

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07938

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎への進展に関わる腸管粘膜表層細菌の解析

研究課題名(英文) Analysis of intestinal mucosa-associated microbiota involved in progression to non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

酒井 新 (Sakai, Arata)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：50792636

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)：非アルコール性脂肪性肝/肝炎(NAFLD/NASH)はアルコールが原因ではない脂肪肝を背景とする肝障害である。消化管の細菌叢が病態に関わっていると考えられているが、その病態は不明である。本研究の目的は患者の便のみならず、腸管粘膜上皮表面の細菌叢に疾患特有性や病勢との関連を解析しその全体像を明らかにすることである。本研究では、NAFLDと健常者の便、消化管粘膜表層の粘液、唾液から細菌DNAを抽出し次世代シーケンサーで解析し、NAFLD患者で既報通りの糞便での細菌叢の変化のみならず、粘膜表層細菌腸内細菌側の特徴を明らかとした。本研究で、NASH・NAFLDの病態解明の基礎的知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、非アルコール性脂肪性肝/肝炎(NAFLD/NASH)を背景とした肝硬変や肝癌は増加傾向となっており、社会的な問題となっている。NAFLD/NASHの病態には腸内細菌が関わっていることがこれまで示唆されているが、糞便中の腸内細菌叢を解析した研究に限られており、その全貌は明らかでない。本研究では、消化管粘膜表層の細菌叢の解析を行い、これまでに明らかにされなかったNAFLD患者での消化管の表層細菌の変化を解析し、NASH・NAFLDの病態解明の基礎的知見が得られた。NASH・NAFLDの病態解明への進展が期待できる成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic fatty liver disease/hepatitis (NAFLD/NASH) is a liver injury with a non-alcoholic fatty liver background. It is known that the gastrointestinal flora is involved in the pathogenesis, but the pathogenesis is unknown. The purpose of this study is to analyze not only the feces of patients but also the bacterial flora on the surface of the intestinal mucosal epithelium, and to clarify the relationship between disease characteristics and disease activity. In this study, bacterial DNA was extracted from NAFLD and healthy subjects' stool, mucus on the surface of the gastrointestinal mucosa, and saliva, and analyzed using a next-generation sequencer. In NAFLD patients, we clarified not only the changes in the fecal flora, as previously reported, but also the characteristics of the mucosal surface bacteria on the enterobacterial side. We believe that the findings obtained in this study can provide basic information for elucidating the pathology of NASH and NAFLD.

研究分野：消化器内科学

キーワード：非アルコール性脂肪肝 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

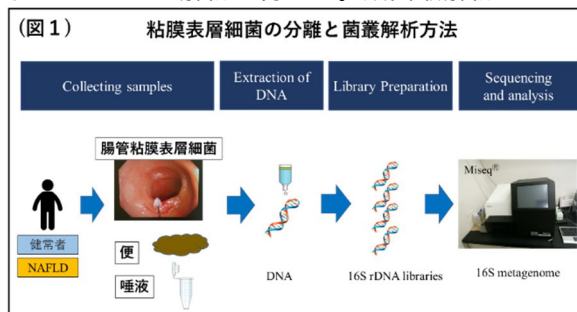
非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) はアルコールが原因ではない脂肪肝 (NAFLD) を背景とする肝炎である。さらに BMI 正常であるにもかかわらず、膵切除後や消化管術後など腸内細菌変化が起こる患者で NASH を発症する患者が存在する。NASH は、健常人と比べ糞便中の腸内細菌叢構成の違いが指摘されているが、腸管粘膜上皮により近い上皮表面のムチン層内の細菌叢の違いとその病態への影響については不明な点が多い。

2. 研究の目的

当研究の目的は NASH 患者の腸管粘膜上皮表面の細菌叢に疾患特有性や病勢との関連があるかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

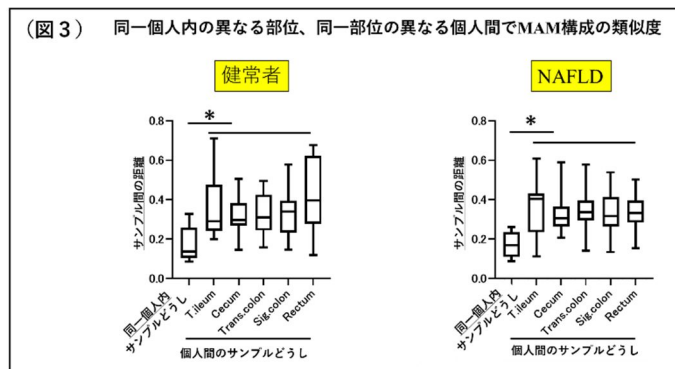
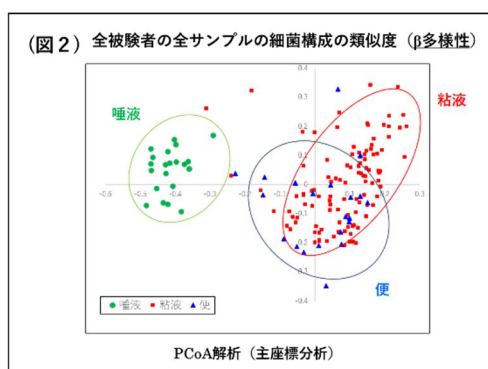
擦過細胞診ブラシにて粘膜表面のムチン層のみを採取し細菌叢解析を行う手法を検討した。下部消化管内視鏡を用い、回腸末端、盲腸、横行結腸、S 状結腸、直腸の各部位から擦過細胞診ブラシを用い粘膜表層細菌を含んだ粘液を採取し、細菌 DNA を抽出し当研究室に設置してあるイルミナ社の次世代シーケンサー (MiSeq) を用いメタ 16S 解析を行った。細菌叢解析ソフトは QIIME を用いてクオリティーチェックおよび greengene データベースを参照し属レベルまでの同定し、粘膜上皮表面の細菌叢構成の違いを解析し、糞便・唾液中の細菌叢との比較解析を行った (図 1)。さらに、Picrust のソフトを用いて KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) のデータベースを参照し、菌叢の機能の予測解析を行い、菌叢の変化が病態に及ぼす影響も解析した。



4. 研究成果

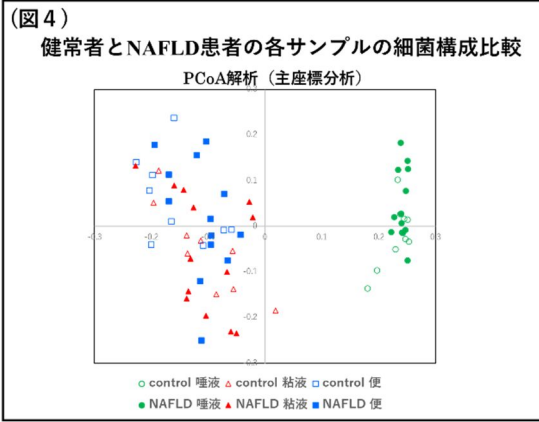
粘膜上皮表面のムチン層に存在する細菌叢の標準的解析方法の確立

各サンプルの菌叢の標準的な解析方法を条件検討し最適な菌叢解析方法を確立した。NAFLD15 名と健常人 9 名の被験者の便、消化管粘膜表層の粘液、唾液から細菌 DNA を抽出し次世代シーケンサーで解析した。全被験者の全サンプルの細菌叢構成の類似性を Qiime ソフトウェアを用いて主座標分析 (PCoA) を行った。便、消化管粘膜表層、唾液の中の細菌叢構成はそれぞれで異なったクラスターを形成しており、それぞれのサンプル中の細菌が異なることが示唆された。さらに、健常人および NAFLD どちらの群でも、消化管粘膜表層細菌 (MAM) が 1 個人内の 5 か所 (回腸末端、盲腸、横行結腸、S 状結腸、直腸) の細菌叢構成の類似度は、他人同士の同じ個所の菌叢構成の類似度よりも高かった。



健常人と NAFLD 患者のサンプル毎の菌叢の違い

次に健常人と NAFLD 患者のそれぞれのサンプル中の菌叢の比較を行った。腸内細菌は年齢や性別で異なる傾向がありため、両群の背景をプロペンシティブスコアを用いてマッチングさせた 7 名づつの患者で解析を行った。糞便中の細菌叢は NAFLD 群で菌の多様性が低下し、菌叢構成も健常人と異なり、これまでの既報と同等の結果であった。一方で、消化管粘膜表層細菌 (MAM) は NAFLD 群で多様性が低下し健常人と比べて菌叢構成も異なる傾向であったが、NAFLD 群の便中の腸内細菌の変化に比べてやや限定的であった (図 4 および table 1)。



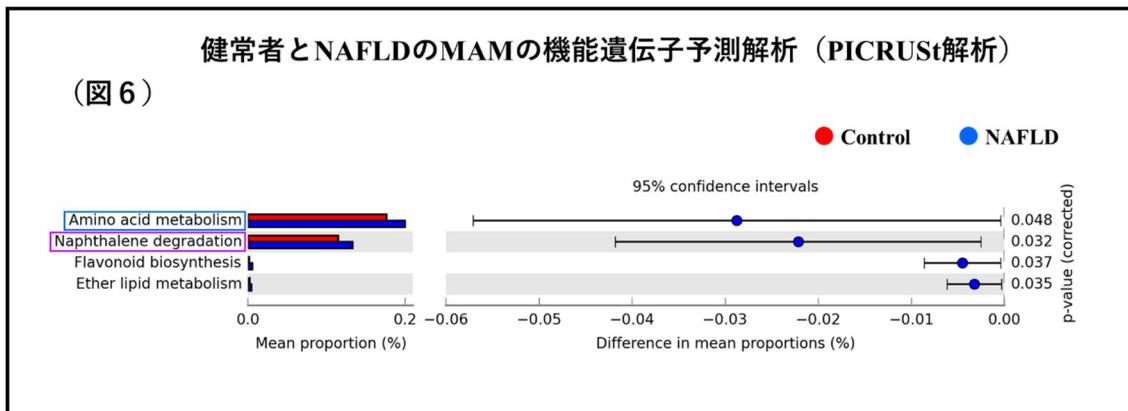
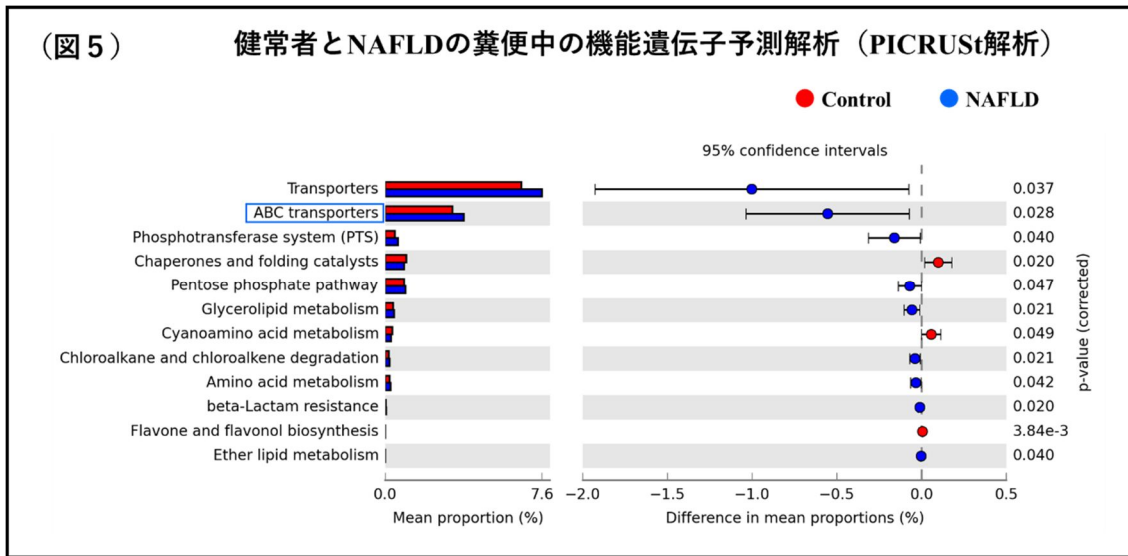
(table 2) 健常者とNAFLD間とで菌多様性、構成類似度比較

健常者vs NAFLD	菌多様性		菌構成の類似度 PERMANOVA (PCoA)	
	Observed species Shannon Chao 1	p-value*	Pseudo-F 値 • weighted • unweighted	p-value*
便	174.57 vs 134.86	0.048 *	1.4179	0.05 *
	5.51 vs 4.65	0.067	2.1497	0.049 *
	206.34 vs 167.91	0.087		
MAM (回腸末端)	138.57 vs 124.57	0.315	2.4528	0.065
	5.25 vs 4.71	0.013 *	0.8406	0.813
MAM (盲腸)	145.29 vs 156.29	0.499	1.0289	0.39
	5 vs 5.21	0.652	0.8836	0.718
MAM (横行結腸)	205.87 vs 188.18	0.475	2.0392	0.058
	147.29 vs 134.43	0.492	0.730	0.944
MAM (S状結腸)	4.92 vs 4.72	0.253	0.7977	
	195.01 vs 167.44	0.616	2.5625	0.05 *
MAM (直腸)	131.86 vs 121	0.727	1.1585	0.196
	4.7 vs 4.88	0.591		
MAM (直腸)	164.04 vs 149.02	0.919	1.7415	0.089
	143.14 vs 140.71	0.395	0.9133	0.656
MAM (直腸)	4.83 vs 5.29	0.883		
	176.81 vs 171			

NAFLDの腸内細菌の機能性の変化の解析

NAFLD 群の腸内細菌の変化がどのように病態に影響しているかを考察するために、腸内細菌の構成の変化に伴う腸内細菌全体での機能の変化を Picrust のソフトを用いて KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) のデータベースを参照し、予測解析を行った。糞便細菌叢ではもっとも顕著に変化していた経路として ABC トランスポーターの経路が増加していた(図5)。この経路は、一次胆汁酸・二次胆汁酸の合成に関与しており、この経路の亢進により胆汁酸合成の調節不全が惹起される可能性が推定される。

次に粘膜表層細菌叢 (MAM) における機能変化を解析した(図6)。NAFLD で変化していた経路としては、アミノ酸代謝やナフタレン分解の経路が増加していた。NAFLD では種々のアミノ酸が代謝異常が報告されており、この結果から腸内細菌の変化が関与している可能性も考えられる。また、腸内細菌科の発育や病原性を促進するカテコールを産生するナフタレン分解経路も、NAFLD で亢進が見られた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Asaji Naoki, Inoue Jun, Hayashi Hiroki, Tokunaga Eri, Shimamoto Yusaku, Kinoshita Masato, Tanaka Takeshi, Sakai Arata, Yano Yoshihiko, Ueda Yoshihide, Kodama Yuzo	4. 巻 6
2. 論文標題 Constitution of mucosa associated microbiota in the lower digestive tract does not change in early stage of non alcoholic fatty liver disease with fecal dysbiosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 677 ~ 684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jgh3.12803	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
研究分担者	井上 潤 (Inoue Jun) (50631561)	神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501)	
研究分担者	矢野 嘉彦 (Yano Yoshihiko) (60419489)	神戸大学・医学研究科・講師 (14501)	

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