

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19705

研究課題名（和文）小腸構成細胞連関による小腸構造と腸内環境の維持を介した全身性栄養代謝の制御機構

研究課題名（英文）The mechanism of systemic nutrient metabolism through the maintenance of small intestinal structure and intestinal environment by the interaction of small intestinal constituent cells

研究代表者

中川 嘉（Yoshimi, Nakagawa）

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授

研究者番号：80361351

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：CREBHは肝臓と小腸にのみ特異的に発現する脂質代謝と糖代謝を制御する転写因子である。申請者はこれまでに、CREBH欠損マウスでは肝臓における脂質代謝が破綻し、脂肪肝炎をはじめとする生活習慣病の病態が悪化することを明らかにしている。本研究ではCREBH欠損マウスは小腸の内部構造に異常が生じ、腸管バリア機能が脆弱化するとともに腸内細菌叢が変化することを明らかにした。CREBH欠損マウスでは脂肪肝や肝炎の悪化に働く腸内細菌の増加が認められ、生活習慣病の予防・改善に対する小腸CREBH機能の重要性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH;旧NASH)の患者数は年々増加しているが、有効な治療薬は存在しない。MASHは終末像として肝臓にまで増悪するがその機序は不明瞭である。その中で、本研究からMASH病態の発症・がん化に対して肝臓、小腸の両者におけるCREBHの機能が保護的に作用していることが明らかになり、CREBHがMASH治療におけるキーファクターとなりうる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：CREBH is a transcription factor that regulates lipid and glucose metabolism in the liver and small intestine. I have previously demonstrated that lipid metabolism in the liver is disrupted in CREBH-deficient mice, leading to the exacerbation of lifestyle-related diseases such as fatty liver disease. This study reveals that CREBH-deficient mice also exhibit abnormalities in the internal structure of the small intestine, leading to the weakening of intestinal barrier function and alterations in the gut microbiota. An increase in gut bacteria contributing to the worsening of Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) was observed, highlighting the importance of small intestinal CREBH function in the prevention and improvement of lifestyle-related diseases.

研究分野：応用健康科学

キーワード：CREBH 生活習慣病

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CREBH は肝臓と小腸のみに特異的に発現し、栄養代謝を制御する転写因子である。このような発現パターンを示す転写因子は CREBH のみである。CREBH は脂肪酸酸化を促進するとともに脂質合成を抑制するため、生活習慣病の病態改善に寄与することを明らかにしてきた。高栄養食を負荷すると CREBH 欠損マウスの肝臓では異常なほど早期に脂肪肝、肝炎が惹起される。CREBH はがん関連分子としての報告はないにもかかわらず、CREBH 欠損マウスに高脂肪・高シヨ糖食を長期間負荷したときに、肝がんを発症する結果を得ている。この時の病理像は腫瘍細胞への脂肪沈着とともに炎症細胞浸潤が見られ、メタボリックシンドローム患者で見られる新しい変異型 Steatohepatitis Hepatocellular Carcinoma (脂肪肝細胞癌) である。また、高分化型の Hepatocellular Carcinoma (肝細胞癌)、炎症細胞浸潤とともに Ductular Reaction (細胆管増生) や Focal Necrosis (病巣壊死) などの胆汁うっ滞型肝障害も観察できる。このような悪性化した肝がん発症は肝臓だけでなく、小腸での CREBH 欠損も原因と考えている。

2. 研究の目的

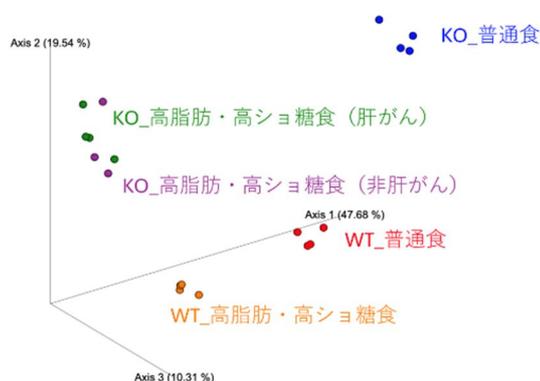
小腸の転写因子 CREBH が小腸の構造維持と腸内細菌叢を制御し、小腸の栄養代謝を維持することを明らかにする。CREBH 欠損マウスの小腸構造異常による下記の変化のため、全身性の慢性炎症を引き越し、生活習慣病を増悪化させると仮説を立てている。1) 栄養吸収異常による全身性の代謝異常、2) 栄養吸収異常による腸内細菌叢の変化、3) 栄養代謝・免疫応答の異常を発端とした小腸内細胞間連関異常による小腸構造破綻、4) 腸からのアレルゲン侵入による炎症。新規生活習慣病の治療戦略を構築するために、この未明のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

- 1) 肝がん発症マウスの解析
野生型 (WT) マウスと CREBH 全身欠損 (KO) マウスに高脂肪・高シヨ糖食を3か月間負荷し、肝がんを発症させたのち、盲腸より便を回収した。回収した便より DNA を抽出し、16s リボソーム RNA シークエンスにより腸内細菌の解析を行った。
- 2) 腸管バリア機能の解析
CREBH flox マウスと Villin Cre を用いた CREBH 腸管特異的欠損 (IKO) マウスに 3.0% DSS / water を5日間自由飲水させ、腸炎を誘導した。DSS に対する感受性から腸管バリア機能の評価を行った。
- 3) 腸管内部構造の解析
WT マウスと KO マウスの小腸より腸管オルガノイドを樹立し、腸管内部構造の形成に対する CREBH 欠損の影響を検討した。また、オルガノイドの通常培養液には血清や脂質は含まれていないが、高脂肪食負荷時の腸管の状態を再現するため通常培養液に脂肪酸を添加し、腸管オルガノイドの培養を行った。

4. 研究成果

- 1) 肝がん発症マウスの解析
高脂肪・高シヨ糖食の負荷により、WT マウスは単純性脂肪肝や MASH を発症した。それに対し、KO マウスは MASH 病態が悪化し、重篤な線維化あるいは肝がんを発症した。KO マウスが肝がんを発症する確率は約 50% であった。そこで、肝がん発症の有無に対して腸内細菌叢の違いが影響すると思われ、高脂肪・高シヨ糖食を負荷した KO マウスは肝がんを発症したマウスと発症しなかったマウスともに腸内細菌を解析した。主成分分析から、高脂肪・高シヨ糖食を負荷した条件、普通食を負荷した条件ともに、WT マウスと KO マウスで腸内細菌叢に違いがあることが明らかになった。しかし、KO マウスの肝がんを発症したマウスと発症しなかったマウスは主成分分析では違いが認められなかった。細菌種の解析では、KO マウスで減少、あるいは欠失している細菌には、生活習慣病の改善に働くことが報告されている細菌が多くピックアップされた。反対に KO で増加、あるいは特異的に発現する細菌は、生活習慣病の悪化に働くことが報告されている細菌が多く存在した。これらの結果から CREBH 欠損における生活習慣病病態の悪化に腸内細菌叢の変化が関与することが示唆された。また、わずかではあるが肝がん発症マウスでのみ特異的に高発現する細菌が存在することも確認され、CREBH 欠損によってもたらされる腸内細菌叢の変化ががん化の要因である可能性も示された。

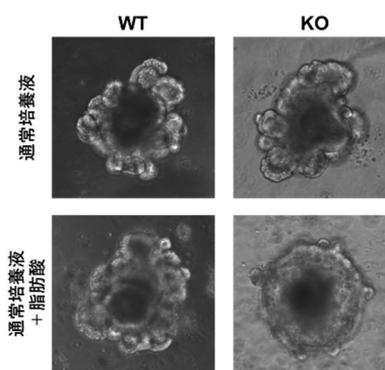


2) 腸管バリア機能の解析

3.0% DSS を投与した flox マウスと IKO マウスはともに腸炎を発症した。IKO マウスは flox マウスに比べ早期に血便の排泄が確認され、体重が大きく減少した。結腸の遺伝子発現解析から、IKO マウスは flox マウスに比べて炎症が悪化していることが確認された。大腸の病態が悪化している IKO マウスでは小腸における腸炎も惹起されていることが想定された。小腸の腸管内容物への血液の混在が IKO マウスのみで確認されたものの、病理所見や遺伝子発現解析では flox マウスと IKO マウスともに小腸における炎症の症状は確認できなかった。これらの結果は CREBH 欠損により DSS 感受性が増加することを示しており、CREBH 欠損に伴い腸管バリア機能が脆弱化することが示唆された。

3) 腸管内部構造の解析

通常培養液で培養した腸管オルガノイドは、WT マウスより樹立したオルガノイドと KO マウスより樹立したオルガノイドで、生存率や成長速度、形態に顕著な違いは認められなかった。この結果から細胞外からの脂質供給がない場合、CREBH 欠損は腸管の内部構造に大きな影響を与えないことが示された。しかし脂肪酸を添加した培養液では、WT マウスより樹立した腸管オルガノイドの生存、生育に異常が認められない脂質の濃度にも関わらず、KO マウスより樹立した腸管オルガノイドは生存率が著しく低下した。さらに、生存した KO マウスの腸管オルガノイドは正常な形態をとらず、スフェア形態を維持したまま肥大化した。スフェア形態の腸管オルガノイドには腸管幹細胞とニッチ



であるパネート細胞しか存在しないため、CREBH 欠損は腸管幹細胞の分化障害あるいは、分化後の細胞の生存障害を引き起こすと考えられる。これらの結果から、CREBH が欠損した腸管は高脂肪による刺激に対して、腸管の内部構造を維持する能力が低下すると考えられ、高脂肪食負荷時の栄養吸収の異常や腸管バリア機能の障害、腸内細菌叢の変化を引き起こすと想定される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------