、7目、9科、12属であり、0門、2綱、2目、3科、3属で有意差がみられた。BMIと性別による調整を行い153組の比較検討を行うとRuminococcaceae科とFaecalibacterium属がNAFLD群で有意に存在率の低値を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、様々な疾患の罹患と腸内細菌叢の関連が示唆され、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）についても報告されてきている。しかし、結果については一定しておらず、これまでの報告は医療機関をベースにした数十例程度のものを比較したものであることが理由の一つとして挙げられる。今回行った、一般住民を対象とした1,000名規模の調査での報告は前例がなく、学術的意義に富むと考える。肥満や性別による調整を行い153組をマッチ後に行った比較検討でRuminococcaceae科とFaecalibacterium属がNAFLD群で有意に存在率の低値を認めており、NAFLD発生抑制と関連するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：In total, 1,148 adult participated in the healthy survey. The relative abundance of each bacterial taxa in fecal samples was calculated using 16S ribosomal RNA amplification. Of these, we excluded 44 participants with viral hepatitis, 196 participants with excess alcohol intake, six participants administered agents associated with steatosis. NAFLD was defined as fatty liver by ultrasonography. There were significant differences in the relative abundance of more than 1% in two classes, two orders, three families, and three genera between NAFLD and non-NAFLD participants. To exclude the influence of obesity and sex, NAFLD participants were matched to non-NAFLD participants based on BMI and sex. After matching, 153 matched pairs were obtained. In terms of the relative abundance of more than 1%, the relative abundance of two taxa, including the family Ruminococcaceae and the genus Faecalibacterium, was significantly lower in NAFLD participants than in non-NAFLD participants.

研究分野：消化器内科学

キーワード：NAFLD 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

(1)わが国の NAFLD の現状

非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) を含む飲酒習慣のない脂肪肝による疾患群を NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) とよび、わが国では 2000 万人ほどの患者がいると考えられている。現在本邦では、成人男性の約 3 割が脂肪肝であることが知られており、脂肪肝のうち約 2 割が脂肪肝炎、さらには肝硬変、肝細胞癌になる。最近では食事の欧米化と運動不足によるいわゆるメタボリックシンドロームが増加しており、それとともに NASH を背景肝とした肝細胞癌が増加している。

NASH の病態には、遺伝的素因や環境因子の他、脂肪組織から分泌されるサイトカイン、腸内細菌叢などさまざまな因子がかかわっている。近年の腸内細菌研究の進歩により、メタボリックシンドロームを含む代謝性病態と腸内細菌の関連が注目され、肥満者や NASH 患者では腸内細菌叢が量的・質的に変化していることが報告された (Ley RE, et al. *Nature* 2006, Zhu L, et al. *Hepatology* 2013)。しかしながら、腸内細菌叢と NASH 発症の病態については、腸内細菌叢の変化が原因なのか結果なのかも不明である。

(2)腸内細菌からみた NAFLD の研究

基礎研究

無菌マウスは過栄養負荷を与えても肥満になりにくい一方で、肥満マウスの腸内細菌を無菌マウスに移植すると肥満を呈する。さらに無菌マウスと通常飼育マウスを比較すると、通常飼育マウスでは食事摂取量が少ないにもかかわらず基礎代謝が高く、体重が重く、脂肪組織や肝臓への脂肪の蓄積が亢進している (Bached F, et al. *PNAS* 2004)。このことから、肝臓への脂肪蓄積に対して重要な役割を担っていることがわかる。

臨床研究

ヒトにおいては、肥満群では *Firmicutes* が増加し、相対的に *Bacteroides* が減少していることが報告されている (Kasai C, et al. *BMC Gastroenterol* 2015)。このように腸内細菌叢がメタボリックシンドローム、NAFLD の発症に多大な影響を与えることは間違いないが、具体的にどの細菌が発症促進的にはたらき、どの細菌が抑制的にはたらくのかなど、不明な点は非常に多い。そこで、NAFLD と腸内細菌叢の関係について、大規模な一般住民健診から明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) を含む飲酒習慣のない脂肪肝による疾患群を NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) とよび、わが国では 2000 万人ほどの患者がいる。本邦では、脂肪肝のうち約 2 割が肝性肝炎、さらには肝硬変、肝細胞癌を発症する。最近、メタボリックシンドロームの増加に伴い、NAFLD を背景肝とする肝細胞癌が増えている。

NAFLD の病態には、遺伝的素因や環境因子の他、サイトカイン、腸内細菌叢などさまざまな因子がかかわっている。近年、肥満者や NAFLD 患者では腸内細菌叢が変化していることが報告された (Ley RE, et al. *Nature* 2006, Zhu L, et al. *Hepatology* 2013)。しかしながら、腸内細菌叢と NAFLD 発症の病態については、腸内細菌叢の変化が原因なのか結果なのかも不明であり、未だ十分に解明されていない。

そこで、NASH/NAFLD と腸内細菌叢の関係について大規模な一般住民健診から明らかにするため、

本研究を立ち上げるに至った。

3 . 研究の方法

(1)研究の参加者

本研究では、弘前大学大学院医学研究科の岩木地区健康増進プロジェクトに参加した 1,148 人のうち、44 人を HBs 抗原または HCV 抗体陽性のため、196 人を男性 30g / 日、女性 20g / 日以上飲酒のため、6 人を脂肪肝と関連する薬剤の服用のため、23 人を糞便サンプルの欠損のため除外し、874 人（男性 323 人、女性 551 人）を対象とした（Fig.1）。

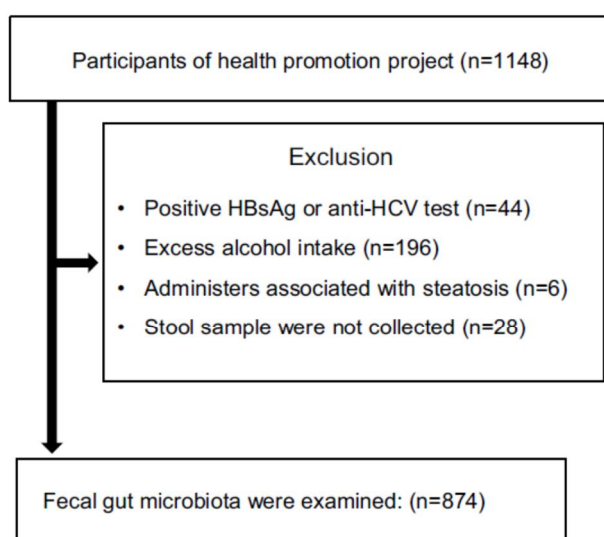


Fig. 1 Flowchart for participant selection. A total of 874 participants were enrolled from 1148 adults who participated in the Iwaki Health Promotion Projects in 2016

(2)NAFLD の診断

腹部超音波検査を 5 人の 5 年以上の経験のある消化器内科医が行い、その画像から一人の 20 年以上経験のある消化器内科医が脂肪肝の有無を判定した。

(3)生化学指標

絶食の血清生化学検査を施行した。AST、ALT、T.Bil、血糖、インスリン、HbA1c、尿酸、総コレステロール、中性脂肪、血小板数、HBs 抗原、HCV 抗体を測定。BMI = 体重 / 身長²、HOMA-IR = 血糖 X インスリン / 405、FIB-4 index = 年齢 X AST / 血小板数 X square root ALT を計算して用いた。

(4)便検体からの腸内細菌叢解析

腸内細菌解析は T-RFLP (Terminal Restriction Fragment length Polymorphysm) 法 (テクノスルガラボ、静岡) で解析した。-80 で保存した便検体より DNA を抽出し、既報 (Takahashi S, et al. *Pros One* 2014) の通り 16SrRNA をターゲットとしたプライマーを使用した。

(5)統計解析

統計解析は JMP ver. 12.1 (SAS Institute, Cary, NC) と R (R Foundation for Statistical Computing, version R-3.4.3) を使用した。P 値 < 0.05 を有意とした。

4 . 研究の成果

腹部超音波検査により、205 人 (23.5%) が NAFLD と診断された。NAFLD 群と non-NAFLD 群では BMI、AST、ALT、HOMA-IR、HbA1c、Fib-4 index で有意差が認められた (Table 1)。

Table 1 Characteristics before and after matching

Variables	Non-NAFLD n=669	NAFLD n=205	p value	Non-NAFLD n=153	NAFLD n=153	p value
Sex, male ^a	203 (30.3%)	120 (58.5%)	<0.001	59 (38.6%)	59 (38.6%)	1.000
Age (year) ^b	53.8±17.1	55.1±14.2	0.353	53.9±16.8	56.0±12.6	0.191
BMI (kg/m ²) ^b	22.0±3.1	25.4±4.8	<0.001	24.4±2.4	24.4±2.4	0.979
Waist circumference (cm) ^b	81.7±8.7	92.5±9.2	<0.001	88.2±7.8	89.3±6.2	0.069
AST (U/L) ^b	21.5±7.3	26.2±10.9	<0.001	21.5±8.7	25.3±9.3	<0.001
ALT (U/L) ^b	18.3±10.9	32.1±19.6	<0.001	20.2±14.9	30.0±18.2	<0.001
T-bil (mg/dL) ^b	0.80±0.28	0.77±0.29	0.170	0.76±0.26	0.78±0.29	0.625
Glucose (mg/dL) ^b	90±21	98±19	<0.001	93±21	97±16	0.090
Insulin (μU/mL) ^b	4.8±2.5	8.2±7.9	<0.001	5.8±3.0	7.7±8.5	0.013
HOMA-IR ^b	1.1±0.7	2.0±2.2	<0.001	1.3±0.8	1.9±2.4	<0.001
Hemoglobin A1c (%) ^b	5.8±0.6	6.2±0.8	<0.001	5.9±0.7	6.1±0.7	0.002
Uric acid (mg/dL) ^b	4.7±1.4	5.6±1.9	<0.001	4.9±1.2	5.5±1.4	<0.001
Total cholesterol (mg/dL) ^b	203±36	212±34	0.003	203±32	213±32	0.010
Triglycerides (mg/dL) ^b	82±44	131±88	<0.001	91±47	125±71	<0.001
Platelet (×10 ⁴ /μL) ^b	24.1±5.3	26.1±6.3	<0.001	24.4±5.9	26.2±6.2	0.007
Fib-4 index ^b	1.27±0.71	1.12±0.56	0.005	1.25±0.80	1.11±0.51	0.083

ALT alanine aminotransferase, AST aspartate aminotransferase, BMI body mass index, HOMA-IR homeostasis model assessment of insulin resistance, T-bil total bilirubin

^aPercentage

^bMean±standard deviation

本研究で 22 門、44 綱、63 目、139 科、393 属の腸内細菌が確認された。そのうち全体の 1%以上の存在率を認めた 4 門、6 綱、7 目、9 科、12 属について 2 群間で比較を行った。2

綱、2 目、3 科、3 属で 2 群間に有意差を認めた。その中の *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Lachnospiraceae_incertae_sedis* 属では有意に NAFLD 群で存在率が低値を示した(Table 2)。

性別と BMI で調節した 153 組でも比較検討を行った。調整後の 2 群間の腸内細菌叢では *Ruminococcaceae* 科と *Faecalibacterium* 属が NAFLD 群で有意に存在率が低値であった。

これまでに NAFLD と腸内細菌叢の関連についてはいくつかの報告がみられるものの一定の見解は得られていない。本研究は大規模な一般住民を対象として NAFLD 群と non-NAFLD 群の腸内細菌叢を比較検討し、性別と BMI の調整後においても違いを認められ、NAFLD の発生と腸内細菌叢の変化が関連することが示唆された。

Faecalibacterium 属は嫌気性の酪酸産生菌であり、これまでに炎症性腸疾患や過敏性腸症候群、Celiac 病などで減少することが報告されている。また血清のリポ多糖類の値と逆相関することが報告されており、血清リポ多糖類の上昇は NAFLD の発症と関連することが報告されている他、肝線維化との関連も報告されている。本研究では Fib-4 index の値から NASH と考えられたのは 2%未満と少数であり、NASH への進展や肝線維化との関連については検討できなかった。しかし、今後 NAFLD と診断された患者を追跡調査することで NASH への進展や肝がんの発生と腸内細菌叢の関連が明らかにできる可能性がある。

Table 2 Median relative abundance of gut microbiota with 1% occurrence in the whole population (percentage of the total bacterial reads) between NAFLD and non-NAFLD subjects

	Before matching			After matching		
	Non-NAFLD	NAFLD	<i>p</i> value	Non-NAFLD	NAFLD	<i>p</i> value
Phylum						
<i>Firmicutes</i>	58.64	58.82	0.375	58.88	58.04	0.403
<i>Bacteroidetes</i>	24.88	25.69	0.269	24.88	26.02	0.675
<i>Actinobacteria</i>	8.03	8.92	0.991	9.26	9.41	0.851
<i>Proteobacteria</i>	1.59	1.55	0.278	1.77	1.59	0.292
Class						
<i>Clostridia</i>	48.23	46.40	0.015	49.14	46.40	0.067
<i>Bacteroidia</i>	24.86	25.66	0.261	24.88	26.02	0.671
<i>Actinobacteria</i>	8.02	8.92	0.991	9.26	9.41	0.851
<i>Negativicutes</i>	2.46	2.99	0.004	2.41	2.81	0.171
<i>Bacilli</i>	1.85	1.52	0.289	1.93	1.65	0.601
<i>Erysipelotrichia</i>	1.03	1.01	0.841	1.03	0.95	0.943
Order						
<i>Clostridiales</i>	48.20	46.40	0.015	49.13	46.40	0.067
<i>Bacteroidales</i>	24.86	25.66	0.261	24.88	26.02	0.671
<i>Bifidobacteriales</i>	5.87	5.15	0.465	6.17	5.73	0.593
<i>Selenomonadales</i>	2.46	2.99	0.004	2.41	2.81	0.171
<i>Coriobacteriales</i>	1.70	2.08	0.166	1.79	2.07	0.895
<i>Lactobacillales</i>	1.49	1.23	0.662	1.55	1.43	0.582
<i>Erysipelotrichales</i>	1.03	1.01	0.841	1.03	0.95	0.942
Family						
<i>Lachnospiraceae</i>	26.07	25.55	0.586	26.37	26.61	0.965
<i>Ruminococcaceae</i>	16.29	14.94	0.007	15.96	14.66	0.016
<i>Bacteroidaceae</i>	16.41	13.98	0.032	17.99	12.79	0.096
<i>Bifidobacteriaceae</i>	5.87	5.15	0.465	6.17	5.72	0.593
<i>Coriobacteriaceae</i>	1.70	2.08	0.166	1.79	2.08	0.895
<i>Veillonellaceae</i>	1.46	1.85	0.024	1.69	1.82	0.482
<i>Porphyromonadaceae</i>	1.78	1.75	0.828	1.71	1.70	0.837
<i>Erysipelotrichaceae</i>	1.03	1.01	0.841	1.03	0.95	0.942
<i>Streptococcaceae</i>	1.17	1.00	0.489	1.25	1.12	0.709
Genus						
<i>Bacteroides</i>	9.93	7.75	0.024	9.84	7.70	0.097
<i>Faecalibacterium</i>	7.97	6.86	0.025	7.92	6.55	0.018
<i>Blautia</i>	6.13	6.29	0.644	6.14	6.69	0.432
<i>Bifidobacterium</i>	5.90	5.18	0.376	6.30	5.54	0.562
<i>Anaerostipes</i>	3.89	3.54	0.629	3.77	3.86	0.655
<i>Roseburia</i>	3.01	3.41	0.752	4.48	3.44	0.246
<i>Ruminococcus2</i>	3.61	3.26	0.759	3.88	3.18	0.381
<i>Collinsella</i>	2.51	3.15	0.085	2.96	3.07	0.824
<i>Gemmiger</i>	2.31	1.87	0.234	2.34	1.67	0.445
<i>Lachnospiraceae_incertae_sedis</i>	1.86	1.63	0.031	1.81	1.74	0.407
<i>Fusicatenibacter</i>	1.48	1.58	0.457	1.49	1.62	0.239
<i>Ruminococcus</i>	1.55	1.31	0.402	1.02	1.15	0.595
<i>Clostridium IV</i>	1.01	0.85	0.288	0.89	0.86	0.704

Bold indicates significance

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chikara Iino, Tetsu Endo, Kenichiro Mikami, Takuma Hasegawa, Masayo Kimura, Naoya Sawada, Shigeyuki Nakaji, Shinsaku Fukuda	4. 巻 13
2. 論文標題 Significant decrease in Faecalibacterium among gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease: a large BMI- and sex-matched population study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology International	6. 最初と最後の頁 748-756
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s12072-019-09987-8	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯野勢、遠藤哲、福田眞作
2. 発表標題 大規模調査によるNAFLDにおける腸内細菌叢の変化
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤哲、木村昌代、五十嵐剛、澤田直也、三上健一郎、福田眞作
2. 発表標題 一般住民におけるHBs抗原、HCV抗体陽性者の現状
3. 学会等名 第59回日本消化器病学会大会
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
---------------------------	-----------------------	----