

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20848

研究課題名（和文）脂肪肝マウスにおける小腸細菌叢と胆汁酸代謝にリファキシミンが与える影響の検討

研究課題名（英文）Effect of rifaximin on small intestinal microbiota and bile acid metabolism in mice with fatty liver

研究代表者

池内 和彦（Ikeuchi, Kazuhiko）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70963221

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：高脂肪食負荷マウスにおいて、回腸でFirmicutes門のErysipelotrichaceaeが増加、Turibacteraceaeが減少する変化が見られた。ErysipelotrichaceaeはLDLコレステロールや血糖値と正の相関、Turibacteraceaeは負の相関が見られた。これらの変化や相関関係は回腸が一番強かった。リファキシミンはこれらの細菌の割合にほとんど変化を与えなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高脂肪食と小腸細菌叢の関連についての研究は少ない。ErysipelotrichaceaeやTuribacteraceaeは脂質代謝と関係があるとされる菌種と報告されているが、特に回腸で変化が大きく、LDLコレステロールや血糖値との相関が強く、小腸の中でも回腸細菌叢の重要性が示唆された。一方で、リファキシミンはこれらの菌種に期待されるような変化は示せず、これらの菌種の変化が主体である病態においては効果が乏しい可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In mice fed a high-fat diet, there was an increase in Erysipelotrichaceae and a decrease in Turibacteraceae in the ileum. Erysipelotrichaceae positively correlated with LDL cholesterol and blood glucose levels, while Turibacteraceae negatively correlated with these parameters. These changes and correlations were most significant in the ileum. Rifaximin had little impact on the proportions of these bacteria.

研究分野：感染症

キーワード：脂肪肝 リファキシミン 胆汁酸 小腸 細菌叢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 難吸収性抗菌薬のリファキシミンは抗炎症効果を発揮する

慢性肝炎・肝硬変の患者では、腸管運を動の低下、抗菌活性を持つ胆汁酸の低下、免疫機能の低下により、腸内細菌叢の悪化が起こることが知られている。腸内細菌叢の悪化は、腸管透過性の亢進、肝臓に流入する細菌由来のエンドトキシンの増加によりさらに炎症を悪化させる腸肝連関が注目されており、腸内細菌を改善させることで肝炎を改善させられないかと期待されてきた。一方で、腸内細菌の改善の手段として、プロバイオティクスや抗菌薬、糞便移植などが考えられるものの、臨床試験で有益性が示されている疾患、治療法は限られている。

リファキシミンは、グラム陽性・陰性、好気性・嫌気性に関わらず効果を発揮する難吸収性の抗菌薬で、肝性脳症の症状改善、血中アンモニア低下、炎症性サイトカインの低下などの有益な効果をもたらし、広く用いられている。日本でのリファキシミンの適応は肝性脳症だけであるが、海外では渡航者下痢症、過敏性腸症候群、小腸内細菌異常増殖症 (small intestinal bacterial overgrowth: SIBO) にも適応がある。また臨床試験において、炎症性腸疾患や非アルコール性脂肪肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) 患者への有効性が示される、抗炎症効果に注目して膠原病への効果も模索されるなど、他疾患への応用も拡がりつつある。

### (2) リファキシミンは便の細菌叢は変化させず、小腸のラクトバチルスを減少させる

大変興味深いことに、リファキシミンは便の細菌叢を大きく変化させないことがヒト、動物実験でも示されており、作用機序が不明であった。申請者は、リファキシミンが胆汁酸でミセル化されることで溶解性と抗菌活性が著増することに着目した。胆汁酸は胆管を介して十二指腸に排出され、回腸で吸収されるため、大腸～便には 5% ほどしか出てこない。そのため、リファキシミンは胆汁酸が豊富な十二指腸、空腸の細菌叢を変化させているが、胆汁酸の少ない大腸や便の細菌叢は変化させないのではないかと仮説を立て、動物実験を用いて検証を行ってきた。

小腸はヒトでは検体採取が難しく研究が進んでいない分野であり、また大腸に比べて細菌量が少ないこと、胆汁酸が PCR の阻害物質であることから、動物モデルでも研究が少ない分野である。申請者は小腸の細菌叢解析の系を確立し、四塩化炭素による肝線維化モデルマウスの十二指腸、空腸で増加したラクトバチルス科が、リファキシミンにより著明に減少すること、回腸～便ではリファキシミンが細菌叢に与える変化が乏しい、という新しい知見を得た。こうした知見は、リファキシミンは胆汁酸が豊富な十二指腸、空腸の細菌叢を変化させているという申請者の仮説に合致するものであり、これを報告した (引用文献 )。

### (3) 小腸のラクトバチルス科は胆汁酸代謝を介して、肥満、糖代謝に影響する

小腸の細菌叢は大腸と比べて菌量は少ないものの、糖代謝、アミノ酸代謝、脂質代謝、胆汁酸代謝などに関わっている。申請者の研究でリファキシミンにより減少したラクトバチルス科は、肥満、糖尿病、NAFLD などでも増加することが知られた細菌科で、小腸の主要な細菌科である。高脂肪食負荷マウスが用いられ、盲腸や便でラクトバチルスが増加したとする報告は多いが、小腸を解析した研究は少ない。海外からの既報では、抗酸化剤であるテンポールを高脂肪食負荷マウスに投与することで、盲腸のラクトバチルス科を減少させ、ラクトバチルス科の胆汁酸塩加水分解酵素による胆汁酸の脱抱合が抑制され、腸管 FXR シグナルが低下し、肥満やインスリン抵抗性を改善させたことが報告されている (引用文献 )。リファキシミンは NAFLD における血中肝逸脱酵素や炎症性サイトカインを減少させることが示されており、小腸細菌叢変化による胆汁

酸分画の変化が影響しているのではないかと申請者は仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

NAFLD における小腸細菌叢変化と胆汁酸分画の関連、リファキシミンが与える影響を評価すること。

## 3. 研究の方法

6週齢のオスの野生型 C57BL/6 マウスに高脂肪食負荷(HFD32, 日本クレア)を投与、0.5% Tween 80 を用いて 10mg/mL に調整したリファキシミンを連日 4 週間、経口ゾンデを用いて 100mg/kg/日を投与し、脂肪化の影響、リファキシミンの影響を評価した。サクリファイスしたマウスから腸管内容物を取り出し、DNA を抽出、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を次世代シーケンサーを用いて解析、細菌叢を決定した。

## 4. 研究成果

### (1) 条件検討と細菌叢変化

高脂肪食の条件検討と、細菌叢への影響を評価するため、6 週齢の C57/BL6 に対して、高脂肪食を 12 週間投与し、細菌叢を解析した (n=6)。高脂肪食投与により肝細胞の脂肪化が起きることを確認し(図 1) また高脂肪食で高脂肪食負荷マウスの空腸、回腸において、Firmicutes 門の高い割合を占める Erysipelotrichaceae が増加する傾向が見られた。Erysipelotrichaceae は Firmicutes 門に属する菌であり、既報でも高脂肪食で増加するという報告がなされていた。また、過去の自身の研究結果からは、リファキシミンが特に空腸、回腸の Firmicutes 門を減らすという結果が得られていたため、リファキシミンが空腸、回腸における Erysipelotrichaceae を減少させ、高脂肪食により生じた細菌叢変化を改善させるのではないかと仮説を立て、その後の検討に進んだ。

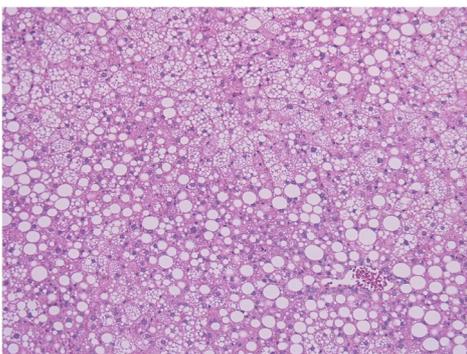


図 1. 脂肪食マウス、肝臓、HE 染色 (200 倍)



図 2. 脂肪食とリファキシミン投与

### (2) 脂肪食負荷による採血検査の変化

以上の結果を踏まえ、6 週齢の C57/BL6 に対して、通常食もしくは高脂肪食を 12 週間投与、最後の 4 週間は溶媒の Tween 80 もしくはリファキシミンを経口投与した (図 2)。通常食群 (Normal diet: N 群, n=9)、脂肪食群 (High-fat diet: H 群, n=8)、脂肪食リファキシミン群 (High-fat-Rifaximin: H-R 群, n=9) で比較したところ、N 群 vs H 群は体重増加が見られ(中央値 29.1g vs 39.6g, p=0.0005)、H-R 群ではほぼ変化がなかった(中央値 39.6g vs 37.9g, p=0.9)。ALT は中央値 24 vs 22.5 vs 24 U/mL とほぼ変化を認めなかった。血糖値は H 群で有意に増加したものの H-R 群ではほぼ不変(中央値, 115 vs 251 vs 246 mg/dL)、中性脂肪では有意差つかなか

ったがH群で増加、H-R群で低下する傾向が見られた(中央値, 36 vs 46 vs 33 mg/dL)。LDL-Cは中央値3 vs 9 vs 7 mg/dL とH群で有意に増加( $p=0.0005$ )、H-R群で低下する傾向が見られた( $p=0.39$ )。

### (3) 高脂肪食とリファキシミン投与による小腸の細菌叢変化

これらのマウスについて、空腸、回腸、便について16S rRNA 遺伝子を用いた細菌叢解析を行った。予備実験では空腸で高脂肪食により増加する傾向が見られた *Erysipelotrichaceae* だったが、本検討においては中央値 54.1% vs 50.1% vs 52.2%といずれの群においてもほぼ不変であった(図3)。以前の申請者の研究でCC14投与による肝障害で増加、リファキシミン投与により減少する結果が得られていた *Lactobacillaceae* については、中央値 2.4% vs 5.8% vs 4.8%とそもその割合が非常に少なく、N群とH群で有意に増加( $p=0.027$ )、R群で低下する傾向は見られたが有意ではなかった。Firmicutes 門全体としては、中央値 61.8% vs 77.0% vs 88.0%と高脂肪食負荷で増加する傾向が見られたものの、申請者の既報とは異なり、リファキシミン投与により減少する傾向は見られなかった。

回腸では *Erysipelotrichaceae* が中央値 42.4% vs 68.5% vs 55.8%と空腸と比べると高脂肪食で増加する傾向( $p=0.18$ )が見られた(図4)。H-R群で低下する傾向は見られたが有意差は見られなかった( $p=0.5$ )。また、Firmicutes 門でありながら高脂肪食で減少することが報告されている *Turibacteraceae* が、N群 vs H群で減少する傾向(中央値 6.2% vs 0.02%,  $p=0.09$ )が見られた。H-R群では中央値 0.0% ( $p=0.15$ )だった。

便においては脂肪食投与で *Erysipelotrichaceae*、*Turibacteraceae*、Firmicutes 門などの割合はほぼ変わらず、リファキシミンによる変動も見られなかった。

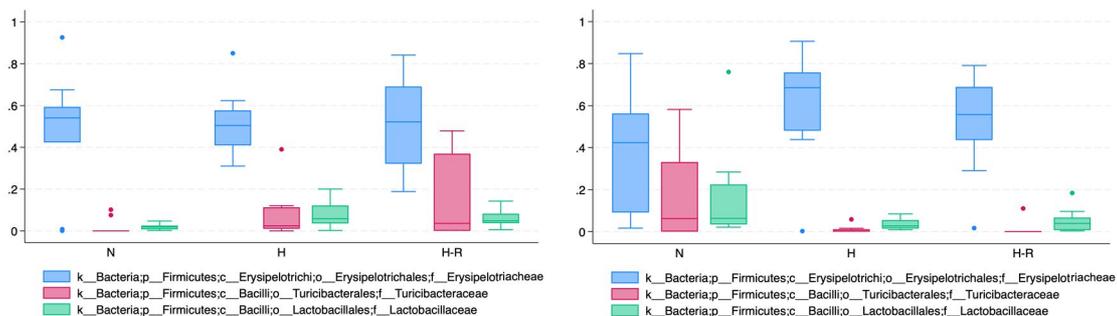


図3. 空腸における Firmicutes 門の菌の変動 図4. 回腸における Firmicutes 門の菌の変動

### (4) 小腸細菌叢と脂質・糖の相関関係

空腸における *Erysipelotrichaceae*、*Turibacteraceae* は体重や LDL-C、Glu などの採血結果と殆ど相関関係が見られなかったが、回腸において *Erysipelotrichaceae* は LDL-C と相関係数 0.51、Glu と 0.46 と正の相関が見られ、*Turibacteraceae* は LDL-C と -0.43、Glu と -0.48 と負の相関が見られた。空腸、回腸、便においてその他の全菌種について解析を行ったが、特に回腸におけるこの2菌種が強い相関が見られた。

### (5) 本研究から得られた知見と考察

本実験系において、脂肪食負荷により、肝細胞の脂肪化、Glu、LDL-C などの有意な増加が見られた。リファキシミンはこれらをほぼ不変~検査項目によっては若干改善させる傾向は見られたものの、有意な差を以って改善したものはなかった。

小腸においては、大腸や便と異なり Firmicutes 門が高い割合を占める。その中でも、脂肪食や肥満に関係するとされる Erysipelotrichaceae は空腸、回腸の高い割合を占めた。予備実験では空腸でも Erysipelotrichaceae が脂肪食で増加する傾向があるように見えたが、本実験で n を増やしたところ、空腸では変化が目立たず、回腸で変化が大きかった。また、LDL-C や Glu との正の相関も、回腸で強く見られた。同じ Firmicutes 門の中でも逆に高脂肪食で増加するとされる Turibacteraceae は回腸で減少する傾向が見られ、これも LDL-C や Glu との逆相関は回腸で強く見られた。一方で、これらの菌の割合に対して、リファキシミンは殆ど変化を与えなかった。

リファキシミンが本実験系において大きな変化を与えなかったことについてはいくつかの理由が考えられる。一つは菌種の影響である。申請者の以前の検討では CC14 により肝障害を誘導した別系統のマウス(BALB/c)を用いており、空腸や回腸では Erysipelotrichaceae がほとんど見られず、Lactobacillaceae が主体であるという、同じ Firmicutes 門ではあるものの異なる細菌叢であった。Lactobacillaceae は肝性脳症にも関与しているとされる菌種であり、リファキシミンの効果が強く出たことが推測されるが、本実験系で主体であった Erysipelotrichaceae は同じ Firmicutes 門でも効果が出にくかった可能性がある。リファキシミンは消化管内における濃度測定が難しいこと、胆汁酸の存在などの溶解性によって効果が上下すること、幅広い菌種に影響する(耐性の取られやすさが菌種により異なり、差が生まれると考えられる)などの特性から、in vitro で感受性・耐性の判断が難しく、リファキシミンの細菌叢への影響に関する研究が進みにくい一因でもあり、本研究でも事前の予想は困難であった。第二には、小腸の部位の影響も考えられる。申請者の以前の報告でも胆汁酸が豊富な十二指腸、空腸での変化が大きい一方、回腸での変化は相対的に少なかった。本実験系において、脂肪食と関連が強いとされる菌種の変化や、採血結果との相関が強かったのも回腸であり、脂肪食負荷による変化が大きい腸管の部位にリファキシミンの効果が噛み合わなかった可能性がある。

小腸細菌叢は菌種の種類が非常に少なく、変動が大きいために、便の細菌叢と比べて個体間のばらつきが大きい。そのため個体差なのか真の変化なのかが判断しづらく、また統計学的有意差も付きづらく、小腸細菌叢の研究は便の細菌叢解析に比べて、均一な条件の設定や比較的大きなサンプル数を要する。脂肪食・肥満と関連するとされる Erysipelotrichaceae、Turibacteraceae が空腸よりも回腸で変化が大きく、LDL-C、Glu と相関が強く見られたことに関しては重要な知見であり、今後は n を増やして再現性を検証するとともに、これらの菌と胆汁酸代謝の関連を評価していく予定である。リファキシミン投与については、期待された傾向がありそうであれば、今後サンプル数の増加、胆汁酸代謝の解析へ進む予定であったが、上記結果であったため脂肪肝マウスに対するリファキシミンの効果を見る研究は一度中断の方針とし、科研費の延長申請は行わなかった。リファキシミンに限らず、細菌叢を変化させる治療は、元々の細菌叢に応じて効果は大きく変わってくると考えられ、本研究のような知見を蓄積していくことが、今後のリファキシミンの臨床応用・適応拡大につながっていくと考える。

#### <引用文献>

Kazuhiko Ikeuchi, et al. Gut Pathog.2023;15(1):14

Li F, et al. Nat Commun. 2013;4:2384

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