

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 2 5 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15980

研究課題名（和文）腸内細菌投与による腫瘍免疫増強とNASH肝癌治療法の開発

研究課題名（英文）Tumor immunity enhancement and treatment of NASH-related hepatocellular carcinoma by intestinal bacteria administration

研究代表者

小林 貴（Kobayashi, Takashi）

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：50825768

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腸内細菌Faecalibacterium prausnitziiによるNASH肝癌の予防効果と腫瘍増大抑制効果を検討した。

NASH肝癌モデルマウスにFaecalibacterium prausnitziiの生菌もしくはvehicleとしてリン酸緩衝食塩水（PBS）を連日経口ゾンデ投与したところ、生菌投与群で腫瘍の個数と総体積が有意に低値となった。また、加熱処理した死菌を同様に投与しても、PBS投与群と比べて死菌投与群で腫瘍の個数と総体積が有意に低値となった。この結果より、菌の代謝産物ではなく菌体成分にNASH肝癌の抑制効果があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASH肝癌の予防に関して、糖尿病治療薬や脂質異常症治療薬などメタボリックシンドローム治療薬による発癌予防効果が報告されている。しかし、臨床応用する際にはいずれも適用となる症例に限られ、副作用も問題となる。腸内細菌投与は適用症例を選ばず副作用がほぼ無いと思われることから、医学的に重要な研究になると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the preventive and tumor growth inhibitory effects of the gut bacterium Faecalibacterium prausnitzii on NASH-related hepatocellular carcinoma (HCC). NASH-related HCC model mice were orally administered live Faecalibacterium prausnitzii or phosphate-buffered saline (PBS) as a vehicle control. The group receiving the live bacteria showed a significant reduction in both the number and total volume of tumors. Additionally, when heat-killed bacteria were administered in the same manner, the group receiving the heat-killed bacteria also showed a significant reduction in both the number and total volume of tumors compared to the PBS group. These results suggest that the inhibitory effect on NASH-associated liver cancer is attributed to the bacterial cell components rather than their metabolic products.

研究分野：Hepatology

キーワード：肝細胞癌 MASH NASH 腸内細菌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓がんの発がんリスク因子として慢性肝炎が知られている。慢性肝炎の原因は、これまでB型およびC型肝炎ウイルスが大部分を占めてきた。しかし、近年の抗ウイルス薬開発の劇的な進歩により、これらのウイルスの感染を原因とする慢性肝炎は減少傾向にある。一方で、近年の世界的な肥満人口の増加を背景に、非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) が慢性肝炎の原因として急増している。NASHの主な治療は生活習慣改善による減量であり、保険適用の治療薬は存在しない。ウイルス性慢性肝炎が制御可能となった現在では、NASHを背景とした慢性肝炎に続発する肝がんが増加することが予想される。当教室では、NASHに関連する腸内細菌を探索するため、健常人とNASH患者の糞便を次世代シーケンサーで解析した。その結果、腸内細菌 *Faecalibacterium prausnitzii* (FP) が高度肝線維化群で有意に低下していることを発見した (図1)。この結果から腸内細菌 FP の減少が NASH 進展に関与している可能性を考え、NASH マウスに FP を経口投与したところ、腸管透過性の改善を介した NASH 改善効果と肥満抑制効果が確認された (図2)。以上の事前解析データから、FP 投与は背景肝の NASH 改善により、肝がんの発がんを抑制できる可能性があると考えた。

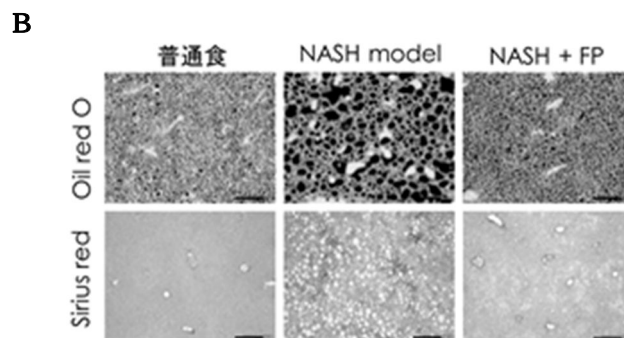
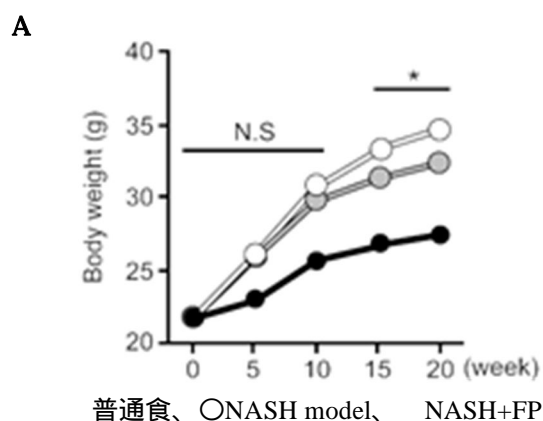
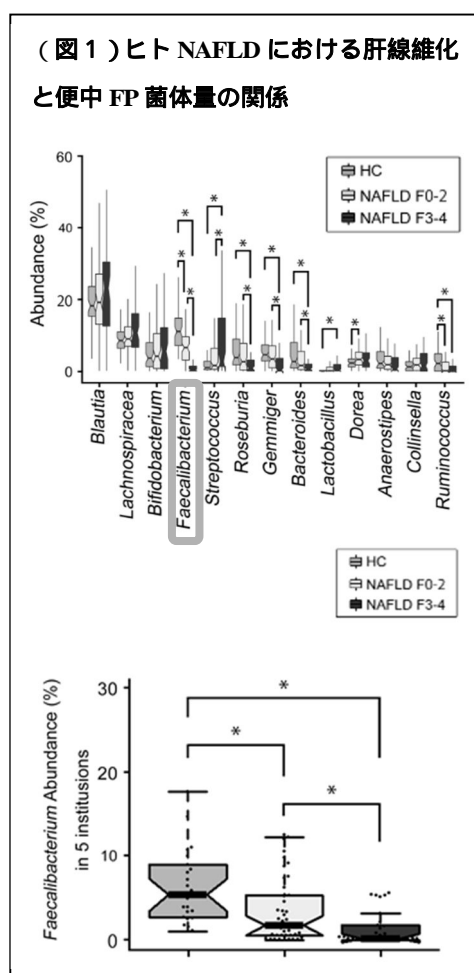


図2(A) マウス体重の変化、(B) 肝病理所見

## 2. 研究の目的

本研究では、腸内細菌投与という新たな視点から、NASH 肝癌の予防法と治療法の創出を目指した。

## 3. 研究の方法

### NASH 肝癌モデルマウスの確立

マウスに対して食餌負荷 (高脂肪・高フルクトース・高コレステロール食) を行い、さらにジエチルニトロサミン (DEN: Diethylnitrosamine) を複数回腹腔内投与した。NASH 肝癌モデルとしての有用性を評価した。

#### FP による NASH 肝癌予防効果

NASH 肝癌モデルマウスに対して FP もしくは Vehicle を連日経口ゾンデ投与し、NASH 肝癌の総腫瘍体積を比較した。

#### 4. 研究成果

##### NASH 肝癌モデルマウスの確立

マウスに対して高脂肪・高フルクトース・高コレステロール添加食を負荷し、さらに、Diethylnitrosamine の腹腔内投与を複数回行った。24 週齢では食餌負荷を加えず DEN 腹腔内投与のみを行ったマウスでは肝発癌を認めなかったのに対し、食餌負荷 + DEN 腹腔内投与のマウスでは肝内に HCC が多発した。

背景肝に関して、食餌負荷 + DEN 腹腔内投与のマウスでは肝臓脂肪化と肝線維化の両方を認めた。さらに、これらのマウスでは肥満（体重増加と皮下脂肪・内臓脂肪の増加）とインスリン抵抗性（HOMA-IR の上昇）が確認できた。また、FITC で標識した Dextran を経口ゾンデ投与した後に門脈血の蛍光強度を測定することにより腸管透過性を調べると、食餌負荷 + DEN 腹腔内投与のマウスでは腸管透過性が有意に上昇していた。

以上より、この NASH 肝癌モデルマウスは、肝脂肪化、肝線維化、肥満、インスリン抵抗性、腸管透過性の亢進といったヒト NASH の重要な特徴を兼ね備えたモデルマウスであることが確認できた。従来の NASH 肝癌モデルマウスよりも、よりヒト NASH 肝癌に近いモデルマウスであると言えた。

#### FP による NASH 肝癌予防効果

腸内細菌 FP による NASH 肝癌の予防効果と腫瘍増大抑制効果を検討した。

マウスに対して普通食、もしくは高脂肪・高フルクトース・高コレステロール添加食を負荷した。さらに、Diethylnitrosamine の腹腔内投与を複数回行った。食餌負荷を加えず DEN 腹腔内投与のみを行ったマウスでは 24 週齢で背景肝に脂肪化や線維化といった非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の病理学的特徴を認めず、また、肝発癌を認めなかった。一方、食餌負荷 + DEN 腹腔内投与のマウスでは 24 週齢で背景肝の脂肪化と線維化を認め、さらに肝腫瘍が発生することを確認した。また、後者では 36 週齢で肝内に腫瘍が多発した。

この NASH 肝癌モデルマウスに 12 週齢から、FP の生菌もしくは vehicle としてリン酸緩衝食塩水（PBS）を連日経口ゾンデ投与したところ、生菌投与群で腫瘍の個数と総体積が有意に低値となった。

また、加熱した FP の死菌を同様に 12 週間投与しても、PBS 投与群と比べて死菌投与群で腫瘍の個数と総体積が有意に低値となった。

この結果より、FP の代謝産物ではなく菌体成分に NASH 肝癌の抑制効果があると考えられた。

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 2件 / うち国際学会 2件）

1 . 発表者名 Takashi Kobayashi
2 . 発表標題 Gut Microbiota and NASH-related Hepatocellular Carcinoma
3 . 学会等名 APASL Oncology 2022 Takamatsu（招待講演）（国際学会）
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Takashi Kobayashi, Masato Yoneda, Atsushi Nakajima
2 . 発表標題 Role of gut microbiota in MASH and MASH-related hepatocellular carcinoma
3 . 学会等名 The 3rd JSH international Liver Conference（招待講演）（国際学会）
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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