

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16121

研究課題名（和文）腸内細菌が代謝する新規機能性脂肪酸による肥満誘導性肝がん抑制機構の解明

研究課題名（英文）Inhibitory mechanism of obesity-induced hepatocellular carcinoma by the novel fatty acid metabolized by intestinal microbiota

研究代表者

神谷 知憲 (Tomonori, Kamiya)

大阪公立大学・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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：肥満誘導性肝がんマウスモデルに対して、高リノール酸含有の高脂肪食を負荷した際、脂肪肝の程度が著しく抑制され、それに伴う腫瘍形成も抑制される。本研究では、この現象を解明するにあたり、腸内細菌の働きを中心に解析した。マウス腸内に生息する常在細菌によって産生されるリノール酸代謝物を検出し、代謝酵素、及び細菌を同定した。そして、精製したリノール酸代謝物を含む高脂肪食の開発に成功した。一方で、抗生物質投与による腸内細菌除去、または上記リノール酸腸内細菌代謝物含有高脂肪食では高リノール酸による脂肪肝、及び腫瘍形成の変化を説明するに至らず、腸内細菌を介さないメカニズムであると結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、国内の食文化の変化による肥満関連疾患が増え、肥満は糖尿病や脳血管性疾患、心筋梗塞のみならず、肝がんなどの様々ながんのリスクファクターであると明らかとなった。肥満による脂肪肝は肝がん発生にまで悪化することから、発症メカニズムの解明や治療法の確立が課題である。我々は、摂取する脂肪の質を変化させることで、脂肪肝が抑制されることを見出しており、そのメカニズムを解明することは、現代病である脂肪肝を予防するアプローチを生み出すことができると考えた。研究結果としては、腸内細菌を介さなかったが、将来展望としては、脂質の取り込みや肝臓での脂質代謝により起きた現象と予想し、研究の展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：When a high-fat diet (HFD) containing high linoleic acid (LA) is fed on mouse models for obesity-induced hepatocellular carcinoma, the fatty liver was less formed, and the number of HCC was significantly reduced. In this study, we focused on the function of intestinal microbiota in elucidating this phenomenon. LA metabolites produced by intestinal microbiota were detected in the liver of high LA-HFD mice, and the metabolizing enzymes and bacteria were identified. And then we succeeded in developing HFD containing the bacterial metabolite of LA. On the other hand, the removal of intestinal microbiota by antibiotic administration or the HFD containing the above LA metabolite did not explain the changes in fatty liver and tumor formation caused by high LA-HFD, and we concluded that the mechanism is not mediated by intestinal microbiota.

研究分野：病態生理学

キーワード：肥満誘導性肝がん 腸内細菌 脂質

1. 研究開始当初の背景

近年、国内の食文化の変化による肥満関連疾患が増え、肥満は糖尿病や脳血管性疾患、心筋梗塞のみならず、肝がんなどの様々ながんのリスクファクターであると明らかとなった。肥満による脂肪肝が原因の非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) の罹患率の増加は社会問題であり、NAFLD が慢性化し、炎症状態となることで非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に進行する。NAFLD や NASH を発症した一部の肝臓では肝がんが発生することから、発症メカニズムの解明や治療法の確立が喫緊の課題である。

腸は肝臓と関わりのある臓器であり、腸で代謝された物質は、多くが腸で吸収された後に門脈を経て肝臓に入り、再び十二指腸から腸管腔へと戻る腸肝循環経路がある。肝臓への影響を考えるに辺り、特に注目すべきが腸内細菌代謝物であり、腸内細菌が一次胆汁酸を代謝することでされる二次胆汁酸デオキシコール酸が肥満誘導性肝がんの発症に関わることが所属研究室の研究成果として報告された (Yoshimoto et al. *Nature*, 2013)。これは肥満によって腸内細菌叢が変化 (Dysbiosis) し、クロストリジア属が腸内で増加することで起きた現象である。Dysbiosis のみならず、定常状態の腸内細菌叢においても多くの腸内細菌代謝物が生み出されるが、肝臓への作用についてはほとんど解明されていない。

脂肪肝を素地とした肝がんの発症機構として、炎症や発がんの際にシクロオキシゲナーゼ (COX) によって、脂質メディエーターであるプロスタグランジン E2 が放出され、肥満誘導性肝がんにおいては、プロスタグランジン E2 が抗腫瘍免疫を抑制し、腫瘍形成を促すことを所属研究室で明らかにした (Loo et al. *Cancer Discovery*, 2017)。プロスタグランジン E2 はアラキドン酸カスケードによって必須脂肪酸であるリノール酸から作られ、脂質の摂取や代謝は肝がん発生に重要なファクターである。

腸内細菌が生み出す代謝物はユニークな働きをするが、同じ物質からでも宿主とは異なる物質を作り、その働きは全く違う。共生関係にある微生物と宿主との間で、あらゆる物質の代謝がその均衡を保ち、生体恒常性に働き、バランスが崩れると病態発症へ進むと考えられる。これらの代謝物の作用メカニズムはほとんどが解明されていない、これを明らかにすることは学術的に意味がある。

2. 研究の目的

必須脂肪酸であるリノール酸は、腸を介して肝臓に到達するが、腸内細菌が持つユニークな酵素により、プロスタグランジン E2 などとは全く異なる脂肪酸に代謝される。近年の研究により、リノール酸の細菌代謝物が炎症抑制や免疫細胞の分化を促進する働きが明らかとなった (Kishino et al. *PNAS*, 2015)。これらの物質も腸肝循環により肝臓に曝露されることが予想されるが、その効果については分かっていない。

申請者の所属する研究室では、高脂肪食給餌による肥満誘導性肝がんマウスモデルを樹立している。そこで、本研究の予備試験として、リノール酸含有量の異なる高脂肪食により代謝バランスの均衡に変化を加えた。そして発がん誘導操作を行ったところ、高リノール酸含有高脂肪食では、対照群である低リノール酸含有高脂肪食と比較し、肝腫瘍形成が抑制された。そこで本研究は、腸内細菌によるリノール酸代謝物が、肥満関連肝腫瘍形成を抑制した可能性があると考え、そのメカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

・集積培養法

マウスから新鮮便を採取し、便懸濁液をリノール酸含有 MRS 液体培地にて培養し、同培地にて継代培養を繰り返した。複数回継代の後、細菌培養液を MRS 寒天培地に塗布し、シングルコロニーを得た。

・脂質分析

生体材料からの脂質抽出には Bligh dyer 法を用いた。また、細菌が代謝した脂質も同様に Bligh dyer 法にて抽出した。細菌の脂質代謝能を検証する際は、培養後の細菌を生理食塩水で洗浄の後、リノール酸を添加した還元反応液にて懸濁し、嫌気培養と同じ条件にて 24 時間振盪反応させ、細菌を含む反応液から脂質抽出を実施した。

・全ゲノムシーケンス

細菌懸濁液を遠心し、沈殿 (細菌) を生理食塩水で洗浄後、細菌 DNA 抽出キット (Nucleo Spin Microbial DNA) にて DNA を精製した。精製した DNA を次世代シーケンサー (イルミナ社、400 万ペアリード) にて解析した。

・肥満誘導性肝がんマウスモデル

生後 4 日目の仔マウスに、0.5%DMBA/アセトン を 50 μ L 塗布し、30 週齢まで高脂肪食 (60kcal%fat、D12492、リサーチダイエツ社) を給餌する。雄マウスにて肝臓がんは 100% の発症率となり、本研究でも雄マウスを使用した。

・腸内細菌代謝物含有高脂肪食の作出

デオキシコール酸 (sigma 社製) 及びリノール酸代謝物を低リノール酸含有高脂肪食、または高リノール酸含有高脂肪食 (60kcal%fat、リサーチダイエツ社) に混餌し、ガンマ線滅菌後に飼料として使用した。

・抗生物質投与による腸内細菌除去

アンピシリン (1g/L)、ネオマイシン (1g/L)、バンコマイシン (0.5g/L)、メトロニダゾール (0.5g/L) を水道水にて溶解し後、0.22μm フィルターにて濾過滅菌を行った。滅菌後の抗生物質溶解液は給水便を遮光した状態にてマウスに自由飲水させた。

4. 研究成果

リノール酸代謝能を有する腸内細菌の単離、及び遺伝子の同定

これまでに、高リノール酸含有高脂肪食の給餌によりリノール酸の細菌代謝物が肝臓に顕著に蓄積していたことから、高リノール酸含有高脂肪食給餌マウスの腸内にはリノール酸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、高リノール酸含有高脂肪食給餌マウスの糞便懸濁液とリノール酸とを共培養し、これを継代する集積培養法にてリノール酸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、既知のリノール酸代謝酵素のアミノ酸配列から縮重プライマーを作成し、高リノール酸含有高脂肪食給餌マウスの糞便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、先の単離株の水酸化酵素遺伝子であることがわかった。

上記の結果から、*L. murinus* に注目し、単離株の全ゲノムシーケンスを実施した。クローニングした遺伝子と全ゲノム配列を比較し、リノール酸水酸化酵素の配列を予測した。欠損株作成用の組換え用ベクター作成し、*L. murinus* の野生型株に導入し欠損株を作成した。この欠損株のリノール酸代謝能を確認したところ、水酸化脂肪酸の産生が全く行われていなかったことから、代謝遺伝子を特定したと結論付けた。

腸内細菌代謝物含有高脂肪食の作出肥満誘導性肝臓において、肝星細胞の細胞老化に伴う細胞老化随伴分泌現象 (SASP) による慢性炎症の誘導が肝臓形成に大きく寄与することが報告されている。高リノール酸含有高脂肪食給餌マウスの腫瘍部位においても肝星細胞の細胞老化、及びSASP因子を確認することができた。

次に、腸内細菌により代謝されるリノール酸由来水酸化脂肪酸を含む餌を開発することで、腫瘍形成への関与を検証できると考えた。高純度の水酸化脂肪酸を精製いただき、低リノール酸含有高脂肪食に混餌することで、水酸化リノール酸代謝物の効果を検証することを目的とし、開発に成功した。また別の角度から、高リノール酸含有高脂肪食給餌マウスの腫瘍形成抑制が腸内細菌に依存しているかを検証するには、抗生物質により常在細菌叢を除去する必要がある。しかしながら、肝星細胞の細胞老化を誘導する物質であるデオキシコール酸も腸内細菌特異的な代謝産物であるため、高脂肪食にデオキシコール酸を混餌することで、抗生物質投与下においても肝がん発症を期待できる。上記水酸化リノール酸代謝物と同様の行程にて、各種デオキシコール酸含有高脂肪食の作成に成功した。

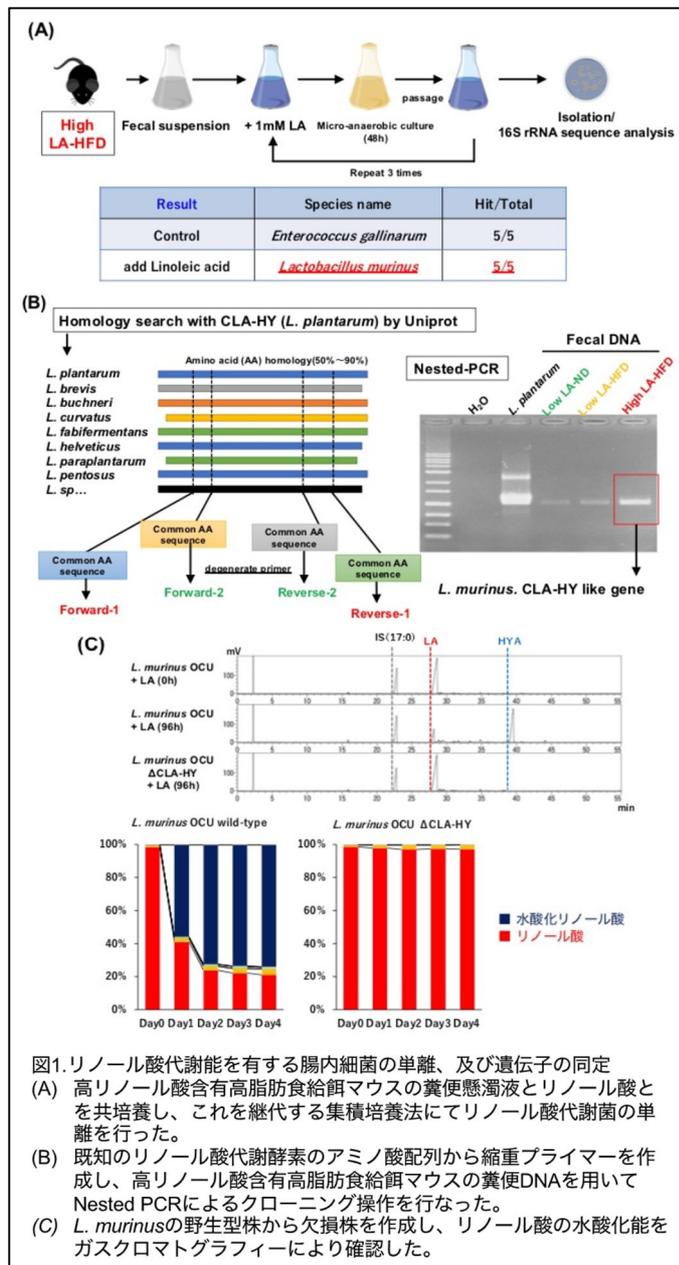


図1. リノール酸代謝能を有する腸内細菌の単離、及び遺伝子の同定

- (A) 高リノール酸含有高脂肪食給餌マウスの糞便懸濁液とリノール酸とを共培養し、これを継代する集積培養法にてリノール酸代謝菌の単離を行った。
- (B) 既知のリノール酸代謝酵素のアミノ酸配列から縮重プライマーを作成し、高リノール酸含有高脂肪食給餌マウスの糞便DNAを用いてNested PCRによるクローニング操作を行なった。
- (C) *L. murinus* の野生型株から欠損株を作成し、リノール酸の水酸化能をガスクロマトグラフィーにより確認した。

腸内細菌代謝物含有高脂肪食による肥満誘導性肝がん発生を検証

作成した混餌を用いて、肥満誘導性肝がんマウスモデルにて腫瘍形成に対する腸内細菌、及びその代謝物の効果を検証した。リノール酸の水酸化代謝物含有の高脂肪食を給餌したが、対照群（遊離リノール酸添加群）と比較し腫瘍形成数に変動は見られなかった。また、離乳後から抗生物質投与を投与することで腸内細菌の影響を可能な限り無くし、デオキシコール酸を混餌した高/低リノール酸含有高脂肪食時の腫瘍形成数を確認したが、こちらも腫瘍形成数に変化は見られなかった。これらの結果から、リノール酸による腫瘍形成数の抑制効果は腸内細菌を介していない可能性が高まった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fudaba Megumi, Kamiya Tomonori, Tachibana Daisuke, Koyama Masayasu, Ohtani Naoko	4. 巻 9
2. 論文標題 Bioinformatics Analysis of Oral, Vaginal, and Rectal Microbial Profiles during Pregnancy: A Pilot Study on the Bacterial Co-Residence in Pregnant Women	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1027 ~ 1027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9051027	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 -
1. 著者名 Takada Naoki, Takasugi Masaki, Nonaka Yoshiki, Kamiya Tomonori, Takemura Kazuaki, Satoh Junko, Ito Shinji, Fujimoto Kosuke, Uematsu Satoshi, Yoshida Kayo, Morita Takashi, Nakamura Hiroaki, Uezumi Akiyoshi, Ohtani Naoko	4. 巻 149
2. 論文標題 Galectin-3 promotes the adipogenic differentiation of PDGFR + cells and ectopic fat formation in regenerating muscle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.199443	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 -
1. 著者名 Okubo Kyohei, Kitagawa Yuichi, Hosokawa Naoki, Umezawa Masakazu, Kamimura Masao, Kamiya Tomonori, Ohtani Naoko, Soga Kohei	4. 巻 12
2. 論文標題 Visualization of quantitative lipid distribution in mouse liver through near-infrared hyperspectral imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 823 ~ 823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/BOE.413712	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 -
1. 著者名 Yukawa Muto Yoshimi, Kamiya Tomonori, Fujii Hideki, Mori Hiroshi, Toyoda Atsushi, Sato Ikuya, Konishi Yusuke, Hirayama Akiyoshi, Hara Eiji, Fukuda Shinji, Kawada Norifumi, Ohtani Naoko	4. 巻 6
2. 論文標題 Distinct responsiveness to rifaximin in patients with hepatic encephalopathy depends on functional gut microbial species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 2090 ~ 2104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1954	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 1件）

1. 発表者名 Kamiya, Yoshimi Yukawa-Muto, Hideki Fujii, Hiroshi Mori, Atsushi Toyoda, Shinji Fukuda, Norifumi Kawada, Naoko Ohtani
2. 発表標題 Functional Analysis of Liver Cirrhosis-associated Gut Microbiota Uncovers a Unique Mechanism of Hyperammonemia in Hepatic Encephalopathy
3. 学会等名 アジア太平洋肝臓学会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神谷知憲、武藤芳美、藤井英樹、森田史、豊田敦、福田真嗣、河田則文、大谷直子
2. 発表標題 肝性脳症発症に関わる腸内細菌の探索
3. 学会等名 Gut Microbiota研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大谷直子, 神谷知憲, 蒲池史卓, 山岸良多
2. 発表標題 腸内細菌代謝物と肥満関連肝がん
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神谷知憲, 武藤芳美, 藤井英樹, 森田史, 豊田敦, 福田真嗣, 河田則文, 大谷直子
2. 発表標題 肝性脳症発症に関わる腸内細菌の同定
3. 学会等名 第26回腸内細菌学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 高アンモニア血症の治療又は予防用医薬組成物	発明者 大谷直子, 神谷知恵, 武藤芳美, 福田真嗣, 佐藤郁也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-34359	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------