

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461968

研究課題名(和文) Metabolic surgeryによるNAFLD改善効果 腸内細菌から検証する

研究課題名(英文) Improvement of NAFLD by Metabolic surgery Validated from intestinal bacteria flora

研究代表者

田中 直樹 (TANAKA, NAOKI)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60547404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肥満・代謝疾患(糖尿病およびNASH)モデルラットに代謝手術である十二指腸空腸バイパス術(DJB)を施行することで、以下の知見を得た。DJBの体重増加抑制効果と代謝改善効果(糖尿病・NASH)、DJBの脂質吸収抑制効果およびそれに伴うエネルギー代謝の変化、DJB術後の腸管細菌叢構成の変化、DJB術後の血中胆汁酸濃度上昇、DJBによる体重増加抑制、糖尿病改善効果および脂質吸収抑制についてはBPLの切除でキャンセルされる。今回得られた知見はDJBの代謝改善効果にはBPLの存在が重要であり、その機序として胆汁酸や腸内細菌の関与を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we obtained following findings by performing duodenal jejunal bypass (DJB), which is a metabolic operation, for Obesity / Metabolic Disease model rats. Those findings indicate that the presence of BPL is important for the metabolic improvement effect of DJB. However, the direct involvement and detailed mechanism of the increase in blood bile acid concentration and change in intestinal bacterial flora have not been sufficiently elucidated and it is considered as a future subject.

(1) DJB has weight gain suppression effect and metabolic improvement effect (diabetes / NASH), (2) Lipid absorption suppression effect of DJB and accompanying change in energy metabolism, (3) Change in composition of intestinal flora after DJB, (4) Increase in blood bile acid concentration, (5) The above weight gain suppression, diabetes improving effect and lipid absorption suppression are canceled by resection of BPL.

研究分野：代謝外科

キーワード：NASH 代謝改善手術

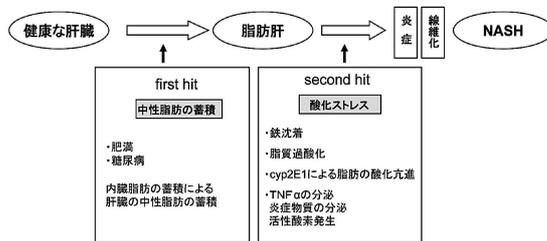
1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満とNAFLD/NASH

肥満やそれに伴う糖尿病は肝臓に脂肪蓄積をもたらし, NAFLDを高率に合併する. NAFLDは「単純性脂肪肝」および慢性炎症の加わったNASHに分類される. NAFLDを基礎疾患とする肝硬変, 肝臓は増加の一途にあり, この対策が急がれている. 近年, NAFLDを合併する病的肥満症患者が減量手術後に高率に寛解または軽快することが明らかになり, NAFLDの有効な治療法としても減量手術が注目されるようになってきている.

(2) NASH発症機序 “two hit theory”

NAFLDの発症からNASHへの進行機序としてtwo hit theoryが提唱されている. まず, 肥満や糖尿病などで肝臓に中性脂肪が蓄積され, 脂肪肝となりNAFLDを発症する (First hit). この状態に肝脂肪過酸化, 鉄沈着, 腸内細菌で産生されるエンドトキシン, 二次胆汁酸などによる酸化ストレスが持続するとNASHへと移行する (Second hit). NAFLDのNASHの状態が持続する10年以上の経過で約20%の患者が肝硬変へと進行するとされている.



NAFLDの発症進行メカニズム

(3) 腸内細菌叢とNASH

ヒト腸内には500種類以上, 500兆個以上もの細菌が存在し, 種々の細菌がバランスを保ちながら一種の生態系を形成し, 宿主の恒常性維持に役立っている. 近年, 細菌叢のメタゲノム解析 (microbiome解析) が可能となり, 腸内細菌のバランスがその宿主のエネルギー調節や栄養の摂取等のエネルギー恒常性維持に深く関与し, 肥満や糖尿病などの病態に影響するということが明らかにされつつある. 腸内細菌叢は, 肝臓から排出される胆汁に含まれる一次胆汁酸を二次胆汁酸に変換する作用を持ち, 高脂肪食を摂取している場合に, エンドトキシンや二次胆汁酸を産生する菌が多くなることが報告されており, 肝細胞に酸化ストレスを与える (Second Hit).

(4) Metabolic surgeryと腸内細菌叢

ヒトおよび動物モデル実験でRYGB後に腸内細菌叢の変化が生じることがこれまでも報告されており, 手術後のNAFLD改善効果に腸内細菌叢の変化が関与している可能性が十分に高いと考えられ, その詳細の解明が待たれている. また, 肥満者の腸内細菌を無

菌マウスの腸内に移植すると肥満をきたすことも確認されている.

2. 研究の目的

以上より我々は, 以下の2項目を実験的に検討することを目的とした.

- (1) metabolic surgeryの本質的な術式といえる, 十二指腸空腸バイパス術および空腸回腸置換術による術後の腸内細菌叢の変化
- (2) 確認された腸内細菌叢の変化が宿主のNAFLD発症および進行におよぼす影響とその機序の解明

3. 研究の方法

(1) 本研究で使用した動物モデル

OLETF ラット

雄性的 Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) ラットを使用. 過食から肥満および高インスリン血漿をとともう高血糖を呈し, 2型糖尿病やメタボリックシンドロームのモデル動物として使用されている.

食餌誘発 NASH モデルラット

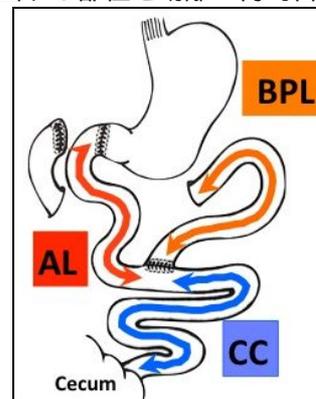
雄性的 Sprague-Dawley (SD) ラットを使用し, ファストフードを模した Fast Food Diet (FFD: 高脂質 (40%Kcal, 飽和脂肪酸 94%), 高フルクトース (21%Kcal), 高コレステロール (1%weight)) を給餌して作成した.

食餌誘発肥満モデルラット

Wistar 系雄性的ラットラットに高脂肪食 (脂質 45%Kcal, タンパク質 20%Kcal, 炭水化物 35%Kcal) を給餌して作成した.

(2) 十二指腸空腸バイパス術 (DJB)

まず, 幽門輪のやや肛側で十二指腸を切離し, 肛門側断端を閉鎖した. Treitz 靱帯の肛門側で空腸を切離し, その肛門側断端を十二指腸の口側断端を吻合した. 空腸の口側断端は, 十二指腸・空腸吻合部の肛門側の空腸に吻合した. これらの操作で, 小腸は食餌のみの通る Alimentary limb (AL), 胆汁膵液のみの通る Bilio-pancreatic limb (BPL) および両者が混じる Common channel (CC) の3つのパートで構成されることとなる. 実験の目的により各パートの長さを適宜設定した. 一方, sham 手術では, 相当する部位を切離・再吻合した.



(3) DJB における腸内細菌叢の変化の検討

犠死時に回腸末端部およびS状結腸から糞便を採取し保存した。ビーズ式破碎装置を用いて、細菌DNAをFast DNA Spin Kit For Soilにて分離精製した。腸内細菌叢をterminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法にて解析した。

(4) エネルギー代謝測定

小動物用間接熱量装置を用い、チャンバー内の3分毎のラットの酸素摂取量 (VO_2)、二酸化炭素排出量 (VCO_2)、および呼吸商 (RQ) を24時間連続測定した。また得られた VO_2 、および VCO_2 から計算式を用いて各エネルギー量を計算した。

(5) 便中脂肪量測定

術後10週に24時間糞便量を採取し測定した。便中脂肪量測定は、得られた便サンプル100mgから脂質抽出キットを用いて脂質抽出を行い、脂質定量キットを用いて測定した。

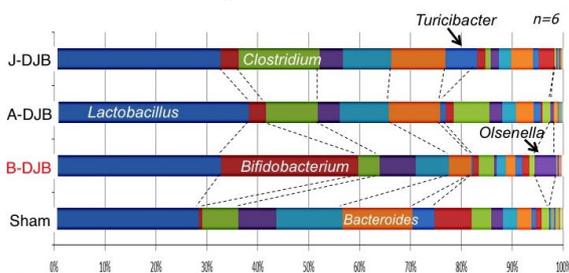
4. 研究成果

(1) DJB による体重増加抑制効果および糖尿病改善効果

OLETFラットにDJBを施行することで、体重抑制効果および糖尿病改善効果を認めた。また、その効果はBPLを切除することでキャンセルされることを見いだした。DJBの代謝改善効果にBPLの存在が重要である可能性が示唆された。

(2) DJB の腸管細菌叢に与える変化

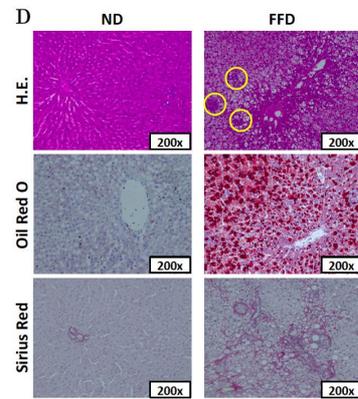
DJB術後には探査脂肪酸を産生し、ホストのエネルギー代謝を亢進するとされるピフィドバクテリウムやオルスネラの著明な増加と、肥満形成と関連があるとされるクロストリジムの減少を認めた。



(3) 食餌誘発 NASH モデルラットの作成

FFDを12週間投与したラットにおいて、有意な体重増加と耐糖能の増悪を認めた。血中AST/ALT値は有意に高値であり、肝は著明な腫大と脂肪化を認めた。病理組織学的検査では、肝細胞の小～大滴性脂肪変性のほか、炎症細胞の浸潤、肝細胞の障害を示す風船様変性を認めた。NAFLD Activity Score (NAS) の平均値は5.2であり、NASHと診断し得る結果であった。また、門脈域を主体とした線維化も伴っていた。

(4) DJB による NASH の改善効果



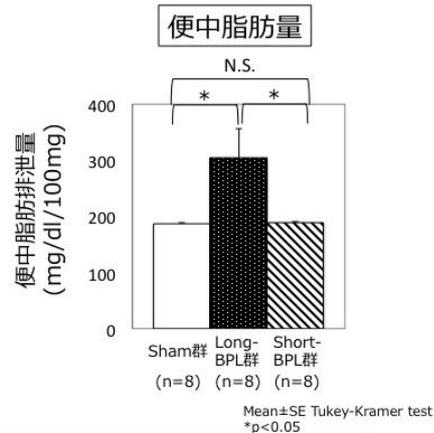
上記ラットにDJBを施行したところ、Sham群と比較し、DJB群では体重増加の抑制、耐糖能の改善を認めた。肝腫大、血中AST/ALT値は有意に低値であり、肝炎の改善が示唆された。病理組織学的検査においても、DJB群では炎症細胞の浸潤が軽微であり、NASも2.4と有意に低値であった。

(5) 食餌誘発肥満ラットの作成

高脂肪食群は普通食群と比較して、有意に体重の増加、耐糖能の増悪、インスリン抵抗性の増悪、脂肪組織重量の増加を認めた。

(6) DJB 後のエネルギー代謝・便中脂肪量変化

BPLに相当する30cmの空腸を切除したshort-BPL群と通常のlong-BPL群について比較検討した。1日便量と便中脂肪量はshort-BPL群で有意に増加した。エネルギー代謝測定では、エネルギー消費量は各群間で同等であったが、short-BPL群で炭水化物酸化量の増加と脂肪酸化量の減少を認めた。



以上の結果から、以下の知見が得られた。

DJBの体重増加抑制効果と代謝改善効果(糖尿病・NASH)

DJBの脂質吸収抑制効果およびそれに伴うエネルギー代謝の変化

DJB術後の腸管細菌叢構成の変化

DJB術後の血中胆汁酸濃度上昇

以上の体重増加抑制、糖尿病改善効果および脂質吸収抑制についてはBPLの切除でキャンセルされる。(NASH改善効果については未確認)

今回得られた知見は DJB の代謝改善効果には BPL の存在が重要であり,その機序として胆汁酸や腸内細菌の関与を示唆するものである.しかしながら,胆汁酸濃度上昇や腸内細菌叢の変化の直接的な関与やその機序は十分に解明されておらず,今後の課題と考える.

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2件)

- (1) Biliopancreatic limb plays an important role in metabolic improvement after duodenal-jejunal bypass in a rat model of diabetes. Miyachi T, Nagao M, Shibata C, Kitahara Y, Tanaka N, Watanabe K, Tsuchiya T, Motoi F, Naitoh T, Unno M. Surgery. 2016 May;159(5):1360-71.(査読有)
- (2) 肥満症外科治療の基礎:効果メカニズム. 土屋堯裕, 内藤剛, 海野倫明 肥満研究 21(2):27-35(2015.4)(査読無)

〔学会発表〕(計11件)

- (1) 河野えみ子, 土屋堯裕, 長尾宗紀, 土屋堯裕, 井本博文, 渡辺和宏, 田中直樹, 大沼忍, 大塚英郎, 水間正道, 坂田直昭, 中川圭, 林洋毅, 森川孝則, 武者宏昭, 元井冬彦, 内藤剛, 海野倫明, 十二指腸空腸バイパスにおける bilio-pancreatic limb がエネルギー代謝に及ぼす影響の検討, 第117回日本外科学会定期学術集会(平成29年4月29日、横浜市 パシフィコ横浜)
- (2) 河野えみ子, 長尾宗紀, 田中直樹, 渡辺和宏, 井本博文, 宮地智洋, 土屋堯裕, 元井冬彦, 内藤剛, 海野倫明, 十二指腸空腸バイパスにおける bilio-pancreatic limb の機能 食餌誘発性肥満ラットでの検討, 第34回日本肥満症治療学会総会,(平成28年7月1日、東京都中央区 東京コンベンションホール)
- (3) 土屋堯裕, 長尾宗紀, 田中直樹, 渡辺和宏, 井本博文, 大沼忍, 水間正道, 坂田直昭, 大塚英郎, 森川孝則, 武者宏昭, 林洋毅, 中川圭, 元井冬彦, 内藤剛, 海野倫明, Duodenal jejunal bypass の NASH 改善効果の検証, 第116回日本外科学会定期学術集会(平成28年4月16日、大阪市 大阪国際会議場)
- (4) 土屋堯裕, 内藤剛, 海野倫明, 消化器疾患と胆汁酸 病態・診断・治療への関わり

り 十二指腸空腸バイパス手術後ラットにおける血中胆汁酸上昇と NASH 改善効果の検討, JDDW 2015 (平成27年10月9日、東京都品川区 グランドプリンスホテル新高輪)

- (5) Tsuchiya T, Nagao M, Tanaka N, Imoto H, Miyachi T, Kono E, Musha H, Motoi F, Naitoh T, Unno M: Duodenal-jejunal bypass improves non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in a diet-induced rat model. IFS02015(平成27年8月26日、Vienna Austria)
- (6) 宮地智洋, 内藤剛, 田中直樹, 長尾宗紀, 渡辺和宏, 土屋堯裕, 河野えみ子, 元井冬彦, 片寄友, 海野倫明, 消化器外科領域における基礎研究 十二指腸空腸バイパスにおける biliopancreatic limb の機能 Metabolic surgery の機序解明にむけた新知見, 第70回日本消化器外科学会総会(平成27年7月17日、浜松市 ホテルオークラ)
- (7) 内藤剛, 生澤史江, 井本博文, 宮地智洋, 土屋堯裕, 河野えみ子, 田中直樹, 長尾宗紀, 海野倫明, Metabolic Surgery の理論的根拠 Metabolic surgery の作用機序 基礎的実験の結果から, 第33回日本肥満症治療学会学術集会(平成27年6月27日)(千葉市 幕張国際研修センター)
- (8) 土屋堯裕, 田中直樹, 長尾宗紀, 宮地智洋, 内藤剛, 海野倫明, 食餌誘発性 NASH モデルラットにおける十二指腸空腸バイパス手術の NASH 改善効果の検討, 第33回日本肥満症治療学会学術集会(平成27年6月27日、千葉市 幕張国際研修センター)
- (9) Miyachi T, Nagao M, Tanaka N, Sasaki H, Tsuchiya T, Kono E, Musha H, Morikawa T, Abe T, Ohnuma, Kudo K, Karasawa H, Aoki T, Nakagawa K, Yoshida H, Motoi F, Katayose Y, Naitoh T, Unno M: Bilio-pancreatic limb has a significant impact in metabolic improvement after duodeno-jejunal bypass in OLETF rat. IFS02014(平成26年8月27日、Montreal Canada)
- (10) Tsuchiya T, Nagao M, Tanaka N, Imoto H, Miyachi T, Kono E, Musha H, Motoi F, Naitoh T, Unno M: The effect of duodeno-jejunal bypass for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in the diet-induced rat model. IFS02014(平成26年8月27日、Montreal Canada)
- (11) 宮地智洋, 長尾宗紀, 田中直樹, 土屋堯裕, 内藤剛, 海野倫明: Alimentary

limb と Biliopancreatic limb が
Duodenojejunal bypass の代謝改善効
果におよぼす影響:2 型糖尿病モデルラ
ットでの検討.第 32 回日本肥満症治療
学会(平成 26 年 7 月 5 日、大津市 滋
賀県立県民交流センター)

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 減量手術の有効性における FXR, TGR5 を
介した胆汁酸シグナルの役割.宮地智洋,
内藤剛,海野倫明 糖尿病学2015:
66-73(査読無)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

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

田中 直樹(Tanaka Naoki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 60547404

(2)研究分担者

内藤 剛(Naitoh Takeshi)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 50291258

長尾 宗紀(Nagao Munenori)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 60451564