

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08339

研究課題名(和文) 包括的消化管微生物叢解析に基づく肝性脳症に対する新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Exploring a novel therapeutic target for hepatic encephalopathy by the comprehensive analysis of the gut microbiome

研究代表者

三好 潤 (Miyoshi, Jun)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：10528722

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)：肝性脳症治療として用いられる腸管非吸収性抗菌薬リファキシミン(RFX)の消化管微生物叢への影響についての知見は確立していない。本研究では、肝硬変モデルマウスを用い、消化管各部位の微生物叢および宿主因子に対するRFXの影響を検討した。RFXによる細菌構成の変化は大腸や糞便よりも小腸において大きく、小腸微生物叢の代謝機能パスウェイも変化していた。またRFX投与により小腸粘膜におけるTLR4、抗菌ペプチドの遺伝子発現が低下していた。腸内細菌叢と宿主因子の相関解析では小腸細菌叢のFaecalibaculum属、Akkermansia属が臨床的改善効果と相関することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により肝硬変・肝性脳症の病態に小腸微生物叢が関与しているという新たな可能性が提示された。さらに小腸微生物叢が治療標的となることが示唆された。これらの知見は、肝硬変・肝性脳症の病態生理の解明という学術的意義とともに、小腸微生物叢への介入という新規性が高い肝性脳症治療アプローチの開発という社会的意義につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Rifaximin, a non-absorbent broad-spectrum antibiotic, is used for the treatment of hepatic encephalopathy, but the impact of this antibiotic on the gut microbiome remains unclear. This study aimed to assess the influence of RFX on the gut microbiome and host in each anatomical part of the gastrointestinal tract using a murine liver cirrhosis model. The alterations of the bacterial compositions were larger in the small intestine than in the colon and stools. The metabolic function pathways in the small intestine also changed. RFX reduced gene expressions of TLR4 and anti-microbial peptides in the small intestinal mucosa. The association between clinical improvement and genera Faecalibaculum and Akkermansia was observed.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝性脳症 消化管微生物叢

1. 研究開始当初の背景

肝性脳症は肝機能低下に伴いアンモニア等の血中濃度が上昇することによって生じる精神神経症状である。肝性脳症を生じる代表的な肝疾患として肝硬変が挙げられる。これまで原因物質を産生する腸管細菌量を減少させることが肝性脳症の治療機序と考えられ、肝性脳症に対して非吸収性合成二糖類とカナマイシン等の抗菌薬の併用療法が長年にわたり用いられてきた。一方、わが国では2016年より腸管非吸収性抗菌薬であるリファキシミン(RFX)が臨床現場で使用されるようになった。しかし、RFXは肝性脳症に対する有効性を示す一方で糞便中の細菌量や構成は変化しないという報告が多く見られる。

これらの知見に対し、我々は、消化管内の細菌叢は解剖学的部位によっても異なっているため糞便のみを用いた検討は不十分なのではないかと考え、さらに細菌叢のみではなく微生物叢を対象とした解析を行う必要があるのではないかとこの着想を得た。そして、RFXの臨床的有効性に関する微生物叢・宿主因子を探索することが、腸管微生物叢を介する肝性脳症発症の機序解明および新たな治療法の開発につながると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、以下を目的として肝硬変モデルマウスを用いた検討を実施した。

目的 1: RFX 投与による臨床的效果

目的 2: 消化管各部位における RFX による微生物叢および宿主因子への影響

目的 3: RFX による臨床的效果と微生物叢変化の相関性

3. 研究の方法

SPF 飼育環境下で野生型マウスを用いて四塩化炭素(オリーブ油に溶解)の腹腔内投与による肝硬変(LC)モデルを作成した。

四塩化炭素腹腔内投与後に RFX 経口投与を行う LC-RFX 群、四塩化炭素腹腔内投与後にリン酸緩衝食塩水の経口投与を行う LC-NT 群、オリーブ油腹腔内投与後にリン酸緩衝食塩水の経口投与を行う健常対象(HC)群の3群による検討を実施した。肝硬変マウスに経口投与する RFX は臨床現場で用いられるヒト投与量の相当量とした。RFX(または vehicle)投与期間後にマウスを解剖して血液、臓器検体を採取した。

肝臓病理組織は H&E 染色および Azan 染色により評価した。消化管内容物の細菌構成は 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシング(V4 領域)の結果を QIIME 2 により解析した。消化管内容物の微生物叢の代謝機能パスウェイはメタゲノムショットガンシーケンシングの結果を HUMAnN 3.0 により解析した。宿主因子の検討として消化管各部位の粘膜に対して mRNA 発現を qPCR により評価した。

4. 研究成果

LC モデルにおいて肝内の結節形成と架橋形成を含む高度線維化の病理所見を認めた。LC-RFX 群では LC-NT 群と比較して、血中アンモニア濃度は低下し、病理組織学的に肝線維化の改善を認めた。肝硬変マウスにおける RFX による臨床的改善効果と考えられた。

RFX が消化管各部位の細菌叢に与える影響を 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシング解析を用いて検討したところ、糞便・大腸・盲腸よりも小腸(空腸・回腸)において、多様性を検討したときの LC-RFX 群と LC-NT 群の UniFrac 距離が大きくなった(図1)。すなわち、RFX により小腸における細菌叢構成が大きく変化することが観察された。小腸内容物に対するメタゲノムショットガンシーケンシング解析では、微生物叢の代謝機能パスウェイも変化していることが示された。

また LC-RFX 群は LC-NT 群と比較して小腸粘膜における TLR4、抗菌ペプチドの遺伝子発現が低下し、HC 群と類似していた。すなわち、RFX 投与により小腸における宿主因子も変化していると考えられた。

腸内細菌叢と宿主因子の相関解析では小腸細菌叢の *Faecalibaculum* 属、*Akkermansia* 属がアンモニア濃度の低下や肝線維化の改善と

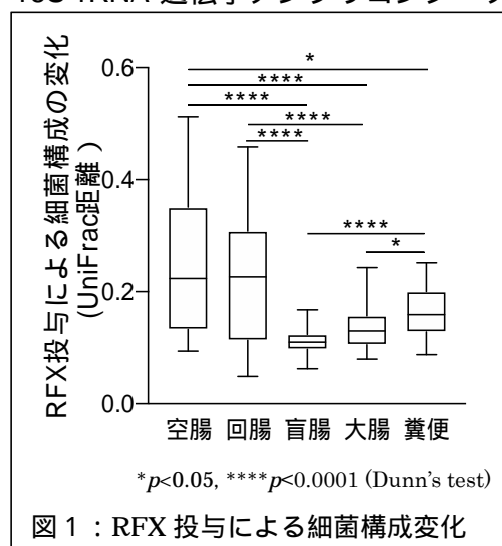


図1: RFX 投与による細菌構成変化

相関することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小栗典明、三好潤、西成田悠、和田晴香、川村直弘、松浦稔、久松理一
2. 発表標題 肝硬変・肝性脳症における小腸微生物叢 dysbiosis とリファキシミンによる是正
3. 学会等名 第6回消化器臓器間ネットワーク研究会
4. 発表年 2023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	久松 理一 (Hisamatsu Tadakazu)		

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