

令和元年6月12日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19371

研究課題名(和文) 門脈血の直接採取による腸内細菌環境と肝疾患の探索

研究課題名(英文) Approach to identify microbiome in portal blood flow in human liver disease

研究代表者

重福 隆太 (Shigefuku, Ryuta)

聖マリアンナ医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20649272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：食道静脈瘤治療時に独自の方法でヒト門脈血を直接採取し、門脈血液内に迷入する腸内細菌種と肝疾患形成の関連性を検討した。門脈血と同一症例の糞便を用い、細菌16S rDNA ライブラリーを作成し次世代シーケンズ(NGS)解析を行った。糞便細菌叢のNGS結果では、代謝性肝疾患ではバクテロイデス門の割合が減少し、ファーミキューテス門とプロテオバクテリア門の割合が増加していた。門脈血のNGS解析では、食道内常在菌であるProteobacteria門が検出されるため、サンプル採取時のコンタミを否定するため無菌的カテーテル操作による門脈血液採取を行い、門脈血液中に確実に細菌DNAが検出されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで未開拓であったヒト門脈血を独自方法で採取し解析した研究であり、今後増加が危惧されるアルコール性脂肪肝や非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の病態進展の因子同定など、学術的意味は計り知れないものがある。今回得られた結果を基に、体内の閉鎖的循環系である門脈血への細菌迷入がさらに立証されると、従来の概念を覆す「腸内細菌叢の改善による肝臓病の治療」などに繋がる可能性があり、社会的な意義は大きい。一部の重症な腸疾患では糞便経口摂取による治療が実際に行われており、今後は、肝臓病における腸内環境への介入など、全身疾患として肝臓病を捉える必要性に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Gut microbiome may play an important role in the maintenance of gut-liver axis health and pathogenesis of liver disease. We invent a method of blood sample collection from portal venous flow in patients with indication for treatment of varices. During the procedure of endoscopic injection sclerotherapy (EIS), the blood of varices vein was collected from puncture needle before treatment. Fecal sample was also collected for a comparison purpose of the microbial composition. The metagenomics analysis was performed with sequencing the 16S rRNA genes. Bacterial DNA was actually detected in the blood supply from the intestine. Microbial composition detected in portal venous flow could not be reflected those in feces. We successfully obtained a blood sample via portal venous flow in patients with esophageal varices. Microbial composition detected in feces could differ from those in portal blood, and might differ in each human liver disease.

研究分野：肝臓病学

キーワード：門脈血 腸内細菌叢 食道静脈瘤 非アルコール性脂肪性肝疾患 アルコール性肝疾患 LPS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

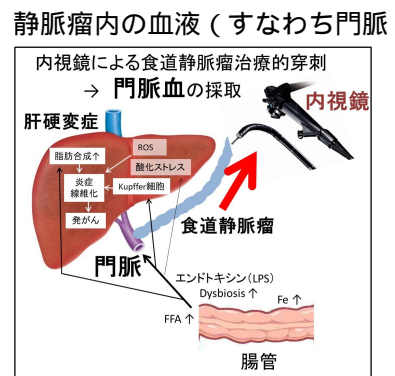
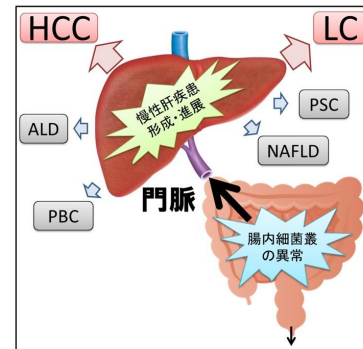
非アルコール性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease ; NAFLD) の進展機序として、“multiple parallel hits hypothesis”が提唱されており、その中で腸内細菌叢が非アルコール性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis ; NASH)発症に関与することが報告されている。門脈血中の生理活性物質および侵入する腸内細菌叢を評価することで、肝硬変における病態進展のメカニズム解明、およびヒトにおける腸内細菌による肝疾患への影響を解明する一因となると考えた。

2. 研究の目的

食道静脈瘤の治療時に門脈血をサンプリングし、肝疾患の病態形成と腸内細菌の関連性を明らかにすることを旨とした。今回の研究では、第一に門脈血液を採取し解析する体制および解析手法を確立する。第二に門脈内に侵入する腸内細菌叢のプロファイルと肝疾患の関連性を解析する。特にNASHの病態進展における門脈内に侵入する腸内細菌などの関与を探索し、腸内環境からみた新たな肝疾患治療戦略に繋げる科学的根拠を見出すことを目的とした。

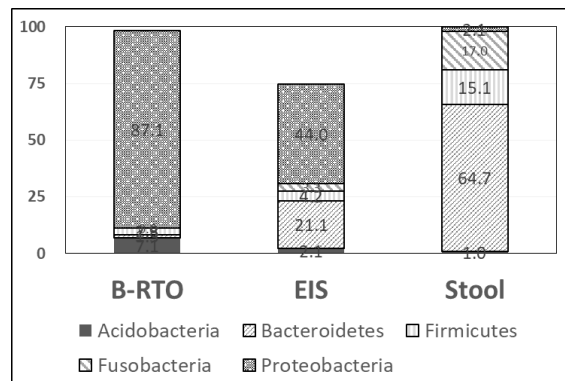
3. 研究の方法

食道胃静脈瘤治療の内視鏡的硬化療法 (EIS) を施行する際、静脈瘤内の血液 (すなわち門脈血) を採取する。同時に、末梢静脈血を採取しコントロールとし、門脈血に細菌が存在するか否かを検証した。さらに、糞便中の細菌叢をコントロールとして、門脈血に流入する腸内細菌叢プロファイルを次世代シーケンスで評価し、NASHを含む種々な肝疾患の病態形成における腸内細菌叢の関与を明らかにする。具体的には、次世代シーケンスにより門脈血中の腸内細菌叢プロファイルを明らかにする。これらの結果により、肝硬変の病態進展における腸内環境および LPS の関与、さらにウイルス性肝炎やアルコール性肝疾患などの肝硬変時の門脈血の生理活性物質の関与など、他の肝疾患との病態進展メカニズムの違いを明らかにする。



4. 研究成果

食道胃静脈瘤治療の EIS を施行した 20 例からヒト門脈血液 (主に左胃静脈を経由する腸間膜静脈からの門脈血液) を採取した。門脈血を採取した食道胃静脈瘤合併肝硬変の要因内訳は、アルコール (9 例)、NASH (3 例)、肝炎ウイルス (4 例)、PBC (3 例)、非肝硬変例 (3 例) である。現在までに、全細菌種 16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) をターゲットとした分子バーコード技術を用いた次世代シーケンサーによるランダムシーケンス解析を試験的に少数例で行った。次世代シーケンスによる門脈血内の細菌叢解析の結果では、個々の病態により門脈血内で検出される細菌の量と種類が異なる可能性が示唆されるデータを取得している。さらに、EIS 時には食道粘膜を直接穿刺するため、食道粘膜上の細菌混入が否定できないが、無菌的カテーテル操作によるバルーン閉塞下逆行性経静脈的塞栓術(B-RTO)時に採取した門脈血液であっても血液中に細菌 DNA が検出されることを確認した。したがって、**少なくとも肝疾患を有する症例では、細菌そのものが (一部は代謝産物の可能性もある) 直接肝臓に流入している**予備データを得た。



門脈血(B-RTO と EIS で採取)と糞便を用いた腸内細菌叢の解析 (アルコール性肝硬変症例からの検体 ; 同一症例の門脈血液ならびに糞便を比較)

糞便細菌叢の次世代シーケンス結果では、代謝性肝疾患では *Bacteroides* 門の割合が減少し、*Firmicutes* 門と *Proteobacteria* 門の割合が増加していた。今後、未測定サンプルについても同様の次世代シーケンスによる門脈血内の細菌叢解析を行い、門脈血内の生理活性や腸管内環境の影響などについて検討を進めているところである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. 重福隆太、渡邊綱正、服部伸洋、池田裕喜、松永光太郎、松本伸行、鈴木通博、伊東文生．アルコールおよびNASH肝硬変症例における門脈に流入する細菌叢の次世代シーケンス解析．*アルコールと医学生物学* 37 巻 29-31 (2018) 査読有．
2. 重福隆太、渡邊綱正、得平卓也、中野弘康、服部伸洋、池田裕喜、松永光太郎、松本伸行、山本博幸、奥瀬千晃、鈴木通博、國島広之、伊東文生．*Fusobacterium* による化膿性肝膿瘍 9 症例の臨床的検討—本邦報告例のreview—．*肝臓* 59 巻 1 号 23-32 (2018) 査読有．
3. Shigefuku R, Watanabe T, Otsubo T, Nakajima TE, Yasuda H. (1 番目、22人中) Esophagogastric varices were diagnosed in a non-cirrhotic liver case during long-term follow-up after oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin J Gastroenterol*. doi: 10.1007/s12328-018-0873-1. (2018) 査読有．
4. 重福隆太、渡邊綱正、服部伸洋、池田裕喜、松永光太郎、松本伸行、得平卓也、鈴木達也、近江亮介、五十嵐洋介、辻顕介、森田望、森田亮、路川陽介、中原一有、末谷敬吾、中野弘康、平石哲也、野口陽平、高橋秀明、石井俊哉、國島広之、奥瀬千晃、鈴木通博、伊東文生．過去20年間における肝膿瘍153例の臨床的検討．*肝臓* 59 巻 9 号 466-480 (2018) 査読有．
5. Shigefuku R, Watanabe T, Kanno Y, Noshio K, Yamamoto H. (1 番目、2 番目18人中) *Fusobacterium nucleatum* detected simultaneously in a pyogenic liver abscess and advanced sigmoid colon cancer. *Anaerobe*. 48:144-146 (2017) 査読有．
6. 重福隆太、高橋秀明、中野弘康、服部伸洋、池田裕喜、渡邊綱正、松永光太郎、松本伸行、奥瀬千晃、佐瀬茂、伊東文生、鈴木通博．アルコール性肝硬変における内視鏡的食道静脈瘤硬化療法前後の血行動態の変化～C型肝硬変との比較～．*日本門脈圧亢進症学会雑誌* 23 巻 22-32 (2017) 査読有．
7. Shigefuku R, Takahashi H, Nakano H, Watanabe T, Matsunaga K, Matsumoto N, Kato M, Morita R, Michikawa Y, Tamura T, Hiraishi T, Hattori N, Noguchi Y, Nakahara K, Ikeda H, Ishii T, Okuse C, Sase S, Itoh F, Suzuki M. Correlations of Hepatic Hemodynamics, Liver Function, and Fibrosis Markers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Comparison with Chronic Hepatitis Related to Hepatitis C Virus. *Int J Mol Sci*. 17: E1545, doi: 10.3390/ijms17091545. (2016) 査読有．
8. 重福隆太、高橋秀明、中野弘康、吉田良仁、末谷敬吾、田村知大、平石哲也、野口陽平、服部伸洋、中原一有、池田裕喜、渡邊綱正、松永光太郎、松本伸行、奥瀬千晃、佐瀬茂、伊東文生、鈴木通博．非アルコール性脂肪性肝疾患におけるXenon CTの診断能の検証．*アルコールと医学生物学* 34 巻 58-65 (2016) 査読有．

[学会発表](計 10 件)

1. 重福隆太、渡邊綱正、服部伸洋、池田裕喜、松永光太郎、松本伸行、鈴木通博、伊東文生．アルコールおよび NASH 肝硬変症例における門脈に流入する細菌叢の次世代シーケンス解析．第 37 回 アルコール医学生物学研究会 (JASBRA) 学術集会, (2018)
2. 重福隆太、高橋秀明、中野弘康、服部伸洋、池田裕喜、渡邊綱正、松永光太郎、松本伸行、奥瀬千晃、佐瀬茂、伊東文生、鈴木通博．アルコール性肝硬変における内視鏡的食道静脈瘤硬化療法前後の血行動態の変化～C型肝硬変との比較～．第 36 回 アルコール医学生物学研究会 (JASBRA) 学術集会, (2017)
3. 高橋秀明、重福隆太、中野弘康、服部伸洋、池田裕喜、渡邊綱正、松永光太郎、松本伸行、奥瀬千晃、佐瀬茂、伊東文生、鈴木通博．脂肪性肝疾患と肝機能、肝血流-C型慢性肝疾患との比較も含めて．第 36 回アルコール医学生物学研究会学術集会, (2017)
4. 重福隆太、高橋秀明、中野弘康、田村知大、平石哲也、野口陽平、公文大輔、服部伸洋、池田裕喜、渡邊綱正、松永光太郎、松本伸行、奥瀬千晃、佐瀬茂、伊東文生、鈴木通博．アルコール性肝硬変における内視鏡的食道静脈瘤硬化療法前後の血行動態の変化-C型肝硬変との比較．第 36 回アルコール医学生物学研究会学術集会, (2017)
5. 重福隆太、渡邊綱正、中野弘康、服部伸洋、池田裕喜、松永光太郎、松本伸行、奥瀬千晃、鈴木通博、伊東文生．オキサリプラチンによる食道胃静脈瘤形成予測には血小板数と脾臓径の推移が有用である．第 53 回日本肝臓学会総会, (2017)
6. Hattori Nobuhiro, Shigefuku Ryuta, Watanabe Tsunamasa, Matsumoto Nobuyuki, Nakano Hiroyasu, Ikeda Hiroki, Matsunaga Kotaro, Okuse Chiaki, Suzuki Michihiro, Itoh Fumio. The characterization of esophagogastric varices associated with oxaliplatin administration. The annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL) The International Liver Congress 2017, (2017)
7. 菅野優樹、重福隆太、渡邊綱正、中野弘康、池田裕喜、白勢大門、服部伸洋、松永光太郎、松本伸行、奥瀬千晃、鈴木通博、伊東文生．S 状結腸癌が細菌の侵入経路と考えられた *Fusobacterium nucleatum* による化膿性肝膿瘍の 1 例 第 339 回 日本消化器病学会 関東支部例会 (2016)
8. 重福隆太、中野弘康、路川陽介、服部伸洋、池田裕喜、高橋秀明、渡邊綱正、松永光太郎、松本伸行、奥瀬千晃、鈴木通博、伊東文生．*Fusobacterium* による化膿性肝膿瘍の 5 症例の臨床的特徴．第 102 回 日本消化器病学会 総会 (2016)
9. 重福隆太、高橋秀明、中野弘康、服部伸洋、池田裕喜、渡邊綱正、松永光太郎、松本伸行、奥瀬千晃、佐瀬茂、伊東文生、鈴木通博．Xenon CT を用いた内視鏡的静脈瘤硬化療法前後の肝血流量評価．第 23 回 日本門脈圧亢進症学会 総会 (2016)
10. Shigefuku Ryuta, Takahashi Hideaki, Nakano Hiroyasu, Hattori Nobuhiro, Ikeda Hiroki, Matsunaga Kotaro, Watanabe Tsunamasa, Matsumoto Nobuyuki, Okuse

Chiaki, Sase Shigeru, Itoh Fumio, Suzuki Michihiro. Hepatic hemodynamics and liver function before and after endoscopic injection sclerotherapy. The 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. (2016)

〔図書〕(計 0 件)

〔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)研究協力者

研究協力者氏名: 渡邊 綱正

ローマ字氏名: (Watanabe, Tsunamasa)

所属研究機関名: 聖マリアンナ医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 20338528

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、研究者個人に帰属されます。