

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08361

研究課題名(和文) 口腔内細菌叢異常と肝発癌リスク増大 - NASH-肝癌モデルによる発癌抑止機構の解明

研究課題名(英文) Oral dysbiosis increases a risk of hepatic carcinogenesis

研究代表者

溝上 裕士 (Mizokami, Yuji)

筑波大学・医学医療系・客員研究員

研究者番号：70268556

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)：Nrf2遺伝子欠失マウス(Nrf2-KO)，Nrf2-KOをベースに作製したKupffer細胞を含むマクロファージのみにNrf2を発現するマクロファージ特異的Nrf2遺伝子レスキューマウス(Nrf2 m-res)に高脂肪食とP.g菌由来LPSを投与してNASHを誘導し，野生型マウス(WT)を含めてそのNASH表現型を比較検討し，歯周病原菌関連NASHにおけるNrf2の役割について検討した．転写因子Nrf2，特にKupffer細胞を含むマクロファージにおけるNrf2は，NASHモデルにおける肝の炎症と線維化を抑制して，NASH発症に対して防御的に機能することが示唆された．

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病原菌のリポ多糖を介した腸肝連関という新しい視点から非アルコール性脂肪性肝疾患の進展機序を明らかにしようとした．高脂肪食とP.g菌由来のLPS投与によるNASHモデルにおいて，Nrf2遺伝子の欠失は，肥満とインスリン抵抗性の改善を介さずに肝組織の炎症と線維化を悪化させた．これらの結果より，歯周病原菌関連NASHにおいて，転写因子Nrf2，特にKupffer細胞を含むマクロファージにおけるNrf2は，防御的に機能することが示唆されことは意義が大きい．

研究成果の概要(英文)：We fed WT mice, Nrf2-KO mice and macrophage-specific Nrf2 gene rescue mice which were generated based on Nrf2-KO mice, with a high-fat die coupled with P.g bacteria-derived LPS, and induced NASH. By comparing the phenotype of NASH, we studied the biological role of Nrf2 in periodontal disease bacteria-related NASH in the mice. Transcription factor Nrf2, especially Nrf2 in macrophage, inhibited hepatic inflammation and fibrogenesis, which in turn played a preventive role in the onset of NASH.

研究分野：消化器病学

キーワード：NASH 歯周病 Nrf2 遺伝子改変マウス LPS

## 1. 研究開始当初の背景

わが国では非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) と歯周病が劇的に増加している。腸内細菌叢に加え口腔内細菌叢の異常 (dysbiosis) は肥満における NASH 発症を促進する可能性がある。代表者らはこれまでに、NASH を合併する肥満者では、lipopolysaccharide (LPS) の血中濃度が高いことを報告してきた (*J Gastroenterol* 2018)。LPS はこれまで腸内細菌由来と考えられてきたが、最近では、歯周病菌感染由来の LPS と NASH との関連性が報告されている。先進国では人口の 80% 以上が歯周病に罹患しており、歯周病菌が腸内に移行し潜在的に腸内細菌叢に影響を与え、NASH 肝病変を増悪させることが示唆されている (*PLoS One* 2015)。すなわち、口腔内細菌叢の異常 (dysbiosis) は、新しく提唱されたコンセプトである「Oral-Gut-Liver Axis」を介して、NASH 発症により深く関与している可能性がある。

一方、歯周病菌やその LPS に対する生体側の防御機構も重要な因子である。近年のゲノム解析では、生体の酸化ストレスセンサーとして機能する Keap1-Nrf2 pathway の遺伝子変異が報告され、抗炎症・酸化ストレス応答の障害により NASH 発症や肝発癌が促進されると推測されている (*Nat Genet* 2014)。代表者らの研究室では、酸化ストレス防御の司令塔である転写因子 Nrf2 が、NASH の発症進展に対して防御的に機能することを実験的に明らかにしてきた (*J Gastroenterol* 2012)。更に、Nrf2 は肝細胞のみならず LPS を介した自然免疫応答を介して NASH 進展に影響を与えられ (*Exp Anim* 2018)、Nrf2 は腸肝連関において肝細胞や Kupffer 細胞など複数の臓器組織細胞で NASH に対して防御を担うことが示唆される。

口腔内細菌叢の dysbiosis が「Oral-Gut-Liver Axis」を介して NASH 発症に関与するといった新しくコンセプトを構築し、また、Nrf2 遺伝子細胞特異的遺伝子レスキューマウスを用いて、歯周病菌感染のもと「Oral-Gut-Liver Axis」の各部位臓器における Keap1-Nrf2 pathway の生体防御機構としての役割を明らかにして、将来的に NASH の予防や治療に結びつく可能性を導き出すことを考案してきた。

NASH に対する予防と治療には食事運動療法しか有効な手段はない。代表者らは肥満者に対する運動療法試験や動物実験により、運動が Kupffer 細胞 (KCs) の LPS 異物貪食能力を改善させ、LPS に対する抗炎症作用を高めることにより、慢性炎症の病態を改善することも報告してきた (*Sci Rep*, 2017)。

## 2. 研究の目的

代表者らの研究室では、これまでの解析により、高脂肪食と歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P.g* 菌) 由来の LPS 投与による NASH モデルにおいて、全身の Nrf2 遺伝子の欠失が肝臓における炎症と線維化を増悪させることを明らかにしてきた。本研究では、全身 Nrf2 遺伝子欠失マウス (*Nrf2*-KO) と、*Nrf2*-KO マウスをベースに作製した Kupffer 細胞を含むマクロファージのみに Nrf2 を発現するマクロファージ特異的 *Nrf2* 遺伝子レスキューマウス (*Nrf2* m-res) に高脂肪食と *P.g* 菌由来 LPS を投与して NASH の肝病変を誘導し、野生型マウス (WT) における NASH 表現型と比較検討し、歯周病原菌 (*P.g* 菌) に関連した NASH の発症と進展における Nrf2 の役割を明らかにすることを目的とした。

また、NASH 肥満者を対象に 3 ヶ月間の運動療法を実施する。運動プログラムとして、1 週間に 3 回の頻度で 12 週間にわたる臨床試験を実施する。その前後で口腔内環境、唾液の成分分析、口腔内細菌叢のメタゲノム解析、腸内細菌叢のメタゲノム解析、各細菌叢の代謝機能の解析を実施する。得られた結果より、運動実践による NASH 肝病態の改善の分子メカニズムについて、「Oral-Gut-Liver Axis」および「生体防御機構」の観点より解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) マクロファージ特異的 *Nrf2* 遺伝子レスキューマウス (*Nrf2* m-res) の作製

*Nrf2* 遺伝子のイントロンに、*LoxP* 配列で挟まれた転写終結シグナルおよび *polyA* 付加シグナル配列を挿入したノックインマウス (*Nrf2*<sup>KI/KI</sup>) を作製した。このマウスは、*Nrf2*<sup>-/-</sup>と同様全身で *Nrf2* 遺伝子が欠損する (*Nrf2*-KO)。次に、*Nrf2*<sup>KI/KI</sup> マウスと、マクロファージ特異的に *Cre* リコンビナーゼを発現するマウス (*Lysozyme 2-Cre* マウス) を交配する。これにより生まれる仔は、*Cre* が発現するマクロファージでのみ *LoxP* で挟まれた転写終結シグナルと *polyA* 付加シグナルが除去されるため、Nrf2 がマクロファージにのみ特異的に発現する (最終遺伝子型: *Nrf2*<sup>KI/KI::Lysozyme2-cre/+</sup>)。

## (2) 高脂肪食摂餌と *P.g* 菌由来 LPS 投与による NASH モデル作製 ( 図 1 )

雄性 5 週齢の *Nrf2*-KO マウス, *Nrf2* m-res マウス, WT マウスに 60%高脂肪食を 17 週間摂餌させ, 後半 6 週間に *P.g* 菌由来 LPS ( InvivoGen ) を週 2 回腹腔内投与した ( 0.3 mg/kg ). 23 週齢で屠殺し, 体組成, 血液生化学検査, 肝病理組織評価 ( steatosis activity fibrosis score ; SAF score ), 肝組織の定量的 PCR について比較解析をおこなった .

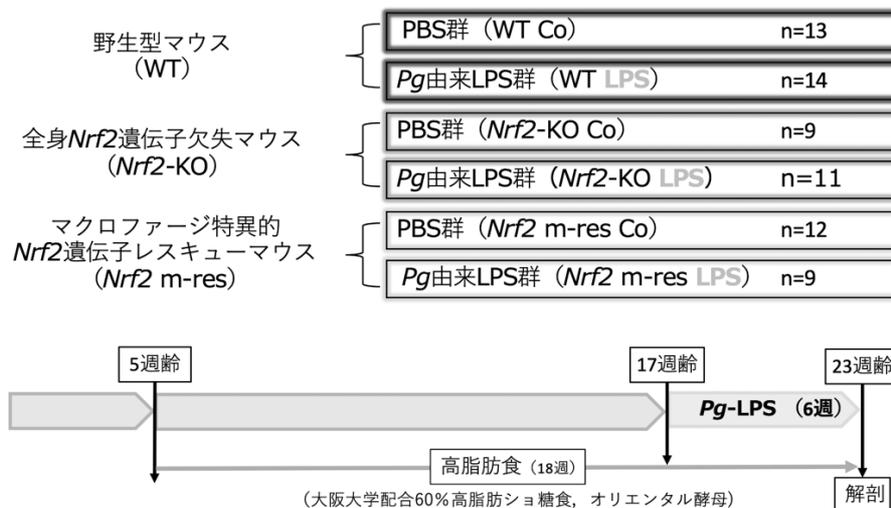


図 1. 実験プロトコール

## (3) 運動療法試験

本学において開催された「減量教室」の参加者とした。プログラム内容は週 3 回 1 回 90 分, 講義とレジスタンス運動, 有酸素運動を中心とした運動実践プログラムであった。レジスタンス運動の内容はレッグプレス, レッグエクステンション, レッグカール, チェストプレス, シーテッドロウ, プルダウン, 腹筋を行い, 運動量は 1 セッション 170 ~ 190kcal とした。有酸素運動の内容は主にウォーキングと自転車を使用し 20 分 ~ 40 分, VO<sub>2</sub>max ( 最大酸素摂取量 ) は 60-85%, 運動量は 1 セッション 180 ~ 360 kcal とした。唾液のサンプリング, 口腔内診査および各測定はプログラム実施の 1 か月前 ( Pre 測定 ) とプログラム終了の 1 か月後 ( Post 測定 ) に実施した。

## 4 . 研究成果

### (1) 動物実験

高脂肪食に加え LPS を投与した *Nrf2*-KO マウス, *Nrf2* m-res マウスは, WT と比較して有意に体重と肝臓重量が低値であった。これらの差は, 高脂肪食単独群, および *Nrf2*-KO マウス, *Nrf2* m-res マウスとの間では認められなかった。糖負荷試験では, *Nrf2*-KO マウス, *Nrf2* m-res マウスよりも, WT で耐糖能異常の悪化が認められ, 同様にインスリン負荷試験では, WT でインスリン抵抗性の増悪が認められた。*Nrf2*-KO マウス, *Nrf2* m-res マウスの間では差は認められなかった。血液生化学検査では, AST は各群で有意な差を認めなかったが, ALT は *Nrf2*-KO マウス, *Nrf2* m-res マウスよりも, WT で有意に高値であった。

肝組織の病理組織学的解析 ( 図 2 ) においては, 高脂肪食摂餌単独の *Nrf2*-KO マウスと WT マウスでは, 脂肪化 ( steatosis ) と炎症 ( activity ) に差を認めなかったが, *Nrf2*-KO マウスでは軽度の線維化 ( fibrosis ) が出現していた ( WT vs *Nrf2*-KO = 0.0 ± 0.0 vs 0.7 ± 0.2 ) 。 LPS を投与した群では, 肝の脂肪化は差を認めなかったものの ( WT vs *Nrf2*-KO = 1.3 ± 0.07 vs 1.2 ± 0.09 ) , *Nrf2*-KO マウスで有意に強い肝の炎症 ( WT vs *Nrf2*-KO = 0.6 ± 0.07 vs 1.3 ± 0.09 ) と線維化の出現を認めた ( WT vs *Nrf2*-KO = 0.0 ± 0.0 vs 1.3 ± 0.2 ) 。一方, *Nrf2* m-res マウスでは *Nrf2*-KO マウスで認められた肝の炎症 ( *Nrf2*-KO vs *Nrf2* m-res = 1.3 ± 0.09 vs 0.3 ± 0.09 ) と線維化 ( *Nrf2*-KO vs *Nrf2* m-res = 1.3 ± 0.2 vs 0.0 ± 0.0 ) が軽減した。

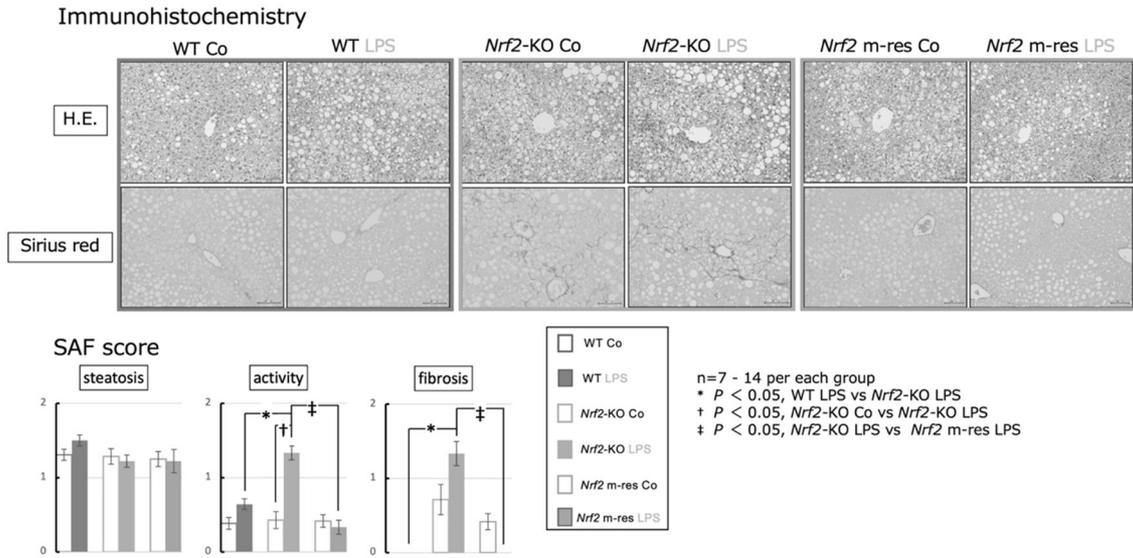


図2. 肝病理組織

肝組織の定量的 PCR 解析では，LPS 投与群で WT マウスよりも *Nrf2*-KO マウスで，炎症性サイトカイン *Il-1 $\beta$*  と肝線維化促進因子 *Tgfb1* が有意に増加していた．肝組織の *Nrf2* m-res マウスでは *Nrf2*-KO マウスに比して toll-like receptor 2 が有意に減少していた．

これらの結果より，高脂肪食と *P.g* 菌由来の LPS 投与による NASH モデルにおいて，*Nrf2* 遺伝子の欠失は，肥満とインスリン抵抗性の改善を介さずに肝組織の炎症と線維化を悪化させた．これらの結果より，歯周病菌関連 NASH において転写因子 *Nrf2* は防御的に機能することが示唆された．

(2) 運動療法試験

運動療法は唾液中 LPS，lactoferrin，TNF- $\alpha$ ，IgA 濃度を減少させた．口腔内細菌の菌層構造の多様性解析 (alpha-diversity) では有意ではないものの，運動療法は多様性を増大 (beta-diversity) させた (図3)．菌種組成比の解析では，*Campylobacter*，*Corynebacterium*，*Prevotella*，*Actinomyces*，*Lautropia* の菌数が有意に減少した (図4)．メタゲノム機能予測解析にて，運動療法は口腔内細菌の LPS 生合成に関わる遺伝子発現量の減少させた．

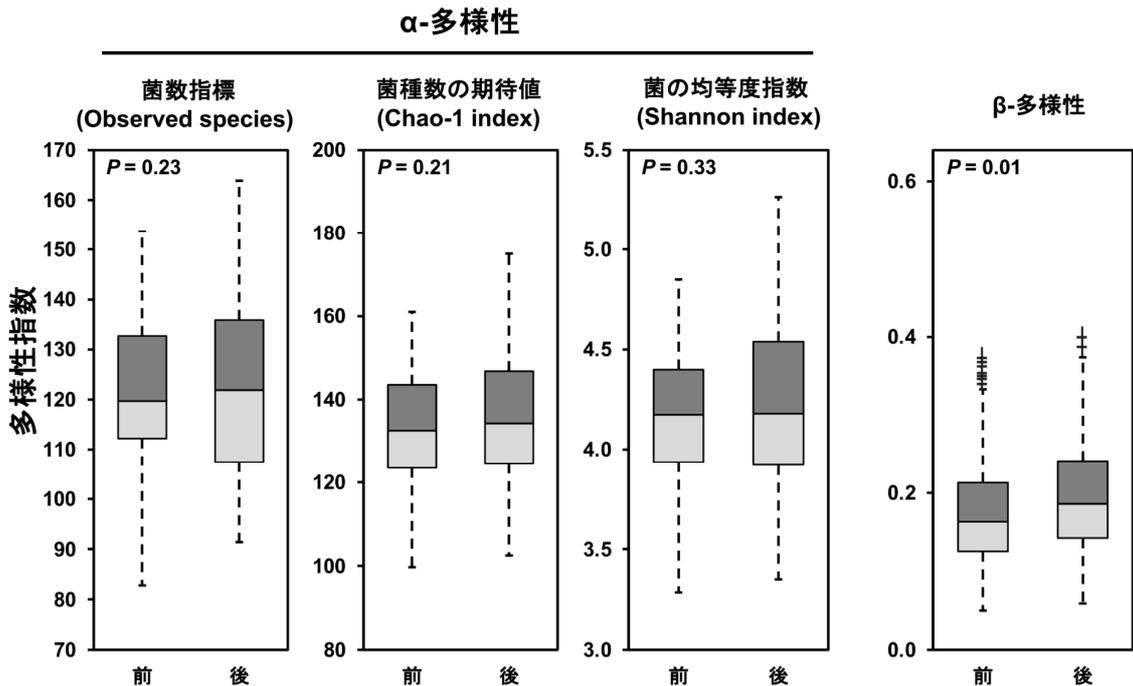


図3. 口腔内細菌叢のゲノム解析：多様性と多様性の変化

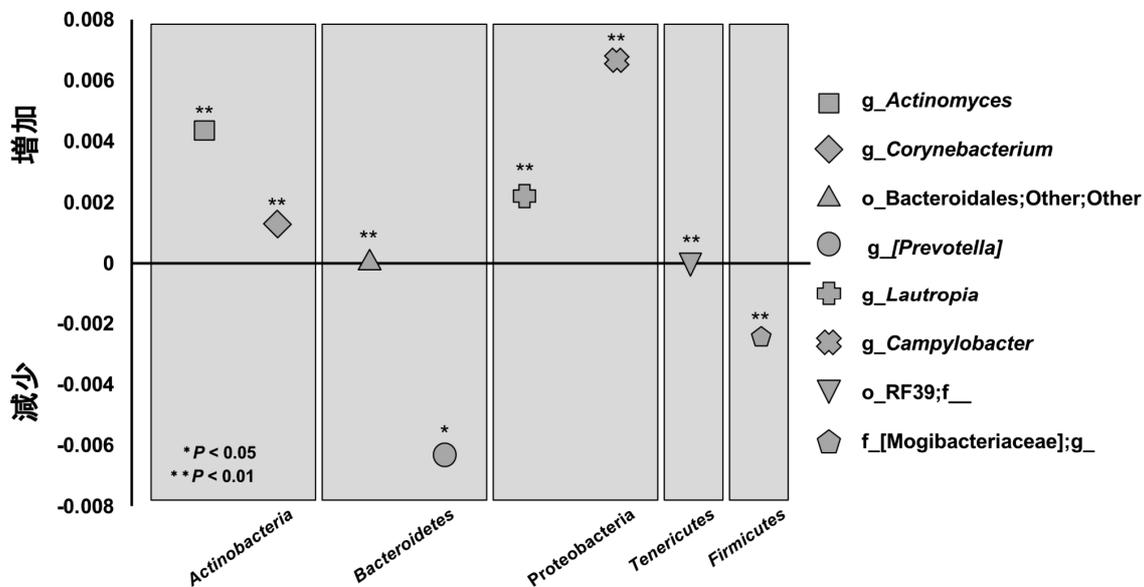


図4. 口腔内細菌叢のゲノム解析：菌種組成比解析

運動実践が口腔内細菌叢の多様性を増大させたことは注目に値するデータである。炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎が腸内細菌叢の多様性が失われること (dysbiosis) より発症することが報告されているが、歯周病も口腔内細菌叢の dysbiosis より発症すると考えられるからである。その多様性の増大は、前述した口腔内 Mφ の異物貪食能の増大と共に、唾液中 LPS 濃度を減少させ、口腔内環境の病態改善に寄与したと推測される。最近では、歯周病患者の口腔内細菌が腸内に流入し、潜在的に腸内細菌叢の組成に影響を与えることが示唆されており、口腔内 dysbiosis は新しく提唱されたコンセプトである「Oral-Gut-Liver Axis」を介して、肥満者の NASH 肝病態に重要な影響を与えていることが判明しつつある。今後においては、NAFLD 肥満者のマネジメントには口腔内環境にも留意して、運動療法の実践による口腔内 dysbiosis と口腔内環境の改善を介した肝病態の改善が求められると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Uchida F, Oh S, Shida T, Suzuki H, Yamagata K, Mizokami Y, Bukawa H, Tanaka K, Shoda J	4. 巻 18
2. 論文標題 Effects of Exercise on the Oral Microbiota and Saliva of Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Environ Res Public Health	6. 最初と最後の頁 3470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijerph18073470	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 Tagawa M, Morita A, Imagawa K, Mizokami Y	4. 巻 33
2. 論文標題 Endoscopic retrograde cholangiopancreatography and endoscopic ultrasound in children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dig Endosc	6. 最初と最後の頁 1045-1058
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/den.13928	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 Tsuboi H, Suzuki H, Akutsu D, Terasaki T, Okamoto S, Kondo Y, Matsumoto I, Mizokami Y, Sumida T	4. 巻 60
2. 論文標題 Pathologically confirmed oesophageal involvement in idiopathic multicentric Castleman disease mimicking early oesophageal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 50-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/keaa431	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 Mizokami Y, Yamamoto T, Atarashi H, Yamashita T, Akao M, Ikeda T, Koretsune Y, Okumura K, Shimizu W, Tsutsui H, Toyoda K, Hirayama A, Yasaka M, Yamaguchi T, Teramukai S, Kimura T, Kaburagi J, Takita A, Inoue H	4. 巻 15
2. 論文標題 Current status of proton pump inhibitor use in Japanese elderly patients with non-valvular atrial fibrillation: A subanalysis of the ANAFIE Registry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0240859
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0240859	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 Watahiki T, Okada K, Warabi E, Nagaoka T, Suzuki H, Ishige K, Yanagawa T, Takahashi S, Mizokami Y, Tokushige K, Ariizumi SI, Yamamoto M, Shoda J	4. 巻 69
2. 論文標題 Gender difference in development of steatohepatitis in p62/Sqstm1 and Nrf2 double-knockout mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Exp Anim	6. 最初と最後の頁 395-406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.20-0028	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 Iwamoto J, Murakami M, Monma T, Ueda H, Tamamushi M, Konishi N, Yara SI, Hirayama T, Ikegami T, Honda A, Mizokami Y	4. 巻 66
2. 論文標題 Current states of prevention of drug-induced gastroduodenal ulcer in real clinical practice: a cross-sectional study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr	6. 最初と最後の頁 158-162.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.19-66	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 Yasuda G, Ito H, Kurokawa H, Terasaki M, Suzuki H, Mizokami Y, Matsui H	4. 巻 64
2. 論文標題 The preventive effect of Qing Dai on bisphosphonate-induced gastric cellular injuries.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nut	6. 最初と最後の頁 45-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.17-108	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 Ueno T, Suzuki H, Hirose M, Shida T, Ikezawa K, Matsui H, Mizokami Y, Yanaka A.	4. 巻 24
2. 論文標題 Influence of living environment during childhood on helicobacter pylori Infection in Japanese young adults.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000502574	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 Shida T, Oshida N, Oh S, Okada K, Shoda J	4. 巻 12
2. 論文標題 Progressive reduction in skeletal muscle mass to visceral fat area ratio is associated with a worsening of the hepatic conditions of non-alcoholic fatty liver disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetes Metab Syndr Obes	6. 最初と最後の頁 495-503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/DMSO.S185705	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 Oshida N, Shida T, Oh S, Kim T, Isobe T, Okamoto Y, Kamimaki T, Okada K, Suzuki H, Ariizumi S, Yamamoto M, Shoda J	4. 巻 9
2. 論文標題 Urinary levels of Titin-N fragment, a skeletal muscle damage maker, are increased in subjects with Nonalcoholic fatty liver disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 19498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56121-7	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10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 内田 文彦、廣昌 広実、福澤 智、菅野 直美、山縣 憲司、武川 寛樹
2. 発表標題 歯周病に対する運動の影響 口腔内細菌叢および唾液分析
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内田 文彦、志田 隆史、大森 翔英、呉 世昶、福澤 智、菅野 直美、山縣 憲司、鈴木 英雄、正田 純一、武川 寛樹
2. 発表標題 中年肥満男性の歯周病に対する運動療法の効果 口腔内細菌叢とメタゲノムの解析より
3. 学会等名 第74回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 綿引隆久, 岡田浩介, 正田純一
2. 発表標題 レドックスナノ粒子 (RNP) はp62:Nrf2遺伝子二重欠失マウス脂肪性肝炎における線維化を抑制する
3. 学会等名 JDDW2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田浩介, 綿引隆久, 正田純一
2. 発表標題 p62は肝臓-脂肪組織の連関による脂肪酸代謝の制御を介してマウス脂肪性肝炎を防御する
3. 学会等名 第106回消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦征, 石井亜紀子, 綿引隆久, 岡田浩介, 和田聖大, 正田純一
2. 発表標題 継続的走運動は筋-肝連関を介して脂肪性肝炎の炎症・線維化を改善する
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 遠藤 壮登, 石毛 和紀, 長谷川 直之, 福田 邦明, 溝上 裕士
2. 発表標題 胆管空腸吻合術後の肝内結石に対する治療の現状
3. 学会等名 第61回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川 直之, 福田 邦明, 溝上 裕士
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤による肝障害に対する治療戦略
3. 学会等名 第23回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝上裕士
2. 発表標題 経鼻内視鏡の最前線 経鼻内視鏡発展の変遷と展望
3. 学会等名 第97回日本消化器内視鏡学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田浩介, 石毛和紀, 藤 栄治, 正田純一
2. 発表標題 脂肪酸代謝に着目したマウス脂肪性肝炎におけるp62の役割
3. 学会等名 第105回消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田浩介, 石毛和紀, 正田純一
2. 発表標題 Lipophagy制御因子p62は, 中性脂肪-脂肪酸代謝を介してマウス脂肪性肝炎を防御する
3. 学会等名 第55回肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

〔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	鈴木 英雄 (Suzuki Hideo) (00400672)	筑波大学・医学医療系・准教授  (12102)	
研究分担者	藤 栄治 (Warabi Eiji) (70396612)	筑波大学・医学医療系・講師  (12102)	
研究分担者	内田 文彦 (Uchida Fumihiko) (70736008)	筑波大学・附属病院・病院講師  (12102)	
研究分担者	岡田 浩介 (Okada Kosuke) (80757526)	筑波大学・附属病院・病院講師  (12102)	
研究分担者	正田 純一 (Shoda Junichi) (90241827)	筑波大学・医学医療系・教授  (12102)	

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