

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07991

研究課題名（和文）腸内細菌由来物質によるNASH肝線維化・肝発癌抑制効果の解析

研究課題名（英文）Analysis of hepatic fibrosis and carcinogenesis in NASH by substances derived from microbiota

研究代表者

澤田 康司 (SAWADA, Koji)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：80548660

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では高脂肪食負荷マウス（HFD群）と高脂肪食+Lactobacillus brevis SBC8803（SBC）負荷マウス（SBC群）を用いて、SBCの非アルコール性脂肪肝改善効果、肝線維化改善効果と、そのメカニズム解析を行うことで、SBCの治療応用の可能性を探索した。HFD群に比較しSBC群ではNASH病態の改善がみられ、RNA sequencingの結果から選択的インスリン抵抗性の改善がそのメカニズムと考えられた。またHFD群とSBC群では腸内細菌叢に変化は認めず、腸内細菌叢の変化を介さないメカニズムが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満患者の増加に伴い非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の患者は世界的に増加している。NAFLDは肝硬変や肝臓へと進展する可能性のある疾患であるが、その治療は食事療法と運動療法であり、確立した薬物療法は糖尿病や脂質異常症など合併症に対するものが中心である。本研究ではLactobacillus brevis SBC8803が腸内細菌叢を変化させることなくNAFLD病態を改善させることが明らかとなり、薬物療法が少ないNAFLDにおける新たな治療薬となり得ることが示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated whether Lactobacillus brevis SBC8803 (SBC) improves fatty liver and hepatic fibrosis in NAFLD model mice fed with a high fat diet (HFD). Body weight, blood examinations, and fatty liver improved in SBC mice compared with HFD mice. Findings of RNA sequencing indicated improvement of selective insulin resistance. In addition, there was no difference in gut microbiota in SBC and HFD mice, suggesting a mechanism not mediated by the alteration of gut microbiota.

研究分野：脂肪肝

キーワード：NAFLD 腸内細菌 インスリン抵抗性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満患者、メタボリック症候群の増加により非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 患者は爆発的に増加している。NASH の予後は肝線維化/肝癌合併により規定されているが、有効な肝線維化抑制や肝発癌抑制薬は無く、NASH 肝硬変・肝癌患者も増加の一途である。本邦における NAFLD 患者は 1000 万人以上、NAFLD 患者の 10~20% が NASH と推定され、NASH 肝硬変からは 5 年で約 11% の肝発癌が認められ今後の肝癌診療において肝炎ウイルス関連肝癌より、NASH 肝癌が重要な問題となる。

NASH の病態進展には multiple parallel hits が提唱されており、その中で腸内細菌叢は重要な役割を果たしている (*Tilg H, Hepatology 2010*)。肝発癌には慢性的な炎症刺激と、引き続き起こる肝線維化によって発癌リスクが高まることが知られているが、腸内細菌が肝発癌に関与することも報告されている。さらに複数の抗生剤や probiotic mixture によって肝発癌が抑制される報告がみられるが、菌由来の生理活性物質による肝線維化・肝発癌抑制に関する研究は見られず、腸内に存在する菌が門脈を隔てて存在する肝組織に対して、どのように抗線維化・抗腫瘍作用を発揮するかについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

NASH 肝線維化・肝発癌に有効な治療薬が無い中、Heat-killed *Lactobacillus brevis* SBL8803 (*L. brevis* 8803) による腸内細菌叢への治療介入による NASH 病態の改善効果及び肝線維化抑制効果の有無を検討する。

(1) *L. brevis* 8803 投与による脂肪肝、血液生化学所見の改善効果とそのメカニズムを検討する。

(2) *L. brevis* 8803 投与による肝線維化抑制効果とメカニズムを検討する。

3. 研究の方法

(1) NASH モデルマウスの作成

高脂肪食負荷マウス：C57BL/6 (8 週齢、雄性) に 82% 高脂肪食 (HFD) を 16 週間投与 (HFD 群)。

L. brevis 8803 マウス：C57BL/6 (8 週齢、雄性) に HFD + 1% *L. brevis* 8803 を 16 週間投与 (SBC 群)。

(2) 脂肪肝・肝線維化改善の解析

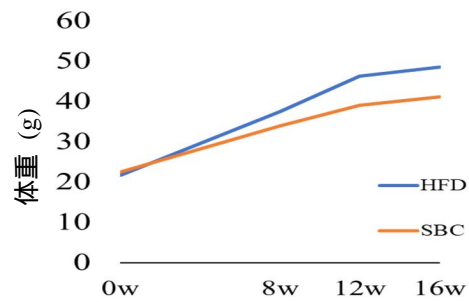
体重測定後に血液、肝臓を採取し、血液生化学所見、肝組織における脂肪肝の程度・肝線維化の程度を解析する。

(3) 脂肪肝・肝線維化改善メカニズムの解析

メカニズム解析のため肝組織における RNA sequencing と糞便からの腸内細菌叢解析を行う。また培養細胞を用いた *in vitro* の検討を行う。

4. 研究成果

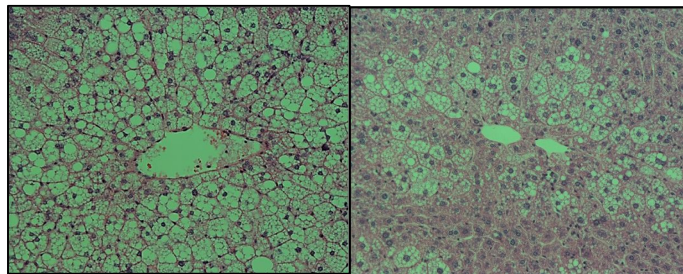
(1) マウス体重の推移



(図：モデルマウスの体重変化)

HFD 群に比較し、SBC 群では有意に体重増加が抑制されていた ($p < 0.01$)。

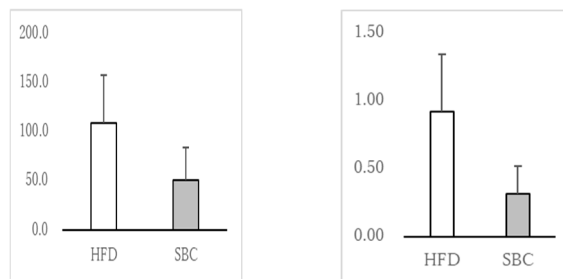
(2) 肝組織における脂肪肝改善の評価



(図：肝組織 HE 染色、左：HFD 群、右 SBC 群)

HFD 群では中心静脈周囲を中心に大滴性の脂肪沈着を認め HFD 群に比較し、SBC 群では肝内の脂肪滴は減少していた。

(3) 血液生化学所見 (ALT、インスリン)



(図左：ALT (IU/L)、図右：インスリン (ng/mL))

HFD 群に比較し、SBC 群では ALT、インスリン濃度は有意に低下していた (ALT : $p = 0.02$ 、インスリン : $p < 0.01$)。

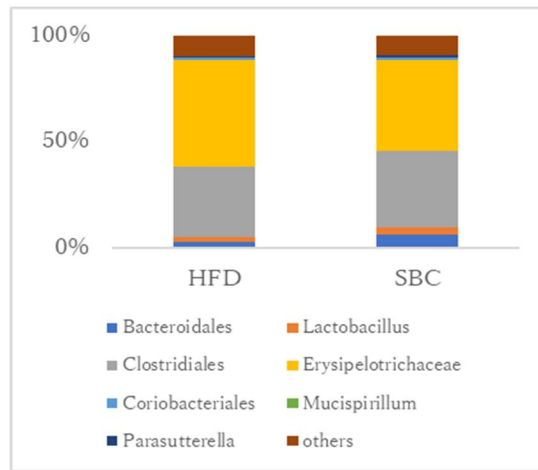
(4) 肝線維化

HFD 群、SBC 群において Azan 染色で明らかな肝線維化は見られなかった。Real time PCR 法での MMP2、Acta2、TGF などの線維化関連遺伝子の発現にも両群では有意な変化は認めなかった。

(5) RNA sequencing

HFD 群と SBC 群の比較で 38114 遺伝子中、459 遺伝子に発現変化を認めた。

(6) 腸内細菌叢の解析 (T-RFLP 法)



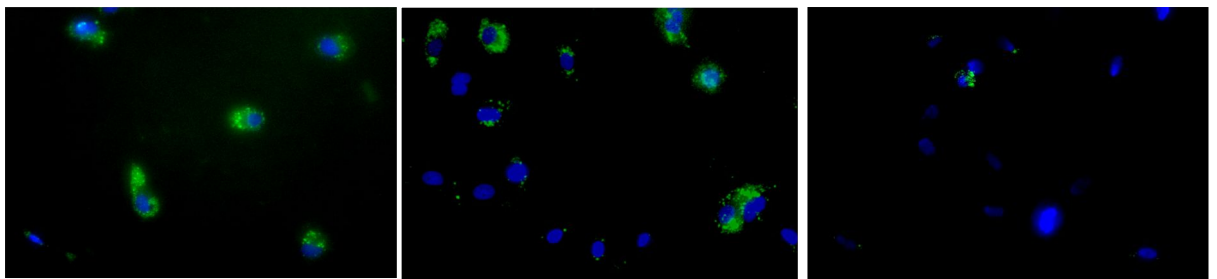
(図：HFD 群と SBC 群の腸内細菌叢の変化)

両群において腸内細菌叢に有意な差は認めなかった。

(7) 肝組織における real-time PCR

RNA sequencing の結果から、インスリンシグナル pathway が変化していることが明らかとなった。

(8) 肝細胞、腸管細胞を用いた in vitro の検討



(図左：肝細胞 + 脂肪酸、図中央：肝細胞 + 腸管細胞 + 脂肪酸、図右：肝細胞 + 腸管細胞 + L. brevis 8803 + 脂肪酸、青：核、緑：脂肪)

肝細胞 + 腸管細胞 + L. brevis 8803 の群において肝細胞内の脂肪滴が有意に減少していた。

(9) 以上から、L. brevis 8803 は腸内細菌叢を変化させることなく、インスリンシグナルを変化させることで NAFLD 病態を改善させることが示された。肝線維化に関しては他の NASH モデルでの検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Takatsuki M, Natsuda K, Hidaka M, Sawada K, Shindo M, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 The characteristics of hepatocellular carcinoma in hemophilic patients with HIV/HCV coinfection due to contaminated blood products in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gastrointest Oncol	6. 最初と最後の頁 2952-2959
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/jgo-21-157.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sawada K, Fujiya M, Nakajima S, et al.	4. 巻 51
2. 論文標題 Endoscopic findings of hepatocellular carcinoma invading the duodenum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Jpn J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1689-1690
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyab125.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasebe T, Nakajima S, Sawada K, Okumura T.	4. 巻 53
2. 論文標題 Brain metastasis from hepatic cholangiolocellular carcinoma in a young female without chronic liver disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dig Liver Dis	6. 最初と最後の頁 30393-30395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dld.2020.08.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sumida Y, Yoneda M, Toyoda H, Yasuda S, Tada T, Hayashi H, Nishigaki Y, Suzuki Y, Naiki T, Morishita A, Tobita H, Sato S, Kawabe N, Fukunishi S, Ikegami T, Kessoku T, Ogawa Y, Honda Y, Nakahara T, Munekeg K, Ochi T, Sawada K, Takahashi A, et al.	4. 巻 21
2. 論文標題 Common Drug Pipelines for the Treatment of Diabetic Nephropathy and Hepatopathy: Can We Kill Two Birds with One Stone?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21144939.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sawada K, Hayashi H, Nakajima S, et al.	4. 巻 35
2. 論文標題 Non-alcoholic fatty liver disease is a potential risk factor for liver injury during immune checkpoint inhibitor treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol	6. 最初と最後の頁 1042-1048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14889.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Honda S, Saitho Y, Sawada K, et al.	4. 巻 59
2. 論文標題 Repeated perforation of the gallbladder in a patient with hepatocellular carcinoma receiving lenvatinib	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 657-662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3806-19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hasebe T, Sawada K, Hayashi H, et al.	4. 巻 25
2. 論文標題 Long-term growth of intrahepatic papillary neoplasms: A case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 5569-5577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v25.i36.5569.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto M, Ikuta K, Sawada K, et al.	4. 巻 51
2. 論文標題 Hepatitis B virus (HBV) reactivation in an acute lymphoblastic leukemia patient despite being vaccinated against HBV in infancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dig Liver Dis	6. 最初と最後の頁 1487-1488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dld.2019.07.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawada K, Saitho Y, Hayashi H, et al.	4. 巻 3
2. 論文標題 Skeletal muscle mass is associated with toxicity, treatment tolerability, and additional or subsequent therapies in patients with hepatocellular carcinoma receiving sorafenib treatment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 329-337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12167.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sawada K, Shonaka T, Nishikawa Y, et al.	4. 巻 58
2. 論文標題 Successful Treatment of Nivolumab-related Cholangitis with Prednisolone: A Case Report and Review of the Literature	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 1747-1752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.2330-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi T, Tokushige K, Hyogo H, Aikata H, Nakajima T, Ono M, Kawanaka M, Sawada K, et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 A Data Mining-based Prognostic Algorithm for NAFLD-related Hepatoma Patients: A Nationwide Study by the Japan Study Group of NAFLD.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-28650-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 澤田康司、室和希、大竹晋、林秀美、太田雄、長谷部拓夢、中嶋駿介、岡田充巧、麻生和信、藤谷幹浩、奥村利勝
2. 発表標題 高トリグリセライド血症合併NAFLD症例に対するベマフィブラートの長期治療効果
3. 学会等名 第44会肝臓学会西部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤田康司、林秀美、長谷部拓夢、中嶋駿介、藤谷幹浩、奥村利勝
2. 発表標題 肝細胞癌における初回TACE後の予後と骨格筋低下に関する検討
3. 学会等名 JDDW2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤田康司、林秀美、奥村利勝
2. 発表標題 肝癌症例に対するL-カルニチン長期投与による骨格筋への影響
3. 学会等名 第57回肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林秀美、澤田康司、藤谷幹浩
2. 発表標題 Lactobacillus brevis SBC8803のNAFLD改善効果の解析
3. 学会等名 第107回消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤田康司、田中宏樹、林秀美、長谷部拓夢、中嶋駿介、藤谷幹浩、奥村利勝
2. 発表標題 Lactobacillus brevis SBC8803はNAFLDにおける選択的インスリン抵抗性を部分的に改善させる
3. 学会等名 JDDW2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koji Sawada, Hiroki Tanaka, Hidemi Hayashi, Takumu Hasebe, Shunsuke Nakajima, Mikihiro Fujiya, Toshikatsu Okumura.
2. 発表標題 The effects and underlying mechanisms of Lactobacillus brevis SBC8803 monotherapy on a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease
3. 学会等名 AASLD 2020, The Liver Meeting Digital Experience (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤田康司、林秀美、長谷部拓夢、中嶋駿介、藤谷幹浩、奥村利勝
2. 発表標題 肝細胞癌におけるサルコペニア肥満とTACEの予後に関する検討
3. 学会等名 第43回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤田康司、林秀美、長谷部拓夢、中嶋駿介、藤谷幹浩、奥村利勝
2. 発表標題 肝細胞癌に対する初回治療TACEにおけるサルコペニア肥満合併の意義
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤田康司、中嶋駿介、奥村利勝
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬による薬物性肝障害～DILIスコアによるステロイド治療の検討～
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田康司、林秀美、長谷部拓夢、中嶋駿介、藤谷幹浩、奥村利勝
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬による肝障害のリスク因子の検討
3. 学会等名 第55回肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田康司、田中宏樹、林秀美、長谷部拓夢、中嶋駿介、生田克哉、藤谷幹浩、奥村利勝
2. 発表標題 NAFLDにおけるLactobacillus brevis SBL8803の有用性に関する検討
3. 学会等名 第42回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤田康司、中嶋駿介、奥村利勝
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤投与症例における薬物性肝障害の検討
3. 学会等名 JDDW2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤田康司、長谷部拓夢、奥村利勝
2. 発表標題 肝硬変症例におけるレボカルニチン 長期投与の検討 ~ アンモニアと骨格筋量・脂肪量の解析 ~
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤田康司、斎藤義徳、林秀美、長谷部拓夢、中嶋駿介、藤谷幹浩、奥村利勝
2. 発表標題 Sorafenib内服肝細胞癌症例のsarcopeniaに関する検討
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究者詳細 http://hyouka04.asahikawa-med.ac.jp/html/100000453_ja.html</p>

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
研究分担者	長谷部 拓夢 (HASEBE Takumu) (10596282)	旭川医科大学・大学病院・医員 (10107)	
研究分担者	田中 宏樹 (TANAKA Hiroki) (70596155)	旭川医科大学・医学部・助教 (10107)	

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