

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11002

研究課題名(和文)酪酸菌による体内脂肪再配分機構の解析

研究課題名(英文) Impact of butyrate-producing bacteria in the gut on fatty liver diseases.

研究代表者

加川 建弘 (KAGAWA, Tatehiro)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：30245469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪肝は近年増加しているメタボリックシンドロームの肝臓での表現型であり、有効な治療法の確立が喫緊の課題となっている。本研究では脂肪肝患者の腸内細菌、長期予後について解析するとともに酪酸菌による脂肪肝抑制効果につき検討した。脂肪肝患者の腸内細菌叢において酪酸産生菌の一部が減少していた。一部の脂肪肝動物モデルにおいて、酪酸菌投与は肝における脂肪蓄積を減少させる効果が認められた。脂肪肝患者の予後は、非アルコール性脂肪肝炎、糖尿病合併患者で不良であった。また、肝関連イベントの発生は、糖尿病合併、線維化進行、脂肪肝の程度が軽度であることがリスク因子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では脂肪肝の長期予後並びに、脂肪肝における酪酸産生菌の意義を検討した。脂肪肝の予後に糖尿病の合併が大きく関与していることが明らかとなり、予後を改善するには糖尿病のコントロールが重要であることが判明した。また、脂肪肝患者の腸内細菌叢において酪酸産生菌が減少していること、齧歯類の脂肪肝モデルで、酪酸菌の投与が肝の脂肪蓄積を軽減することが明らかとなり、今後、酪酸菌が脂肪肝の治療薬として使用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fatty liver is a hepatic phenotype of metabolic syndrome and effective therapy is awaited. In this study we analyzed the microbiomes and long-term prognosis in patients with histologically diagnosed fatty liver diseases and investigated the effect of *Clostridium butyricum* on hepatic fat deposition in rodent fatty liver models. We found that the prognosis was significantly worse in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and those with type 2 diabetes mellitus. The occurrence of liver-related events (hepatocellular carcinoma, hemorrhage from esophageal or gastric varices, ascites, hepatic encephalopathy, liver failure) was observed more frequently in patients with type 2 diabetes mellitus and those with advanced fibrosis, and those with milder steatosis. The proportion of butyrate-producing bacteria was reduced in the gut of fatty liver patients. Administration of *Clostridium butyricum* mitigated hepatic fat accumulation in rodent fatty liver models.

研究分野：肝臓病学

キーワード：脂肪肝 酪酸菌 腸内細菌

## 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) は肥満、糖尿病、インスリン抵抗性といったメタボリックシンドロームの肝臓での表現型とされ、肝臓のみを対象とするのではなく全身の代謝障害として捉え、その対策を考える必要がある。中でも NAFLD の 10-15% を占める脂肪肝炎 (NASH) は高率に肝硬変、肝細胞癌に進展するため、有効な治療法の確立が喫緊の課題となっている。

最近、腸内細菌が肥満や NAFLD の発症に密接に関係していることが報告され、注目を集めている (review: World J Gastroenterol 2014;20:16079)。無菌マウスに高脂肪食を与えても脂肪肝にならないこと、脂肪肝マウスに抗菌薬を投与すると脂肪肝が改善すること、NAFLD 患者では腸内細菌叢が変化していることから、NAFLD の発症において腸内細菌が決定的な役割を果たしていることが示唆されている。

一方、短鎖脂肪酸の一種である酪酸は抗炎症作用をはじめとする多彩な生理作用を有している (review: Clinical Epigenetics 2012;4:4)。酪酸菌 (MIYAIRI 588、以下、酪酸菌) は酪酸を多量に産生する芽胞形成性の偏性嫌気性グラム陽性桿菌であり、プロバイオティクスとして投与することにより、酪酸を介した抗炎症作用を発揮することが期待されている。実際、酪酸菌がコリン欠乏食で作成したラット脂肪肝を抑制したことが報告されている (PLoS One 2013; 8: e63388)。しかしながら、酪酸菌がどのような機序で肝における脂肪沈着を抑制しているのかは不明である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は脂肪肝モデル動物を用いて酪酸菌投与による脂肪肝抑制効果を明らかにすること、NAFLD 患者の腸内細菌叢の特徴、並びに酪酸産生菌の多寡を明らかにすること、NAFLD 患者の長期予後を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脂肪肝マウス、ラットの作成と酪酸菌投与の影響の解析

マウス strain、ラット strain、食餌、飼育期間、飼育環境を様々に変え、効率良く脂肪肝の作成できる条件の探索を行なった。

脂肪肝マウス、マウスに様々な条件で酪酸菌を投与し、下記のものを解析した。

- 食餌摂取量、体重、肝重量、大腸、小腸の重量、白色脂肪組織、褐色脂肪組織の重量、筋肉 (足底筋、ヒラメ筋、腓腹筋、前脛骨筋、長指伸筋) の重量
- 各組織のマイクロアレイ解析、メタボローム解析
- 肝組織中の中性脂肪、コレステロール、リン脂質の定量的解析
- 肝組織の脂肪染色

#### (2) 脂肪肝患者における酪酸産生菌の解析

対象

単純性脂肪肝、NASH 患者。比較として、健常人、慢性肝炎、肝硬変、肝がん、原発性胆汁性胆管炎 (PBC)、自己免疫性肝炎 (AIH)、糖尿病患者のサンプルも解析した。

腸内細菌叢の解析：便から bead beating 法により DNA を抽出し、次世代シーケンサーにより V3-V4 領域のペアエンド配列のメタ 16S rRNA 遺伝子を解析し、アンプリコン解析から腸内細菌叢の分布を作成した。腸内細菌叢の多様性を健常人と比較するほか、特定の細菌が増加、あるいは減少していないか検討した。

酪酸産生能の解析：酪酸は腸内細菌が有する butyryl CoA:acetate CoA-transferase (but)、あるいは butyrate kinase (buk) により産生される。but 遺伝子は、産生する菌種により、さらに but (F) (*Faecalibacterium prausnitzii* [Clostridium クラスタ IV] に主に存在する)、but (R) (*Roseburia* 属、*Eubacterium* 属 [Clostridium クラスタ XIVa] に主に存在する) に分けられる。一方、buk 遺伝子はミヤリ菌などの *Clostridium* 属 (*Clostridium* クラスタ I) に存在する。この 3 つの遺伝子をリアルタイム PCR にて定量的に解析し、健常人と比較した。

#### (3) NAFLD 患者の予後解析

1975-2012 年に肝生検で脂肪肝と診断され、6 か月以上経過観察された症例を対象とした。病理標本を病理が全例再評価するとともに、診療録から脂肪肝以外の原因による肝障害を除外した。生検時の体重、BMI、血液検査データ、飲酒、喫煙、合併症、生活習慣を調査した。現在の状況を把握するため、診療録を調査するとともに、郵送でアンケート調査を行った。患者の予後、肝疾患イベント (肝細胞癌、食道静脈瘤破裂、腹水、肝性脳症) の発症に関与する患者背景因子や組織因子を Cox 比例ハザードモデルで解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 齧歯類を用いた脂肪肝に対する酪酸菌の影響の解析

種々のマウス、ラット、食餌、飼育期間、飼育環境を工夫し、脂肪肝モデルの作成を行なった。個体差が大きかったが、酪酸菌投与群で非投与群に比し、体重、肝重量の減少が認められた。また組織学的にも肝脂肪の減少が確認され、生化学的な解析でも中性脂肪量の減少が確認された。一方、酪酸菌投与群では筋肉量の増加傾向が認められ、ミオスタチンの発現低下が見られた。盲腸内容物のメタボローム解析では、酪酸菌投与群でビタミン B 群の増加、胆汁酸の低下、脂肪酸の増加、リン脂質の低下が認められた。肝のメタボローム解析では、酪酸菌投与群で分岐鎖アミノ酸の増加、タウロコール酸の増加が見られた。肝のマイクロアレイ解析では *cd36* や *cidea*、*nfe2l2* の発現に差が見られた。以上から酪酸菌は脂肪肝を軽減する効果だけではなく、多臓器に様々な影響を与える可能性が示唆された。

##### (2) NASH、単純性脂肪肝患者の腸内細菌、酪酸産性能の解析

NASH 20 例、単純性脂肪肝 20 例の他、比較として慢性肝炎 15 例、肝硬変 10 例、PBC 11 例、肝細胞癌 4 例、健常コントロール 28 例の解析を行った。健常コントロールではバクテロイデス門が 33.1%、ファーミキューテス門が 60.8%、アクチノバクテリア門が 1.5%、プロテオバクテリア門が 0.8%、その他が 3.8%であった。

これに対し、NASH 群ではバクテロイデス門が 22.2%、ファーミキューテス門が 67.8%、アクチノバクテリア門が 7.0%、プロテオバクテリア門が 0.9%、その他が 2.1%であり、コントロールに比し、バクテロイデス門が少なく、ファーミキューテス門が多いという結果であった。一方、単純性脂肪肝ではバクテロイデス門が 46.0%、ファーミキューテス門が 50.3%、アクチノバクテリア門が 1.8%、プロテオバクテリア門が 0.6%、その他が 1.3%であり、バクテロイデス門が多く、ファーミキューテス門が少なかった。

一方、比較として採取した慢性肝炎ではバクテロイデス門が 17.4%、ファーミキューテス門が 71.3%、アクチノバクテリア門が 6.6%、プロテオバクテリア門が 2.4%、その他が 2.4%、肝硬変ではバクテロイデス門が 14.2%、ファーミキューテス門が 76.0%、アクチノバクテリア門が 4.4%、プロテオバクテリア門が 3.6%、その他が 1.7%、肝細胞癌ではバクテロイデス門が 16.7%、ファーミキューテス門が 75.4%、アクチノバクテリア門が 6.1%、プロテオバクテリア門が 0.8%、その他が 1.0%、PBC ではバクテロイデス門が 20.2%、ファーミキューテス門が 72.4%、アクチノバクテリア門が 5.5%、プロテオバクテリア門が 0.7%、その他が 1.1%であった。

各疾患の Shannon 指数は AIH 3.86、コントロール 3.35、慢性肝炎 3.58、糖尿病 2.73、単純性脂肪肝 2.75、肝細胞癌 3.27、肝硬変 3.68、NASH 3.39、PBC 3.42 であった。

酪酸産生酵素である *but (F)* が検出された症例の割合は、ほとんどの疾患群で 100%であったが、単純性脂肪肝で 50%、NASH で 91.7%であった。*but (R)* が検出された症例の割合も、ほとんどの疾患で 100%であったが、単純性脂肪肝で 75%、NASH で 75%、肝硬変で 90%であった。*buk* に関しては、コントロールで 52.2%、単純性脂肪肝で 25%、NASH で 33.3%、肝硬変で 30%、肝細胞癌で 50%、PBC で 9.1%、AIH で 50%、糖尿病で 0%であった。また、近年肥満との関連が指摘されている *Akkermansia muciniphila* を検出した症例の割合はコントロールで 34.8%、単純性脂肪肝で 0%、NASH で 33.3%、肝硬変で 30%、肝細胞癌で 25%、PBC で 9.1%、AIH で 50%、糖尿病で 0%であった。今回の解析では各疾患群において腸内細菌叢の門レベルでの明らかな違いは検出されなかった。*but (F)* や *but (R)* はコントロール群においてすべての症例で検出されたが、単純性脂肪肝、NASH、肝硬変では一部の症例で検出できなかった。また酪酸菌などの *Clostridium* 属 (*Clostridium* クラスター I) が有する *buk* 遺伝子の検出率も単純性脂肪肝、NASH、肝硬変、PBC で低かった。さらに、肥満者において菌数の低下が指摘されている *Akkermansia muciniphila* の検出率は単純性脂肪肝、PBC で低値であった。

##### (3) NAFLD 患者の長期予後の解析

1975 年 3 月から 2012 年 12 月までに東海大学で肝生検を施行され、組織学的に NAFLD と診断された 223 例を追跡しその予防を調査した。その結果、単純性脂肪肝患者が 56 例で NASH 患者が 167 例で、追跡期間の中央値は 19.5 年であった。単純性脂肪肝 56 例のうち死亡したのはわずか 1 例であったが、NASH 167 例のうち 22 例 (13.2%) が死亡した。 Kaplan-Meier 曲線でも NASH 患者の方が明らかに予後不良であった。死亡原因で最も多かったのは心血管疾患と非肝臓悪性腫瘍で共に 22%を占めていた。肝臓関連死では 13%の症例で認められ、肝細胞癌が 4%、それ以外が 9%であった。全死亡に影響を与える因子は、年齢 (HR 1.09、 $P=0.001$ ) と糖尿病の合併 (HR 2.87、 $P=0.021$ ) であった。肝臓関連イベント (の発生に影響を与える因子は、年齢 (HR 1.12、 $P=0.001$ ) 糖尿病の合併 (HR 6.08、 $P=0.004$ ) 肝脂肪の少ないこと (HR 0.23、 $P=0.018$ ) 肝線維化進行 (HR 5.87、 $P=0.015$ ) であった。特に糖尿病の合併が NAFLD の予後に大きな影響を与えることが明らかとなった。

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 1件）

1. 著者名 Hirose Shunji, Matsumoto Koshi, Tatemichi Masayuki, Tsuruya Kota, Anzai Kazuya, Arase Yoshitaka, Shiraishi Koichi, Suzuki Michiko, Ieda Satsuki, Kagawa Tatehiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Nineteen-year prognosis in Japanese patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease: Lean versus overweight patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0241770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0241770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 広瀬俊治、松本光司、加川建弘、鶴谷康太、安斎和也、荒瀬吉孝、白石光一、家田さつき、鈴木秀和
2. 発表標題 NAFLDの長期予後解析 -非肥満型と肥満型の違いについて-
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 広瀬俊治、鶴谷康太、松本光司、加川建弘
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)患者の線維化改善に関する解析-複数回肝生検による予後解析-
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 広瀬俊治、鶴谷康太、松本光司、加川建弘
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患患者の糖尿病発症に関与する組織学的因子の解析
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 Shunji Hirose, Tatehiro Kagawa, Kota Tsuruya
2. 発表標題 Up to 40 Years Prognosis in Japanese Patients with Biopsy-Proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease
3. 学会等名 アメリカ肝臓学会2018
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------