

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08012

研究課題名(和文) C型肝炎治癒後の発癌ハイリスク群囲い込みを可能にする腸内細菌叢モデルの実用化

研究課題名(英文) Practical application of intestinal flora model that can find high-risk group for carcinogenesis after HCV elimination

研究代表者

井上 貴子 (Inoue, Takako)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：00431700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：病期の異なるC型慢性肝炎(CHC)と健常人の血清胆汁酸組成、腸内フローラおよび肝組織RNAシーケンシング(RNA-Seq)データを用いてCHCと非CHCの肝内胆汁酸代謝酵素発現量を比較した。便中・血清胆汁酸組成は病初期から変化した。CHCでは便中デオキシコール酸(DCA)量が健常人と比較して有意に減少した。CHCでは病初期から胆汁酸代謝古典的経路の主要酵素cytochrome P450 8B1(CYP8B1)の発現量が有意に低下していた。さらに便中DCA量は腸内フローラでのレンサ球菌属の相対量と逆相関し、CHCで見られるdysbiosisの特徴は便中DCA減少と関連していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はC型慢性肝炎患者(CHC)の腸内フローラが病初期から変化し、病期進行につれて腸内フローラの破綻(dysbiosis)が顕著になることを報告した(Clin Infect Dis. 2018)。本研究ではC型肝炎治癒後の発癌ハイリスク群囲い込みを可能にする腸内フローラモデルの実用化を目的とした。研究結果からHCV感染では肝内での胆汁酸代謝酵素の発現異常とdysbiosisが胆汁酸代謝異常を引き起こし、gut-liver axisを変化させることが分かった。またCHCと他の肝疾患ではその結果が異なることも証明することができた。

研究成果の概要(英文)：The fecal BAs composition, gut microbiota, and transcriptional analysis of the liver from chronic hepatitis C (CHC) patients was compared with that from healthy individuals. CHC patients, even at earlier stages, showed BAs profiles distinct from healthy individuals, in which fecal deoxycholic acid (DCA) was significantly reduced and lithocholic acid or ursodeoxycholic acid became dominant. The decrease of fecal DCA was correlated with reduction of commensal Clostridiales and increase of oral Lactobacillales. Impaired biosynthesis of cholic acid (CA) was observed as a reduction of the transcription level of cytochrome P450 8B1 (CYP8B1), a key enzyme in CA biosynthesis.

研究分野：細菌学

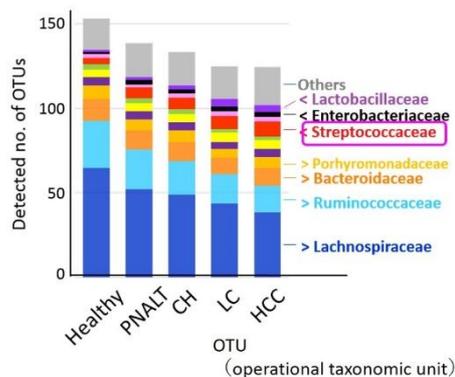
キーワード：腸内フローラ C型慢性肝炎 胆汁酸

### 1. 研究開始当初の背景

HCV は直接作用型抗ウイルス剤 (DAAs) での治療で、ほぼ 100% 排除可能となった。しかしウイルス学的著効 (SVR) 達成後も肝発癌を完全には抑制できず、肝線維化進展例 (F3-4) では SVR 達成後早期から肝発癌の可能性がある。今後 C 型慢性肝炎 (CHC) に対する方策は、既知 (肝線維化進展・高齢・男性・遺伝子多型) および未知の SVR 後肝発癌ハイリスク群の囲い込みが重要となる。

我々は腸肝循環に着目し、腸内細菌叢と SVR 達成後の予後、特に SVR 後発癌との関連について研究を開始した。病期の異なる CHC 166 症例の腸内細菌叢を健常人 23 名と比較し、HCV 感染により腸内細菌叢の変化が起こり、病態進展 (Persistently normal ALT [PNALT] 慢性肝炎 肝硬変 肝癌) に伴い細菌叢の構成が段階的に変貌 (dysbiosis) することを証明した (図 1) (Inoue T. et al., Clin Infect Dis. 2018)。

図 1



肝疾患の病態進展に伴い、腸内フローラにレンサ球菌 (Streptococcaceae) が増加した。Healthy: 健常人、PNALT: 無症候性キャリア、CH: 慢性肝炎、LC: 肝硬変、HCC: 肝癌合併肝硬変

Inoue T, Tanaka Y, et al. Clin Infect Dis. 2018; 67: 869-877.

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、CHC の SVR 後発癌や肝線維化進行の予測を可能にする腸内細菌叢モデルの実用化・バイオマーカーの開発である。CHC の SVR 後発癌や線維化に関係する腸内細菌叢の特徴を利用して、SVR 後発癌のハイリスク群を囲い込み、効率的な診断・治療を目指す。また発癌・線維化を予測可能にするバイオマーカーの開発・臨床応用によって、症例ごとに予後予測を的確に行うことができる。本研究で得られる成果から個別の病態進行 (発癌・線維化) 及びその改善予測が可能となり、CHC における包括的診断・治療の構築が実現できる。

### 3. 研究の方法

腸内フローラの同定と便中および血中胆汁酸の測定:

対象は当院及び研究協力機関に通院中する、本研究の趣旨に同意した CHC 患者である。SVR 達成前後の腸内フローラと便中・血中胆汁酸組成を同一患者で比較した。症例を前向きに観察し、SVR 達成後の病態進行 (発癌・線維化・代謝障害) と腸内細菌・胆汁酸との関連を明らかにした。腸内フローラは次世代型超高速 DNA シーケンサー-Illumina MiSeq を用いて同定し、特徴を明らかにした。便中・血中胆汁酸は液体クロマトグラフ質量分析計 (島津製作所、LCMS-8050) で測定した。

肝組織における胆汁酸代謝遺伝子の発現量解析 (RNA-Seq):

国際がんゲノムコンソーシアム (ICGC)・Liver Cancer - RIKEN, JP project から日本人 CHC 患者の RNA-Seq データを得た。本研究に参加する肝癌患者の一部は ICGC に登録されている。背景肝は新犬山分類の線維化指標 F0 (線維化なし) から F4 (肝硬変) を含んでいた。健常肝は CHC と年齢を一致させた死後肝組織や臓器提供

者由来であった。健常肝のデータは Sequence Read Archive から得た。

#### 4. 研究成果(現在論文投稿中)

便中・血清胆汁酸組成の変化は、CHC 病初期から現れていた。CHC では便中デオキシコール酸(DCA)量が健常人と比較して有意に減少したが、リトコール酸(LCA)量は不変であった(図2)。

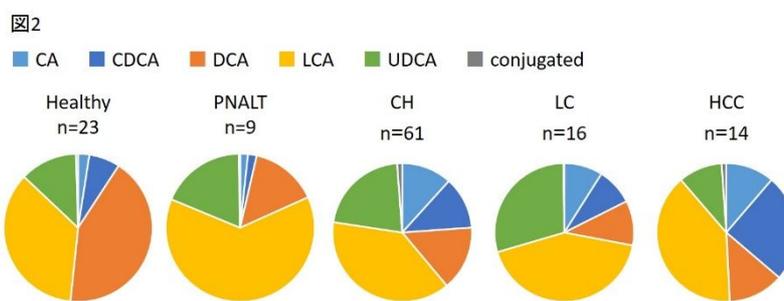


図2  
HCV感染によって、便中デオキシコール酸(DCA)が増加した。  
CA; コール酸、CDCA; ケノデオキシコール酸、LCA; リトコール酸、UDCA; ウルソデオキシコール酸、conjugated; 抱合型胆汁酸、Healthy; 健常人、PNALT; 無症候性キャリア、LC; 肝硬変、HCC; 肝癌合併肝硬変

図3

Genes	CHC F0-2 (n = 22) vs. Normal (n = 12)		CHC F3-4 (n = 42) vs. Normal (n = 12)	
	$p$		$p$	
CYP7A1	1.67E-02	*	6.38E-04	***
HSD3B7	6.69E-03	**	4.90E-06	***
CYP8B1	5.05E-02		3.84E-03	**
CYP27A1	2.33E-04	***	2.44E-02	*
CYP7B1	0.304		0.729	

\*\*\*;  $p < 0.001$   
\* ;  $p < 0.05$   
\*\*\*;  $p < 0.001$   
\*\* ;  $p < 0.01$

Significantly upregulated  
Significantly downregulated

Dunn (1964) Kruskal-Wallis multiple comparison  
p-values adjusted with the Benjamini-Hochberg method.  
(\* ,  $p < 0.05$ ; \*\* ,  $p < 0.01$ ; \*\*\* ,  $p < 0.001$ )

C型肝炎では胆汁酸代謝酵素HSD3B7、CYP8B1の発現が低下していた。

CHC; C型慢性肝炎、Normal; 健常肝

RNA-Seq データから、CHC では病初期から胆汁酸代謝古典的経路の主要酵素 cytochrome P450 8B1 (CYP8B1) の発現量が有意に低下していた(図3)。

図4

	% (相対比率として)				
	CA	CDCA	DCA	LCA	UDCA
<i>Streptococcus</i>	**	*	***		**
<i>Lachnospiraceae</i>	***	**	***	*	***
<i>Ruminococcaceae</i>	***	***	***	***	***

-1.0 1.0

Spearman's rank correlation test  
\*  $p < 0.05$   
\*\*  $p < 0.01$   
\*\*\*  $p < 0.001$

便中DCA量と  
相関 *Lachnospiraceae* *Ruminococcaceae*  
逆相関 *Streptococcus* (レンサ球菌)

さらに、便中DCA量は腸内フローラでのレンサ球菌属の相対量と逆相関し、CHCで見られる dysbiosis の特徴は便中 DCA 減少と関連していることが分かった(図4)。

以上の結果から、HCV 感染では肝内での胆汁酸代謝酵素の発現異常と dysbiosis が胆汁酸代謝異常を引き起こし、gut-liver axis を変化させることが分かった。今後この結果をモデル化し、実用化に向けてデータを蓄積する。さらには他の肝疾患との比較から、C型慢性肝炎に特徴的な gut-liver axis モデルを明確にし、dysbiosis 改善から病態疾患への介入を具体化する。当初の目的であるCHCのSVR後発癌や肝線維化進行の予測を可能にするバイオマーカーの発見と開発とともに、個別の病態進行(発癌・線維化)及びその改善予測を可能とする包括的診断・治療の構築を実現する。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoue T, Nakayama J, Moriya K, Kawaratani H, Momoda R, Ito K, Iio E, Nojiri S, Fujiwara K, Yoneda M, Yoshiji H, Tanaka Y.	4. 巻 67
2. 論文標題 Gut Dysbiosis Associated With Hepatitis C Virus Infection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 869-877
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cid/ciy205.	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13件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 井上貴子
2. 発表標題 C型肝炎でみられる腸内フローラの破綻と病態進展へのインパクト
3. 学会等名 第17回日本消化管学会総会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 貴子、飯尾 悦子、田中 靖人
2. 発表標題 HCV排除による腸内フローラ異常の改善と便中アンモニア量の変化
3. 学会等名 第43回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 貴子、大西 雅也、田中 靖人
2. 発表標題 HCV感染でみられる胆汁酸代謝異常と腸内フローラの破綻～NASH/NAFLDとの比較～
3. 学会等名 第24回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 貴子、大西 雅也、田中 靖人
2. 発表標題 C型肝炎ウイルス感染による腸肝軸 (gut-liver axis) の変化 ~ 胆汁酸代謝酵素の発現異常とdysbiosisが胆汁酸代謝に及ぼす影響 ~
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 貴子、瓦谷 英人、守屋 圭、飯尾 悦子、伊藤 清顕、松浦 健太郎、藤原 圭、米田 政志、吉治 仁志、田中 靖人
2. 発表標題 C型慢性肝炎患者にみられる腸内フローラ異常 (dysbiosis) の増悪因子と腸内代謝物との関連
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inoue T, Ohnishi M, Nakayama J, Isogawa M, Kawashima K, Funatsu Y, Tanaka M, Momoda R, Moriya K, Kawaratani H, Iio E, Nakagawa H, Suzuki Y, Matsuura K, Fujiwara K, Nakajima A, Yoshiji H, Tanaka Y
2. 発表標題 The bile acid dysmetabolism in gut-microbiota-liver axis in hepatitis C virus infection, which differs from that in non-alcoholic fatty liver disease
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting Digital Experience (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 貴子、松浦 健太郎、飯尾 悦子、松波 加代子、藤原 圭、野尻 俊輔、田中 靖人
2. 発表標題 直接作用型抗ウイルス薬治療でウイルス学的著効を達成したC型慢性肝疾患症例の長期的な代謝変化と腸内環境の評価
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 貴子、中山 二郎、守屋 圭、瓦谷 英人、伊藤 清顕、松波 加代子、飯尾 悦子、松浦 健太郎、藤原 圭、野尻 俊輔、米田 政志、吉治 仁志、田中 靖人
2. 発表標題 C型肝炎ウイルス感染によるDysbiosis(腸内フローラ異常)と病態進展へのインパクト
3. 学会等名 第163回名古屋市立大学医学会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 貴子、田中 靖人
2. 発表標題 C型肝炎ウイルス感染と腸内フローラ異常 ~Dysbiosis改善による病態進展制御の可能性~
3. 学会等名 第26回日本門脈圧亢進症学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 貴子、吉治 仁志、田中 靖人
2. 発表標題 C型肝炎患者の便中胆汁酸組成比の特徴と腸内フローラとの関係
3. 学会等名 第23回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 貴子
2. 発表標題 C型肝炎ウイルス感染によるDysbiosis(腸内フローラ異常)と病態進展へのインパクト
3. 学会等名 第70回名古屋市立大学医学会総会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue T, Nakayama J, Moriya K, Kawaratani H, Momoda R, Ito K, Iio E, Nojiri S, Fujiwara K, Yoneda M, Yoshiji H and Tanaka Y.
2. 発表標題 Gut microbiota dysbiosis in patients with chronic hepatitis C.
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上 貴子、吉治 仁志、田中 靖人
2. 発表標題 C型肝炎ウイルス感染による腸内細菌叢異常 (Dysbiosis) とC型肝炎病態進展へのインパクト
3. 学会等名 第22回肝臓学会大会
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
研究協力者	田中 靖人  (Tanaka Yasuhito)  (90336694)	熊本大学・大学院生命科学研究部・教授   (17401)	
研究協力者	中山 二郎  (Nakayama Jiro)  (40217930)	九州大学・農学研究院・教授   (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------