

令和 2 年 4 月 19 日現在

機関番号：24402

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06147・19K21261

研究課題名(和文)腸内細菌による新規脂肪酸代謝物の肝疾患に対する作用機構の解明

研究課題名(英文)Effects of intestinal bacterial fatty acid metabolites on liver disease

研究代表者

神谷 知憲(Kamiya, Tomonori)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80823682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肥満誘導性肝がんに対する腸内細菌のリノール酸(LA)代謝物の効果を明らかにすることを目的とした。

肥満肝がん誘導マウスの肝臓には細菌のLA代謝物の蓄積が認められ、高LA食により増加した。高LA食マウスの便からLA代謝能を持つ株の単離に成功し、乳酸桿菌であった。またメタ16S解析から高LA食により増加した。さらに、高LA食により脂肪肝の抑制が認められ、LA代謝物との関係性について今後の研究課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食文化の変化による非アルコール性脂肪肝炎から発生する肝がんの治療・予防法の確立は重要な課題である。本研究は、必須脂肪酸であるリノール酸(LA)が肝がん抑制に働くメカニズムを追求しており、臨床現場に還元できる内容となっている。また、LAの供給量が増えることで、乳酸桿菌の増加が認められた。機能性が謳われるLA代謝物が肝臓に蓄積した結果から、LAがプロバイオティクスとして機能していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the effects of bacterial linoleic acid (LA) metabolites on obesity-induced liver cancer.

Accumulation of bacterial LA metabolites was observed in the liver, which was increased by a high-LA high fat diet (HFD). A strain with the ability to metabolize LA was successfully isolated from the stool of a high-LA HFD fed mouse and was *Lactobacillus*. This genus was also increased by the high-LA HFD from 16S rRNA sequencing analysis. Furthermore, suppression of fatty liver was observed with the high-LA HFD, and its relationship with LA metabolites is for further study.

研究分野：病態生理学

キーワード：腸内細菌 NASH リノール酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全ての生物は食物を摂取する必要があり、多様な機構を用いて体内に栄養素として取り込んでいる。消化酵素により分解された栄養素などを宿主が利用するためには代謝酵素が必須となる。代謝酵素は主に、宿主が持つもの、共生細菌が有しているものと大別され、同じ物質からでも異なる代謝産物が作り出される。腸内共生細菌の働きが近年注目を集めており、腸管での働きについては次世代シーケンス技術やノトバイオームマウスを用いて明らかとなってきた。一方で、腸で代謝された物質は、その多くが吸収された後に門脈を経て肝臓に入り、胆嚢を通り再び腸に戻る腸肝循環経路を通過する。経路中での腸内細菌による代謝は肝機能に充分影響があると考えられている。(図1)

近年、栄養バランスの偏った食事により脂肪肝が形成され、非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) の発症が社会問題となっている。NAFLD は炎症状態の非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) から、肝がんに至る場合がある。脂肪肝の主な原因である脂質、構成物である脂肪酸は、生体に必須であるが、摂取するバランスは重要である。脂肪酸の一種であるリノール酸 (LA) は、アラキドン酸に代謝される経路の他、腸内細菌が代謝する経路が存在する。最近、腸内細菌による LA 中間代謝物の機能性が報告されたが、生体おける影響はまだ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究の予備試験として、高 LA 含有高脂肪食給餌マウスに発がん誘導操作を実施したところ、対照群である低 LA 含有高脂肪食と比較し、肝腫瘍形成の抑制が確認された (図2)。そこで本研究は、腸内細菌による LA 代謝物が、肥満関連肝腫瘍形成を抑制するメカニズムの解明を目的とした。宿主が LA を代謝する過程で産出されるアラキドン酸は、シクロオキシゲナーゼによりプロスタグランジン E₂ (PGE₂) に代謝される。PGE₂ は発がん誘導やアレルギー誘発など炎症メディエーターとして知られており、本研究の予備試験の結果が相反することから、宿主でなく腸内細菌による LA 代謝物が発がん抑制に働いている可能性がある。本研究における LA 代謝物の機能性の解明は、脂肪酸の主と腸内細菌による代謝バランスの存在を証明する重要な知見となりうる。

3. 研究の方法

LA による肝腫瘍形成抑制の結果より、腸肝循環の観点から、(1) 腸内細菌により代謝された LA 代謝物が肝臓に蓄積しているか、(2) どのタイミングで抗腫瘍効果が発揮されているのか (3) (1) の代謝物を作り出す主要腸内細菌群は何か、について検証した。(以下、項目別に記載)。

(1) 腸内細菌により代謝された LA が肝臓に蓄積しているか

高 LA による肝腫瘍形成の抑制から、腸で代謝される LA が肝臓に蓄積しているか、種類と量を測定する。餌全体のカロリーの 60% が脂質である点を揃えた高脂肪食 (60% kcal Fat : HFD) をベースに、LA 含有量が多い油としてサフラワー油を使用し、含まない脂質としてココナッツ油を使用し、それぞれを用いることで LA 含有量を調整した。a) 2% LA-ND (通常食)、b) 2% LA-HFD、c) 12% LA-HFD の 3 群の肝臓における各種 LA 代謝物の検出を試みた。

(2) どのタイミングで抗腫瘍効果が発揮されているのか

脂肪肝から NASH、肝がんに至る過程の、いずれの段階に LA 代謝物が作用し、最終的に腫瘍形成の抑制になるかを明らかにする。本研究で実施する肝がんモデルは、生後 4-5 日目の仔マウスに発がん誘導物質である DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene) を皮膚に塗布し、HFD にて 30 週育成時の肝腫瘍形成を観察する。予備試験では 2% LA-HFD と 12% LA-HFD に体重差がないことから、脂肪肝になる段階に影響はないと思われる。いくつかのタイムポイントを用意し肝臓を観察、育成早期の段階では NASH を想定し、病理像、炎症性細胞の集積を解析する。

(3) (1) の代謝物を作り出す主要な腸内細菌群は何か

腸内細菌が持つ LA 代謝酵素については研究がなされているが、マウス腸管に対象となる細菌が定着しているかは不明である。LA 代謝酵素を有するマウスの腸内細菌の存在を確認し、単離同定する。また 2% LA-HFD と 12% LA-HFD での LA 代謝菌の増減を観察し、DMBA 塗布の発がん誘導モデルにおける腸内細菌叢の変化も同時に解析する。

4. 研究成果

(1) 腸内細菌により代謝された LA 代謝物が肝臓に蓄積しているか

LA は哺乳類の代謝系では リノレン酸、ジホモ リノレン酸を介して、アラキドン酸へと代謝される。その後、アラキドン酸カスケードによって脂質メディエーターへと変換される。一方で、細菌の代謝系では水酸化酵素により水酸化脂肪酸、脱水素酵素によりオキソ脂肪酸、異性化

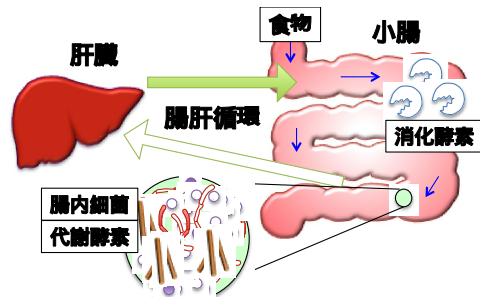


図1. 腸肝循環と消化・代謝酵素

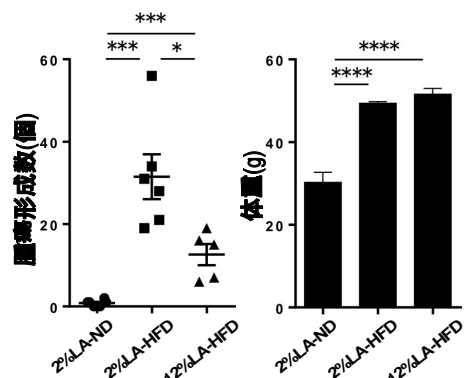


図2. リノール酸による肥満関連肝腫瘍形成抑制結果

LA: リノール酸, ND: 普通食, HFD: 高脂肪食

を証明する重要な知見となりうる。

酵素により不飽和脂肪酸の二重結合のシス-トランス型を変換するなど、様々な脂肪酸に代謝する(図3)。そして腸肝循環により、腸から吸収された脂質は肝臓に到着し、一部は中性脂肪やリン脂質、遊離脂肪酸の形で蓄積する。エネルギー源や基質などとして利用されるためには、リパーゼなどにより遊離脂肪酸に分解される必要がある。そこで LA 含有量の異なる餌によって肝臓に蓄積した遊離脂肪酸量を LC-MS/MS により測定した。2%LA-ND と 2%LA-HFD とを比較し、高脂肪食により肝臓中の LA 含有量が増加することが確認された。さらに、12%LA-HFD によって LA 含有量が顕著に増加することがわかった。その一方で、LA から変換されるはずのアラキドン酸含有量が 2%LA と 12%LA-HFD で変化がなかった(図4)。PGE₂ などの脂質メディエーターは腫瘍形成を促進する働きを持つ。2%LA-HFD と比較し、12%LA-HFD は腫瘍形成数が有意に減少していることから、別のメカニズムにて腫瘍形成が抑制されていることが考えられる。

そして、肝臓中の LA 細菌代謝物を測定結果は、水酸化脂肪酸である HYA、共役 LA である CLA1/2/3 が 12%LA-HFD で増加していることがわかった。オキソ脂肪酸である KetoA/C は検出限界以下であった。これらのことから、LA 含有量の違いによる腫瘍形成数の違いを証明する上で、肝臓に対する腸内細菌代謝物の働きが影響していると考えられる。

(2) どのタイミングで抗腫瘍効果が発揮されているのか

各種 LA 含有調整食を、DMBA を処置したマウスに給餌し、既定の週齢となった際の体重と肝臓の重量、及び腫瘍形成数を確認し、肝臓の病理像から脂肪肝の程度を観察した。給餌は 2%LA-HFD の消費量に合わせたペアフードを行なった。これは 12%LA-HFD より 2%LA-HFD の摂取量が低く、体重差が顕著に現れるためである。脂肪肝形成が肥満誘導性肝がん発生を促進するため、体重をコントロールすることで脂質の影響を確認した。ペアフードをすることで、2%LA-HFD と 12%LA-HFD 球児による体重差を抑えることができた一方で、肝臓の重量は逆に 12%LA-HFD の方が低いことがわかった。16 週齢を過ぎた個体から肝臓での腫瘍形成が確認されるが、12%LA-HFD は発生数が少ないことがわかった(図5)。そして肝臓の病理像解析の結果、2%LA-HFD は 16 週齢から脂肪滴や肝実質細胞の風船化現象が確認されたのに対して、12%LA-HFD では発生頻度が低いことがわかった。これらのことから、12%LA-HFD では脂肪肝の形成が抑制されていることがわかり、腫瘍の肥大化の段階ではなく、発生する段階で LA、または LA 代謝物が作用していると考えられる。

(3) (1)の代謝物を作り出す主要な腸内細菌群は何か

12%LA-HFD 給餌により LA の細菌代謝物が肝臓に顕著に蓄積していたことから、12%LA-HFD 給餌マウスの腸内には LA 代謝能のある細菌が存在すると考え、単離を試みた。一般的に、多価不飽和脂肪酸は細菌に対して毒性を示すことが知られているため、12%LA-HFD 給餌マウスの糞便懸濁液と LA とを共培養し、これを継代する“集積培養法”にて LA 代謝菌の単離を行った。その結果、*Lactobacillus murinus* のみが単離された。さらに、既知の LA 代謝酵素のアミノ酸配列から縮重プライマーを 2 種類作成し、12%LA-HFD の糞便 DNA を用いて Nested PCR によるクローニング操作を行なった。その結果、先の単離株(*L. murinus* strain OCU)の水

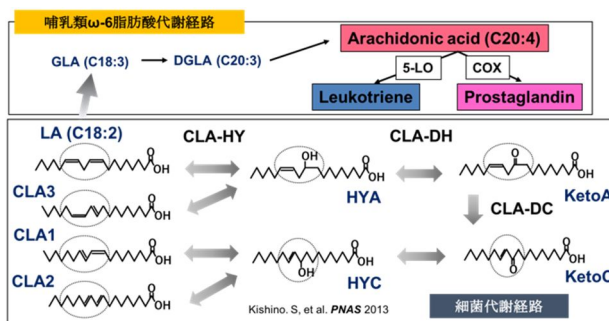


図3. 哺乳類と細菌では異なるリノール酸代謝経路が存在する

LA: リノール酸, GLA: γリノレン酸, DGLA: ジホモγリノレン酸, LO: リボキシゲナーゼ, COX: シクロオキシゲナーゼ

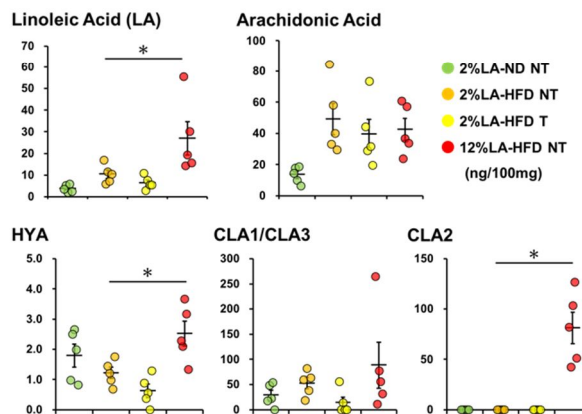


図4. 肝臓中のリノール酸代謝物の蓄積量に違いがある

各種リノール酸含有量調整食を、化学発がん誘導処理したマウスに30週間給餌し、肝臓の遊離脂肪酸含有量をLC-MS/MSにて測定した。ND: 通常食, HFD: 高脂肪食 (60kcal%fat), T: 腫瘍部, NT: 非腫瘍部, Mean±SEM, T-test, *; p<0.05

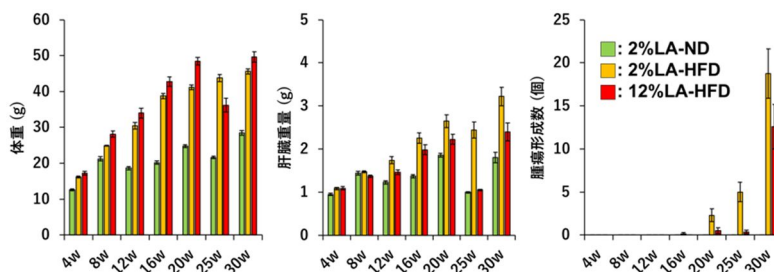


図5. 肝臓中のリノール酸代謝物の蓄積量に違いがある

各種リノール酸含有量調整食を、化学発がん誘導処理したマウスに4~30週間給餌し、表示の週齢にて体重/肝臓重量/肝腫瘍形成数を測定した。ND: 通常食, HFD: 高脂肪食(60kcal%fat), Mean±SEM

酸化酵素遺伝子であることがわかった。

先の結果から *Lactobacillus* 属の LA 代謝能が予測された。そこで、その他の *Lactobacillus* 属の単離を試みた。12%LA-HFD 給餌マウスの糞便懸濁液から、*Lactobacillus* 選択培地 MRS 培地を用いて、*Lactobacillus johnsonii* と *Lactobacillus reuteri* を単離した。*L. murinus*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* の 3 菌株の LA 代謝能を検証するため、そ

それぞれの菌株について、基質(LA)と補酵素(NADH, FAD)を添加し休止菌体反応をさせた。反応後の菌液全体から Bligh Dyer 法にて総脂質を抽出し、メチル化を行いガスクロマトグラフィー(GC-FID)にて LA 細菌代謝物(水酸化/オキシ化/共役体)への変換率を測定した。その結果、*L. murinus* は水酸化脂肪酸である HYA への変換効率が 70%以上と最も多かった。一方で、*L. johnsonii* も HYA へ変換するものの 20%弱程度であった。*L. reuteri* は、HYA への変換効率こそ 50%近くであるものの、オキシ脂肪酸である KetoA への変換、また少量ではあるが共役 LA である CLA への変換能を有することがわかった(図 6)。

そして、各種 LA 含有調整餌を給餌したマウスの腸内細菌叢をメタ 16S 解析にて分析した。その結果、2%LA-ND/HFD の *Lactobacillus* 属は 5%程度であるのに対して、12%LA-HFD 給餌では 30%と大幅に増加していることがわかった。

上記の結果を総合すると、LA 代謝能を持つ腸内細菌として *Lactobacillus* 属があげられた。その中でも、LA を用いた集積培養法により選択的に単離された *L. murinus* strain OCU は、LA を水酸化脂肪酸へと代謝する活性が非常に高いことがわかり、この結果は、多価不飽和脂肪酸に対して抵抗性、または嗜好性があることが考察される。In vivo において、*Lactobacillus* 属の増加をしていたが、これは LA 代謝能=抵抗性/嗜好性であった結果だと推察される。これは必須脂肪酸である LA が哺乳類の生体恒常性を維持する一方で、腸内細菌叢に与える影響も強いことが結論として導き出せたとと言える。本研究の目的は、LA 細菌代謝物と肝腫瘍形成との関係性であるため、今回の研究成果から腸内細菌叢の関与は非常に強いと推察される。今後の検討課題としては、LA 水酸化体である HYA の抗腫瘍効果、または脂肪肝の抑制効果について検証する。

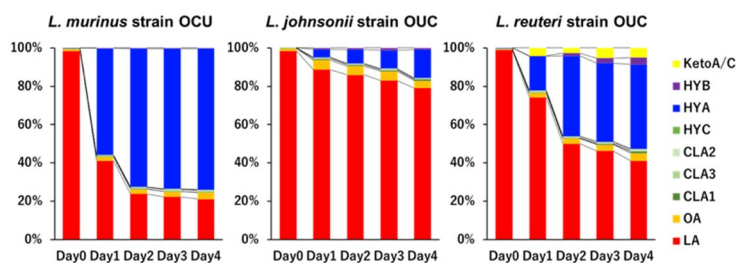


図6. 単離した乳酸桿菌株はリノール酸代謝能を有していた

単離した3種の*Lactobacillus*属のリノール酸代謝能を検証した。MRS培地にて培養後、集菌し生理食塩水にて3回洗浄した。洗浄後、基質(リノール酸)と補酵素を添加し24時間毎に菌体反応液を回収し、Bligh Dyer脂質抽出を行いガスクロマトグラフィーにてリノール酸代謝脂質を分析した。

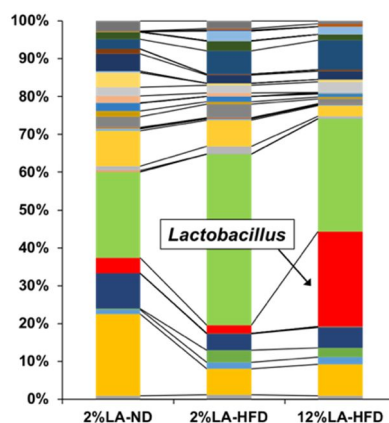


図7. リノール酸により腸内の乳酸菌が増加する
リノール酸含有量の異なる通常食(ND)、高脂肪食(HFD)を30週間 pair-fedした際の腸内細菌叢解析結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Tomonori Kamiya, Fumitaka Kamachi, Tatsuya Arai, Naoko Ohtani.
2. 発表標題 Anti-inflammatory microbial metabolites from linoleic acid suppress obesity-induced liver cancer development.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神谷知憲, 蒲池史卓, 松浦遥, 福田真嗣, 有田誠, 岸野重信, 小川順, 大谷直子.
2. 発表標題 腸内細菌が代謝する機能性脂肪酸による肥満誘導性肝がん抑制機構の解明.
3. 学会等名 第17回がんと代謝研究会
4. 発表年 2019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	大谷 直子 (Ohtani Naoko)		
研究協力者	岸野 重信 (Kishino Shigenobu)		

6. 研究組織（つづき）

	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	有田 誠 (Arita Makoto)		