

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15029

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎NASHの病態解明～腸粘膜バリア機能からのアプローチ～

研究課題名(英文)Can NASH be induced by leaky gut syndrome?

研究代表者

臼田 春樹(Ususa, Haruki)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：30707667

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本検討では食餌誘発性のマウス非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルを用いて、腸粘膜バリアがNASHの病態形成にどのようにかわるかを検討した。NASHの病態形成の早期の段階で腸粘膜バリア機能は低下し、その状態はNASHが生じるまで継続した。また、腸粘膜バリアの低下と血中の肝障害マーカーとの間には強い相関関係が認められた。また、給餌3ヵ月後には肝障害が進行し、その状態には腸粘膜バリアの低下との因果関係が認められた。さらに、NASHと腸粘膜バリアの両方に腸内細菌叢との密接な関連が認められた。これらの検討結果はNASHの病態形成には腸粘膜バリアが大きく関与することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は昨今関心の高い腸の健康状態が、生活習慣によって誘発される疾患のひとつであるNASHの発症や悪化に影響することを示したものである。この成果をもとに腸粘膜バリアの慢性的な低下であるleaky gut syndromeと全身疾患との関連についてさらなる研究を進める意義が増し、将来的には腸の健康状態の回復や維持を行うことで全身疾患を治療・予防するという方法につながっていくという展望がありうると考えられる。

研究成果の概要(英文):Our present study showed that dysfunction of intestinal barrier could induce non-alcoholic steatohepatitis (NASH) using food-inducing NASH mice model. We first examined relationship between epithelial para-cellular permeability in intestine and hepatic injury which provoked by feeding NASH-inducing diet for a month, showing that these two factor positively and strongly correlated with each other. Besides, further elevation of plasma level of hepatic injury marker and fibrosis of liver tissue was observed in mice, fed NASH-inducing diet for 3 month feeding, that directly induced by increasing intestinal permeability and dysbiosis. These results suggest that dysfunction of intestinal barrier can largely contribute to pathogenesis of NASH.

研究分野：腸粘膜バリア

キーワード：腸粘膜バリア 非アルコール性脂肪肝炎 leaky gut syndrome 腸内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸粘膜から吸収される分子の大きさは通常 200-500 Da 程度であり、分子がそれよりも大きくなるにつれて腸粘膜を通過しにくくなる。この分子ふるいは外来異物に対するバリアとして機能しており、病原性微生物由来のリポポリサッカライド (LPS)あるいは食物抗原などの有害物質の吸収を防いでいる。したがって、腸粘膜のバリア機能が破綻すると、通常腸粘膜を透過しない大きさの有害物質が吸収されて全身循環にのり、腸管局所のみならず全身的な障害をもたらす可能性がある。実際に種々の全身疾患で慢性的な腸管の透過性亢進が起こることが報告されており、その状態は leaky gut syndrome (LGS)と呼ばれ、すでに欧米では種々の疾患を起こしうるリスクが高い疾患予備状態として認知されつつある。

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) はアルコール摂取以外の原因によって生じる肝障害である。欧米型の食生活が発症に強く関与し、C型肝硬変、肝癌、心血管病変などに発展することが問題となっている。正確な発症メカニズムは不明であるが、NASH患者では血中のリポポリサッカライド (LPS)が増加することから、LGSによってLPSが腸粘膜から門脈に移行して肝臓にダメージを与えることが発症要因の一つとして考えられている。しかし、NASHの病態が形成される過程の中で「いつ」「どの程度」腸粘膜バリア機能が低下するのかが不明であり、腸管から漏出したLPSが直接的にNASHの発症を引き起こす、ということは未だ仮説の域を出ていない。こうした背景から、本研究では腸粘膜バリア機能の低下とNASHの病態形成との間をつなぐ真のメカニズムは何か？という学問的問いを解決することを主眼に検討を行った。腸粘膜バリアの機能低下とNASHの発症・増悪との因果関係が明らかになれば、将来的にNASHの予知予測や治療法に結びつくデータが得られると思われる。

2. 研究の目的

本研究では、腸粘膜バリア機能の低下がどのようにNASHの発症・増悪を引き起こすのかを解明することを目的とした。また、その結果からNASHの診断や治療につながる因子を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

・課題1：NASHの病態形成における腸粘膜バリアの変化の評価

NASH誘発食(フルクトース、コレステロール、トランス脂肪酸を高度に含む餌)をC57BL/6マウスに与え、NASHが形成されていく過程で、大腸および小腸の腸粘膜バリア機能を経時的に評価した。これまで、腸粘膜バリアの評価試薬は乏しく、LPSなどの大きなサイズの分子の透過性を適切に評価できる方法がなかった。そこで、我々はそれを可能にする試薬(特許出願中につき試薬Cと呼称)を独自に開発した。試薬Cは生体内で代謝されず、腸内細菌でも分解されない。そして、小腸・大腸の両方で腸粘膜バリア機能を評価しうることを我々は確認している。本検討では将来的にヒトに試薬Cを適用することを考慮し、腸粘膜バリア機能は試薬Cを用いて評価した。この試薬は分子量1000程度のオリゴマー状で、経口投与すると通常は大きいために吸収されないが、腸粘膜バリアが低下していると吸収され、代謝されずに全身循環に血中に移行する。この試薬はマウスへの経口投与1-2時間では小腸内、4時間後では大腸に至ることを確認しているため、試薬Cの経口投与2時間後および4時間後に血中試薬C濃度を測定して、小腸と大腸の腸粘膜バリアの低下をそれぞれ評価した。

・課題2：NASH誘発食中の腸粘膜バリア低下を誘発する責任因子の検討

NASH誘発に関わるとされるフルクトース、コレステロール、トランス脂肪酸のうち、トランス脂肪酸を欠損した食事と添加した食事を与え、試薬Cを用いて腸粘膜バリア機能を経時的に評価した。

・課題3：肝障害と腸粘膜バリアとの関連性の検討

NASH誘発食を与えた後、腸粘膜バリアの評価と同時に血中のALT、AST量の定量を行い、バリア機能との相関を評価した。また、腸内細菌叢、肝臓の繊維化との相関性についても併せて検討を行った。腸内細菌叢の検討はillumina社のMiseqを用いて16S RNAゲノムのV3-V4領域の約500bpを網羅的にシーケンスし、illuminaのクラウド解析システム16S Metagenomicを用いてGreenGeneデータベースを基に細菌の推定を行った。線維化はsirius red染色で評価した。

・課題4：腸粘膜バリア破綻がNASHの病態形成に関与するメカニズムの検討

課題3で関連性のあったある因子をNASH誘発食の給餌と同時に毎日投与し、腸粘膜バリア機能と肝障害の程度を評価した。その際、腸粘膜バリアをデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)で低下させ、その因子の効果がキャンセルされるかどうかを検討した。

4. 研究成果

・課題1：NASHの病態形成における腸粘膜バリアの変化の評価

腸粘膜バリア機能の低下はNASH誘発食を与えた1ヵ月後には小腸および大腸で既に認められた。LGS状態は給餌開始7ヵ月まで継続的に認められた。(Fig. 1)

・課題2：NASH誘発食中の腸粘膜バリア低下を誘発する責任因子の検討

トランス脂肪酸を欠損した餌とトランス脂肪酸を含む餌を給餌し、1, 2, 3ヵ月のタイミングでそれぞれ試薬Cを用いて腸粘膜バリア機能を評価した。初年度の検討では欠損食投与群においてLGS状態が認められなくなるという現象が観察され、トランス脂肪酸がNASH誘発食によって生じるLGSの責任因子である可能性が示唆されたが、次年度に同様の検討を行って再現性を確かめたところ、1-3ヵ月を通じて欠損食給餌群、非欠損食給餌群いずれにおいてもLGS状態は観察されず、どの成分がLGS状態を引き起こすかを明らかにすることはできなかった。これらの餌はこの検討用に新たに作成したものであり、課題1で作成した餌とは異なる。課題2で使用した非欠損食と課題1で用いた餌はフルクトース、コレステロール、トランス脂肪酸の含有量はほぼ同じであるため、LGS状態の誘発にはこれらの因子以外の成分が寄与している可能性が示唆された。

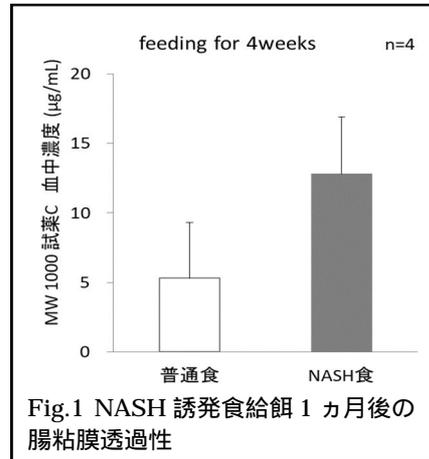


Fig.1 NASH誘発食給餌1ヵ月後の腸粘膜透過性

・課題3：肝障害と腸粘膜バリアとの関連性の検討

腸粘膜バリアの低下が観察され始めた給餌(課題1の餌)1ヵ月後では血中のALT、ASTはすでに増加していた(Fig. 2)。病理組織像では脂肪滴の蓄積がやや認められるものの、線維化は認められず、軽度の脂肪肝の状態であった。この時、試薬Cの血中濃度とALT、AST値との相関を検討したところ、両者に正の相関が認められた(Fig.2, ALT: $r^2=0.86$ 、AST: $r^2=0.845$)。肝臓線維化は給餌3ヵ月後に認められ始めた。この時の糞便中細菌の網羅的解析(腸内細菌叢の解析)を行ったところ、細菌叢に占める、ある細菌の割合が顕著に減少していた。

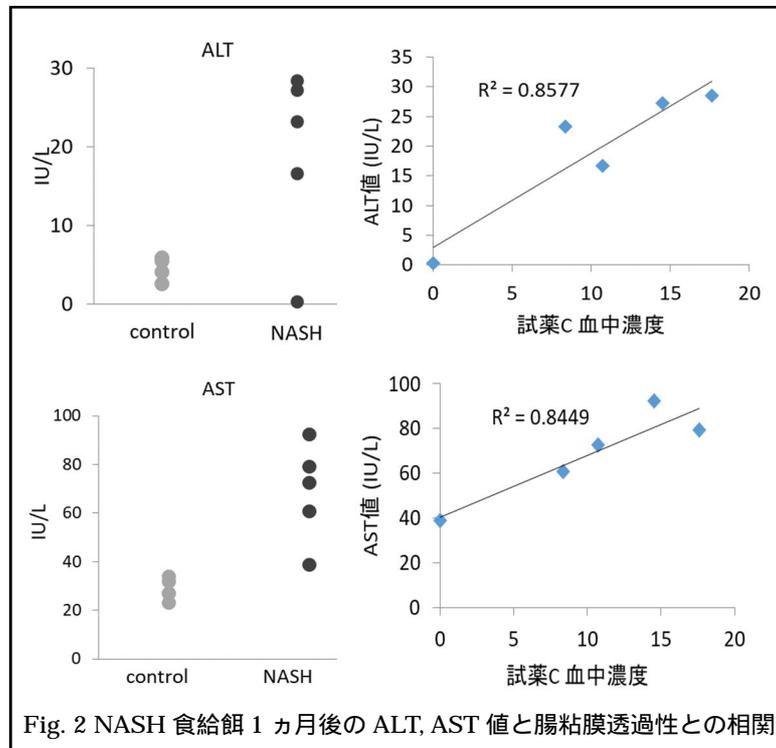


Fig. 2 NASH食給餌1ヵ月後のALT, AST値と腸粘膜透過性との相関

・課題4：腸粘膜バリア破綻がNASHの病態形成に関するメカニズムの検討

課題3で関連性のあった細菌を経口投与するとNASH誘発食の給餌後3ヵ月後の腸粘膜バリア機能は細菌を投与しない場合に比べて回復し、血中ALT、AST、LPSレベルの低下および肝組織の線維化面積の減少も認められた。また、腸粘膜バリアをDSSで低下させると、細菌を投与しても血中のALT、ASTおよびLPSレベルは抑制されなかった。

本研究の結果から、食事によって誘発されるNASHにはLGS状態が関与することが示唆され、そのメカニズムには腸内環境の変化が影響する可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kessoku T, Imajo K, Kobayashi T, Ozaki A, Iwaki M, Honda Y, Kato T, Ogawa Y, Tomeno W, Kato S, Higurashi T, Yoneda M, Kirikoshi H, Kubota K, Taguri M, Yamanaka T, Usuda H, Wada K, Saito S, Nakajima A	4. 巻 in press
2. 論文標題 Efficacy of lubiprostone in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lancet Gastroenterology & Hepatology	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) なし	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 Kamata Y, Kessoku T, Shimizu T, Kobayashi T, Kurihashi T, Sato S, Kuraji S, Aoyama N, Iwasaki T, Takashiba S, Hamada N, Kodama T, Tamura T, Ino S, Higurashi T, Taguri M, Yamanaka T, Yoneda M, Usuda H, Wada K, Nakajima A, Minabe M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Efficacy and safety of PERIODontal treatment versus usual care for Nonalcoholic liver disease: protocol of the PERION multicenter, two-arm, open-label, randomized tria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trials	6. 最初と最後の頁 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13063-020-4201-y.	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 Murata Y, Yamashiro T, Kessoku T, Jahan I, Usuda H, Tanaka T, Okamoto T, Nakajima A, Wada K	4. 巻 2019
2. 論文標題 Up-Regulated MicroRNA-27b Promotes Adipocyte Differentiation via Induction of Acyl-CoA Thioesterase 2 Expression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed research international.	6. 最初と最後の頁 2916243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/2916243.	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 Kessoku T, Imajo K, Kobayashi T, Honda Y, Kato T, Ogawa Y, Tomeno W, Kato S, Higurashi T, Yoneda M, Kirikoshi H, Kubota K, Taguri M, Yamanaka T, Usuda H, Wada K, Saito S, Nakajima A.	4. 巻 69
2. 論文標題 Efficacy, safety, and tolerability of lubiprostone for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adult patients with constipation: The LUBIPRONE, double-blind, randomised, placebo-controlled study design.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Contemporary clinical trials.	6. 最初と最後の頁 40-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cct.2018.04.002.	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Jahan, I., Okamoto, T., Usuda, H., Tanaka, T. and Wada, K.
2. 発表標題 Functional role of nonalcoholic fatty liver disease associated microRNAs in adipocyte differentiation.
3. 学会等名 第3回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白田春樹、新林友美、Kaji Hossain Helal、Israt Jahan、田中徹也、岡本貴行、三島 義之、石原俊治、和田孝一郎
2. 発表標題 Leakygut syndrome の病態解明を目的とした腸粘膜の低下を呈する動物 モデルの作製と新規診断法の確立
3. 学会等名 第3回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 結束貴臣、小林貴、本多靖、小川祐二、今城健人、米田正人、斉藤聡、白田春樹、和田孝一郎、中島淳
2. 発表標題 NAFLDと腸内細菌
3. 学会等名 第3回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Usuda H., Niibayashi T., Tanaka T., Okamoto T. and Wada K.
2. 発表標題 Novel method for evaluating leaky gut syndrome induced by NSAIDs/PPI and ischemia with health food-derived reagents.
3. 学会等名 World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 臼田春樹、新林友美、Kaji Hossain Helal、Israt Jahan、田中徹也、岡本貴行、三島 義之、石原俊治、和田孝一郎
2. 発表標題 Leakygut syndrome の病態解明を目的とした腸粘膜の低下を呈する動物 モデルの作製と新規診断法の確立
3. 学会等名 第3回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 臼田 春樹、和田 孝一郎
2. 発表標題 動物モデルを用いたリーキーガット新規診断試薬の確立
3. 学会等名 第49回日本消化吸収学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 臼田春樹、新林友美、Kaji Hossain Helal、Israt Jahan、田中徹也、岡本貴行、和田孝一郎
2. 発表標題 腸粘膜バリアの機能低下を評価する新規試薬の開発
3. 学会等名 第3回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kessoku T, Kobayashi T, Iwaki M, Ozaki A, Imajo K, Honda Y, Higurashi T, Ogawa Y, Yoneda M, Usuda H, Wada K, Oikawa Y, Tanaka Y, Nakajima S, Saito S, Nakajima A
2. 発表標題 Effect of cholestyramine on mice model of nonalcoholic steatohepatitis with increased gut permeability.
3. 学会等名 Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼田春樹、新林友美、Kazi Helal Hossain、Israt Jahan、田中 徹也 岡本 貴行、和田 孝一郎
2. 発表標題 腸粘膜バリア機能の破綻を診断しうる新規診断薬の確立
3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kessoku T, Imajo K, Ogawa Y, Kobayashi T, Honda Y, Kato T, Tomeno W, Kato S, Higurashi T, Yoneda M, Kirikoshi H, Kubota K, Taguri M, Yamanaka T, Usuda H, Wada K, Saito S, Nakajima A
2. 発表標題 Efficacy, safety, and tolerability of lubiprostone for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: The lubiprostone, doubleblind, randomized, placebo-controlled, phase II study
3. 学会等名 International liver congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kessoku T, Kobayashi T, Imajo K, Honda Y, Ogawa Y, Higurashi T, Kato S, Yoneda M, Oikawa Y, Tanaka Y, Nakajima S, Usuda H, Wada K, Saito S, Nakajima A
2. 発表標題 Increased levels of bile acid in feces plays an important role in pathophysiology of non-alcoholic steatohepatitis
3. 学会等名 International liver congress
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>第3回黒潮カンファレンス https://www.med.shimane-u.ac.jp/gakkai/kuroshio3rd/ 島根大学医学部薬理学講座 https://www.med.shimane-u.ac.jp/pharmacology/index.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
--	---------------------------	-----------------------	----