

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590755

研究課題名(和文)酪酸菌を用いたNASHの進展・発癌阻止を目指した予防法の開発

研究課題名(英文)Development of a method for preventing NASH progression and hepatocarcinogenesis by using butyrate-producing probiotics

研究代表者

渡辺 哲(WATANABE, Tetsu)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10129744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：CDAA食投与によるラットNASHモデルでは、投与2週目より著明な脂肪肝がみられ、肝線維化(8週)、肝硬変(16週)、肝がん(50週)へと進行した。酪酸菌を投与した群では、肝での酸化ストレス抑制、門脈中エンドトキシン減少、肝脂肪沈着の抑制、インスリン抵抗性の改善、炎症反応抑制等が認められ、同時に肝でAMPK、AKTのリン酸化とともにNrf2の著明な発現増加がみられた。In vitroの解析より、酪酸によるAMPKのリン酸化はSirtuin1のリン酸化と核移行を促し、その結果mTOR2 complexの集積とAKTのSer473のリン酸化が起こり、最終的にNrf2の発現が増加することが判明した。

研究成果の概要(英文)：We used a CDAA diet to establish rat NASH model. Rats treated with CDAA diet containing 10% MIYAIRI588, a pharmaceutical product of *C. butyricum*, reduced CDAA-diet induced hepatic lipid deposition and significantly improved the triglyceride content, insulin resistance, serum endotoxin levels, and hepatic inflammatory indexes. We also found that MIYAIRI 588 substantially increased the activation of hepatic AMPK and AKT and Nrf2 and its targeted antioxidative enzymes, which suppressed hepatic oxidative stress. In vitro studies revealed that sodium butyrate (NaB) activated AMPK and AKT and enhanced Nrf2 expression. NaB-mediated AMPK activation induced the phosphorylation and nuclear translocation of Sirtuin 1, leading to the increased assembly of mTOR complex 2 and phosphorylation of AKT and subsequent induction of Nrf2 expression and activation. These data clearly showed that the butyrate-producing probiotic MIYAIRI 588 has beneficial effects in the prevention of NASH progression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：予防医学 肝発癌予防 肝線維化予防 プロバイオティクス 酪酸

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年我が国の健診受診者の20~30%は脂肪肝を伴っており、その頻度が年々増加していることが報告されている。職場健診においてみられる肝機能障害者の多くは非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) であり、メタボリックシンドロームの肝臓での表現型とされる。NAFLD を有する者は、5年後にメタボリックシンドロームを発症する率が有意に高いことを明らかにした (アルコールと医学生物学、2009)。NAFLD の中で約10~15%をしめる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、炎症が持続し、高率に肝硬変、肝細胞癌へと進展することが報告されている。我が国でNAFLDの率が健診などで増加していることより、近い将来、現在のウイルス性肝炎からの発癌と同程度の患者がNASHより発症することが想定される。

(2) NASHの進展機序として、肝への脂肪沈着を1stヒットとし、2ndヒットとして酸化ストレスや腸内細菌の産生するエンドトキシンによる炎症が持続するというtwo hit theoryが広く支持されている。しかし、最近では肥満、高脂肪食により変容した腸内細菌により産生されるエンドトキシンによる慢性炎症が脂肪肝とは無関係に起こるといふ説も指示されつつある。

(3) 酪酸は、腸内細菌により食物繊維から腸管内で産生される短鎖脂肪酸の一種で、大腸癌の発生予防効果が認められている。また、酪酸は *in vitro* で種々の癌細胞に対する強力な分化誘導作用やアポトーシス作用が認められている。さらに、酪酸にはエネルギー代謝の改善や糖尿病糖代謝改善効果が報告されている。

2. 研究の目的

人のNASHと類似の肝病変(脂肪肝から肝硬変、肝癌へ)を呈するコリン欠乏アミノ酸置換 (CDAA) 食投与ラットモデルを用い、その病態進展におけるプロバイオティクス MIYAIRI 588 (酪酸菌) の予防効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) 動物実験：人のNASHモデルとして、コリン欠乏アミノ酸置換食 (CDAA 食) 投与ラットを用いた。Fisher ラット (6~7週齢) にCDAA食を投与し、2週間、8週、50週目にラットを屠殺し、血液(尾静脈及び門脈)、肝臓、大腸、糞便を採取した。酪酸菌投与群は、酪酸菌 (8.5×10^9 cfu/g) を10%の割合でCDAA食に添加し、CDAA食開始2週目より与えた。コントロールはCSAA食を投与した。

(2) 組織学的検討：それぞれの群より採取した肝組織は、HE染色、アザン・マロリー染

色、Oil-red O染色を行った。

(3) 免疫組織学的検討：それぞれの特異抗体を用い、 α -smooth muscle actin (α -SMA)、4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)、glutathione S-transferase placental form (GST-P) の検出を行った。2つの抗原の共発現は共焦点レーザー顕微鏡で行った。

(4) 生化学的検討：末梢血ALT、肝組織中性脂肪はそれぞれ市販のキットを用いて行った。肝のTNF- α はELISAキットで、肝での脂質過参加の判定はTBARSキットを用いたmalondialdehyde (MDA) 測定で行った。空腹時血清インスリンと血糖値よりHOMA-IRを算出し、インスリン抵抗性の指標とした。門脈血中のエンドトキシン濃度は、Pyrochrome LAL kitを用いて行った。

(5) Western blot法：蛋白発現はWestern blot法により行った。用いた抗体は以下の通りである。 α -SMA, α -tubulin, β -actin (Sigma), Nrf2, PPAR- α , PPAR-c, SREBP-1c, Lamin B (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), AKT, phospho-AKT (Ser473), phospho-AKT (Thr308), AMPK- α , phospho-AMPK (Thr172), mTOR, rictor, raptor, ubiquitin, p65 NF- κ B (Cell Signaling, Beverly, MA), collagen I, UCP-2, TRX (Abcam, Cambridge, UK), Keap1, NQO1, SIRT1 (Proteintech group, Chicago, IL), ZO-1, Occludin (Zymed Laboratories, San Francisco, CA), BSEP (Kamiya Biomedical, Seattle, WA), HO-1 (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA), histone H3 (Millipore, Bedford, MA), GST-P (MBL)。ヒトNrf2、SIRT1とリン酸化 SIRT1 (Ser47) の検出のため、anti-Nrf2 (Abcam), anti-SIRT1 (Millipore)、と phospho- SIRT1 (Cell Signaling) を用いた。

(6) 細胞培養：In vitroでのシグナル伝達解析のため、ヒト肝癌細胞株 HepG2 を用いた。インスリン抵抗性モデルは、高濃度グルコース (30 mM D-glucose) を無血清のDMEM培地に24時間添加し作成した。

(7) 遺伝子発現阻止：遺伝子発現阻止は siRNAを用いて、AMPK α 1、SIRT1、RICTOR、AKT1の発現を抑えた。

(8) 免疫沈降：免疫沈降は、Pierce Crosslink Immunoprecipitation Kitを用いて行った。

4. 研究成果

(1) 酪酸菌投与によるNASHの進展阻止：
CDAA食投与2週目より肝臓に著明に脂肪沈着がみられ、8週目で線維化、16週目で肝硬変へと進展し、50週目で肝がんを合併した。酪酸菌をCDAA食開始2週目より投与した群では、病変の進行が明らかに抑制されていた(図1)。

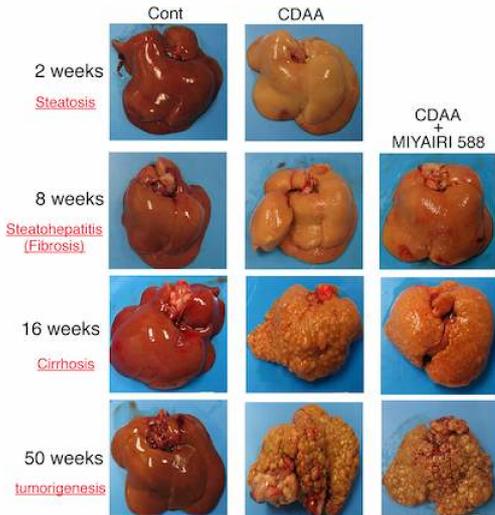


図1 酪酸菌によるNASH進展阻止

(2) 肝における脂肪沈着抑制とインスリン抵抗性改善： Oil-red O染色では脂肪沈着が著明に抑制され、肝臓におけるTGの沈着を抑制されていた(図2A, B)。この作用にAMPKが関与しているか否かをWestern blotでみたところ、CDAA食で低下したリン酸化酪酸菌投与で回復し、AMPKの標的となるPPAR- α も回復していた。一方脂肪合成に与する(SREBP)-1c や uncoupling protein 2 (UCP2) や PPAR- λ の発現はCDAA食で増加し、酪酸菌投与で減少した(図2C)。インスリン抵抗性の指標であるHOMA-IRは、酪酸菌投与で著明に減少した(図2D, E, F)。また、CDAA食で抑制された肝臓でのAKTのser 473のリン酸化が酪酸菌投与で回復した(図2G)。

((3) 酪酸菌によるエンドトキシン低下：
CDAA食投与ラットでは、門脈血中のエンドトキシン濃度が高かったが、酪酸菌投与群では有意に低下していた(図3A)。大腸の透過性を規定するTJ蛋白のZO-1とoccludinは、CDAA食群では低下したが、酪酸菌群では回復がみられた(図3B, C)。また、CDAA群で上昇した肝のNF- κ BやTNF- α や血清ALT値は、酪酸菌群で低下し、肝での炎症が抑制されていた(図3C, D)。

(4) 肝における酸化ストレス抑制とNrf2の誘導：肝での脂質過酸化の指標である4-HNEとMDAは、いずれもCDAA群で上昇し酪酸菌

群で著明に低下し、また肝におけるスーパーオキシドの産生(DFEの核染色)も著明に抑制された(図4A, B, C)。CDAA食8週投与群と比べ酪酸菌投与群では、抗酸化ストレスや解毒に働く酵素を誘導する Nrf2 やその下流で働く heme oxygenase-1 やNAD(P)H:quinone oxidoreductase 1が誘導された(図4 D)。

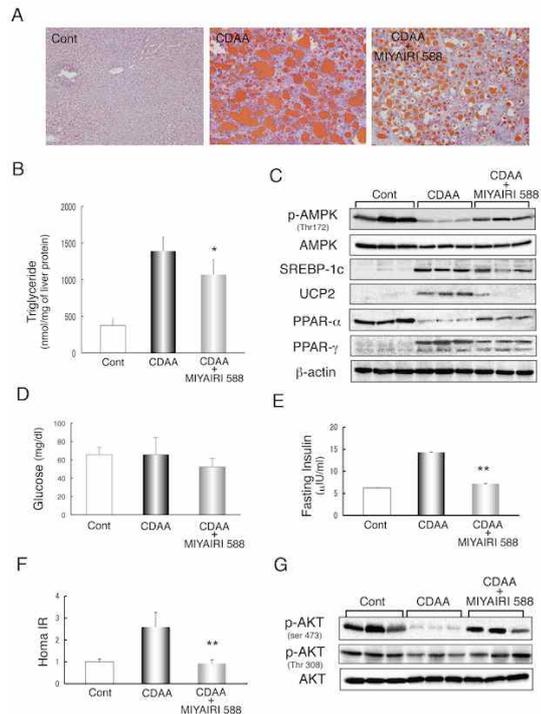


図2 酪酸菌の脂質代謝への効果

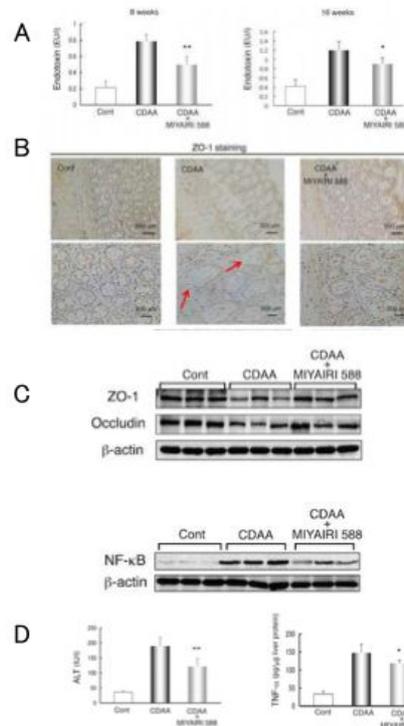


図3 酪酸菌によるエンドトキシン低下と腸管の透過性改善

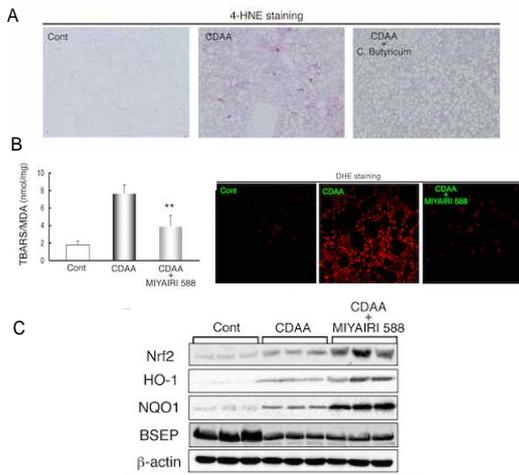


図4 酪酸菌による酸化ストレス抑制とNrf2誘導

(5) 酪酸によるNrf2の誘導の機序：培養ヒト肝癌細胞株HepG2に酪酸を添加すると、AMPK (Thr 172) のリン酸化とAKT (Ser 473) のリン酸化と共にNrf2が誘導され、in vivoの所見と同様であった(図5A)。酪酸添加と同時にAMPKの特異的阻害剤 compound C (CC) を加えると、AKTのリン酸化とNrf2の発現は抑制されたが、PI3Kの阻害剤 LY294002添加ではAMPKのリン酸化は抑制されなかったが、AKTリン酸化とNrf2の発現は一部抑制された(図5B)。In vivoの実験では酪酸菌投与ではSIRT1が誘導されたので、HepG2に酪酸やAMPK作動薬のAICARを添加すると、SIRT1のSer47のリン酸化が認められ、CC添加でその作用は阻害されたがLY294002では阻害されなかった(図5C)。酪酸によるSIRT1のリン酸化はAMPK α 1のsiRNAで抑制されたが、riCTORの発現には影響なかった(図5D)。免疫沈降法では、酪酸やAICARにより結合したriCTORとmTORC2の結合がAMPK α 1やSIRT1のsiRNAにより完全に阻害された(図5E)。

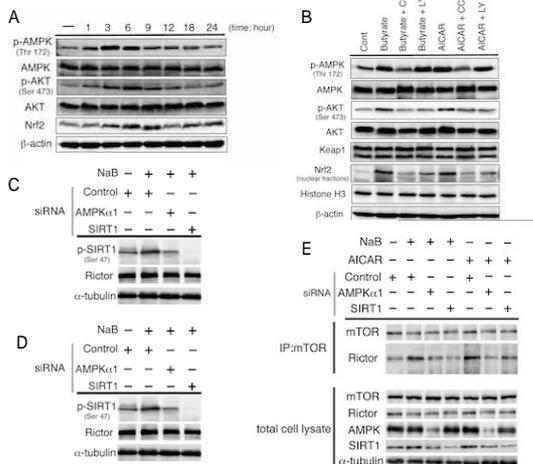


図5 酪酸によるNrf2活性化の機序

(6) 酪酸菌による肝線維化抑制：酪酸菌投与群では、CDAA食投与8週、16週目の肝線維

化が著明に抑制されていた(図6A)。また、肝線維化に關与する活性化肝星細胞のマーカーである α -SMAやI型コラーゲンの産生も著明に抑制されていた(図6B, C)。さらに、肝発癌の初期マーカーとされるGST-Pの発現面積は、CDAA群と比べ酪酸菌投与群では著明に減少していた。CDAA投与50週目の肝での肉眼的腫瘍数(≥ 1 mm)、及び最大腫瘍の直径も酪酸菌投与群では有意に低値であった。

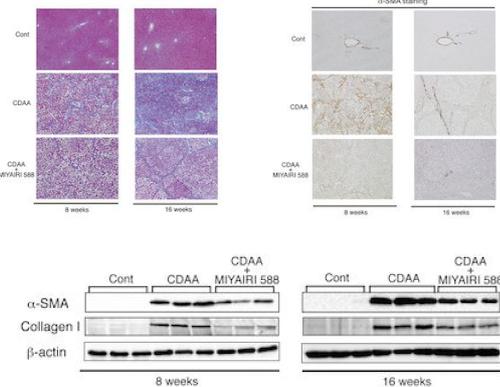


図6 酪酸菌による肝線維化抑制

以上のように、酪酸を産生するMIYAIRI 588 (*Clostridium butyricum*) はCDAA食投与によるラットのNASHモデルにおいてその進行を阻止し、肝癌の発生を抑制した。これまでの研究で、CDAA食群、CDAA食+酪酸菌投与群、CSAA食投与群(コントロール)間でラットの腸内細菌叢が異なる事を確認しており、腸管内でのエンドトキシン産生低下につながると考えられる。さらに腸管でのAMPK活性化を介したTJタンパクの発現回復もあり門脈血中のエンドトキシンが減少し、その結果肝での炎症抑制を来したと考えられる。酪酸菌投与により、脂質代謝改善、インスリン抵抗性改善、肝での酸化ストレス抑制、肝線維化抑制、肝発癌抑制など様々な好ましい現象が観察されたが、これらの作用は腸管で産生された酪酸が門脈を通過して直接肝臓で作用したと考えられ、HepG2細胞を用いて解析を行った。その結果、酪酸刺激によるAMPK/SIRT1/PI3K/mTORC2/AKT/Nrf2のシグナル伝達系の存在が明らかとなり、NASHの進行阻止に關与している事が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計6件)

Hitoshi Endo H, Maki Niioka, Noriko Kobayashi, Mamoru Tanaka, Tetsu Watanabe. Butyrate-Producing Probiotics Reduce Nonalcoholic Fatty Liver Disease

Progression in Rats: New Insight into the Probiotics for the Gut-Liver Axis. PLOS ONE, 査読有, 8(5), 2013, e63388
Subrina Jesmin, Reazul Islam, Shahidul Islam, Sohag Mia, Sayeeda Nusrat Sultana, Sohel Zaedi, Naoto Yamaguchi, Yoshio Iwashima, Michiaki Hiroe, Tetsu Watanabe. Comprehensive assessment of metabolic syndrome among Rural Bangladeshi Women. BMC Public Health, 査読有, 12, 2012, 49
Muna Shalima Jahan, Syed Muhammad Baqui Billah, Hiroyuki Furuya, Tetsu Watanabe. Female sexual dysfunction: facts and factors among gynecology outpatients. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 査読有, 38, 2012, 329-335
Hitoshi Endo, Maki Niioka, Yoshihiko Sugioka, Johbu Itoh, Kaori Kameyama, Isao Okazaki, Risto Ala-Aho, Veli-Matti Kähäri, Tetsu Watanabe. Matrix metalloproteinase-13 promotes recovery from experimental liver cirrhosis in rats. Pathobiology, 査読有, 78 (8), 2011, 239-252
Syed Muhammad Baqui Billah, Muna Shalima Jahan, Subrina Jesmine, Bounelome Keobouahome, Yoshihisa Watanabe, Takaki Kinoue, Hiroyuki Furuya, Tetsu Watanabe. Metabolic syndrome in Bangladesh using NCEP Adult Treatment Panel III criteria. Jps J Clin Ecology, 査読有, 20 (1), 2011, 61-70
Hiroyuki Furuya H, Shoji Kawachi, Mika Shigematsu, Kazuo Suzuki, Tetsu Watanabe. Clinical factors associated with severity in hospitalized children infected with avian influenza (H5N1). Environmental Health and Preventive Medicine, 査読有, 16 (No.1), 2011, 64-68

〔学会発表〕(計 4 件)

長谷川 卓弥、角田 正史、菅谷 ちえ美、杉浦 由美子、木戸 尊将、細川 まゆ子、遠藤 整、渡辺 哲、相澤 好治、胎生期・授乳期トリブチルスズ曝露による雌 Tokai High Avider (THA) ラットの成長抑制とオープンフィールド試験、第 86 回日本産業衛生学会 2013 年 5 月 15 日(松山)
堀江 正知、川波 祥子、谷澤 有美、中村 文、水野 千景、奈良井 理恵、川瀬 洋平、渡辺 哲、ウイルス性肝炎に罹患した労働者の就業上の措置等の産業保健活動に関する産業医の意見調査、第 86 回日本産業衛生学会 2013 年 5 月 16 日(松山)
古屋 博行、遠藤 整、渡辺 哲、職域における肝炎対策の実態と慢性ウイルス性肝炎患者への配慮に関する調査研究、第 86 回日本産業衛生学会 2013 年 5 月 16 日(松山)
遠藤 整、新岡真希、渡辺 哲、プロバ

イオテイクス製剤 MIYAIRI 588 は NASH の進展および肝腫瘍形成を予防する、第 72 回日本癌学会総会 2013 年 10 月 3 日(横浜)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称: Nrf2 活性化剤およびその用途
発明者: 渡辺 哲、遠藤 整、田中 守
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 2012-100236
出願年月日: 平成 24 年 4 月 25 日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
渡辺 哲 (WATANABE Tetsu)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 10129744