

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08451

研究課題名(和文) ヒト門脈血液中に検出する細菌種解析による肝疾患形成の解明

研究課題名(英文) Elucidation of liver disease formation by bacterial species analysis detected in human portal blood

研究代表者

渡邊 綱正 (Watanabe, Tsunamasa)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20338528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腸内環境からみた新たな肝疾患治療戦略の科学的根拠を見出すことを目的に、独自の方法により計28例のヒト門脈血液を採取した。さらに、同一個体から同時に採取した糞便と門脈血も併せて、次世代シーケンシングによる腸内細菌叢メタゲノム解析を行った。これまでの結果では、約半数の症例に門脈血流内に細菌DNAが検出され、さらに同じ症例における門脈血液内と糞便中に検出される細菌叢は同一ではないことが明らかとなり、選択的に門脈血液内に細菌が流入している可能性が示唆された。しかしながら、同一疾患であっても症例ごとにより門脈血液内に検出される細菌種は異なり、一貫した傾向はつかめず疾患との明らかな関連性は見い出せなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、増加傾向にあるアルコール性肝疾患や非アルコール性脂肪性肝炎において、肝病態進展と腸内細菌叢の関連が指摘されているが、ヒトにおいて腸管粘膜を通過し門脈を通じて肝臓に流入する細菌について検討した報告は少なく、今回独自の方法により採取した門脈血を用いて腸内細菌叢メタゲノム解析を試みた。肝疾患患者の約半数で閉鎖系の門脈血流に細菌が流入している可能性を見出したが、個体差が大きいことも明らかとなった。今後は、肝疾患患者の腸内細菌叢の改変による治療介入の可能性について、さらなる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To find a scientific basis for a new treatment strategy for liver disease from the viewpoint of the intestinal environment, a total of 28 cases of human portal vein blood were collected by a unique method. Furthermore, we performed intestinal flora metagenomic analysis by next-generation sequencing, including feces and portal vein blood collected from the same individual at the same time. The results revealed that bacterial DNA was detected in the portal blood flow in about half of the cases, and that the bacterial flora detected in the portal blood and feces in the same case was not the equal. Even for the same liver disease, the bacterial species detected in the portal vein blood differed from each case, and a consistent tendency could not be obtained and a clear association with the disease could not be found.

研究分野：肝臓

キーワード：腸内細菌叢 肝疾患 門脈血

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人体において最大の細菌保有環境である腸管内の細菌叢は、全身性の炎症性疾患や免疫関連性疾患に関与する可能性が報告されている。しかしながら、ヒト常在細菌叢の研究では、健康な個体間であっても糞便中の常在微生物は異なり、さらに生活習慣ならびに食事習慣によっても大きく異なることが明らかとなってきた。よって、現在主流となっている糞便を用いた細菌叢の解析のみでは、検討する集団によっては一定の傾向が見出だせない可能性が示唆され、生体内に直接作用する腸内細菌叢を同定、解析することが必要不可欠である。

これまでに、大腸がんを合併した肝膿瘍の腸管の細菌叢(フローラ)解析から、門脈を介して肝臓に流入する細菌種には、受動的迷入(Leaky Gut 症候群)のみではなく能動的流入の可能性も考えられ、さらに肝臓に侵入する細菌は必ずしも糞便中の細菌叢を反映していない可能性が示唆された。一方では、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。したがって、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、各種の肝疾患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

独自の方法で入手したヒト門脈血液を用いて、門脈血流内に存在する腸内細菌叢メタゲノム解析とその生理活性、ならびに腸内細菌叢から産生される種々の代謝物質のメタボローム解析を目的とした。従来では菌体成分の一部ないし細菌が産生する毒素(LPS など)などの二次的成分による肝臓への影響を中心に医学研究が進んでいるが、今回の研究により門脈血流に侵入する腸内細菌そのものが証明・同定されることによって、新たな医学概念の礎となる可能性があると考えた。また、門脈血中の腸内細菌叢プロファイルと疾患関連性を明らかとすることによって、非アルコール性肝疾患(nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)の疾患成因、難病指定されている肝疾患であるPBC、PSCの病因の一端、肝硬変進展阻止の新規治療介入の可能性、ならびに肝細胞癌発生に寄与する腸内細菌由来因子の新規同定など、学術的意味は計り知れないと考えた。

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とする。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とすることとした。

4. 研究成果

EISを施行した28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(13例)、NASH(5例)、肝炎ウイルス(4例)、PBC(3例)、非肝硬変例(3例)である。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、約半数の症例に門脈血流内に細菌DNAが検出され、さらに同じ症例における門脈血液内と糞便中に検出される細菌叢は同一ではないことが明らかとなった。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結果を得た。現在までに得られた結果では、肝疾患を有する糞便中の細菌叢は、既報のごとくアルコール性肝疾患と非アルコール性脂肪性肝炎患者ではBacteroides門が優位であったこと、さらに門脈血中に検出した細菌叢は、糞便中の細菌叢とは異なりProteobacteria門が優位であったことを見出した。しかしながら、同一疾患であっても症例ごとにより門脈血液内に検出される細菌種は異なり、一貫した傾向はつかめず疾患との明らかな関連性は見い出せなかった。そこで、現在は門脈血流内の細菌検出について、細菌の流入門戸である腸管上皮の結合に注目し検討を続けており、Leaky Gut 症

候群のサロゲートマーカーとされるゾヌリンの ELISA 測定を追加検討しているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 20件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawata Kazuhito, Watanabe Tsunamasa, Tsubota Akihito	4. 巻 -
2. 論文標題 Mac 2 binding protein glycan isomer predicts all malignancies after sustained virological response in chronic hepatitis C	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	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) 10.1002/hep4.1941	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 Atsukawa Masanori, Watanabe Tsunamasa, Iwakiri Katsuhiko	4. 巻 52
2. 論文標題 Time course changes in liver functional reserve after successful sofosbuvir/velpatasvir treatment in patients with decompensated cirrhosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 235 ~ 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13739	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 Chuma Makoto, Hattori Nobuhiro, Watanabe Tsunamasa, Maeda Shin	4. 巻 52
2. 論文標題 Safety and efficacy of atezolizumab plus bevacizumab in patients with unresectable hepatocellular carcinoma in early clinical practice: A multicenter analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 269 ~ 280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13732	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 Nagura Yoshihito, Matsuura Kentaro, Iio Etsuko, Fujita Koji, Inoue Takako, Matsumoto Akihiro, Tanaka Eiji, Nishiguchi Shuhei, Kang Jong-Hon, Matsui Takeshi, Enomoto Masaru, Ikeda Hiroki, Watanabe Tsunamasa, Okuse Chiaki, Tsuge Masataka, Atsukawa Masanori, Tateyama Masakuni, Kataoka Hiromi, Tanaka Yasuhito	4. 巻 17
2. 論文標題 Serum miR-192-5p levels predict the efficacy of pegylated interferon therapy for chronic hepatitis B	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0263844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0263844	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 Suzuki Fumitaka, Watanabe Tsunamasa, Kumada Hiromitsu	4. 巻 21
2. 論文標題 Switching from entecavir to tenofovir disoproxil fumarate for HBeAg-positive chronic hepatitis B patients: a phase 4, prospective study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	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) 10.1186/s12876-021-02008-9	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 Satta Yosuke, Shigefuku Ryuta, Watanabe Tsunamasa, Mizukami Takuro, Tsuda Takashi, Suzuki Tatsuya, Ehira Takuya, Hattori Nobuhiro, Kiyokawa Hirofumi, Nakahara Kazunari, Ikeda Hiroki, Matsunaga Kotaro, Takahashi Hideaki, Matsumoto Nobuyuki, Okuse Chiaki, Suzuki Michihiro, Sunakawa Yu, Yasuda Hiroshi, Itoh Fumio	4. 巻 5
2. 論文標題 Prediction of esophagogastric varices associated with oxaliplatin administration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 1289 ~ 1297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12668	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 Toyoda Hidenori, Watanabe Tsunamasa, Tanaka Junko	4. 巻 5
2. 論文標題 Characteristics and Prognosis of De Novo Hepatocellular Carcinoma After Sustained Virologic Response	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 1290 ~ 1299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1716	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 Nguyen Mindie H., Watanabe Tsunamasa, Enomoto Masaru	4. 巻 116
2. 論文標題 Outcomes of Sequential Therapy With Tenofovir Alafenamide After Long-term Entecavir	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1264 ~ 1273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14309/ajg.0000000000001157	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 該当する

1. 著者名 Toyoda Hidenori, Watanabe Tsunamasa, Nguyen Mindie H.	4. 巻 74
2. 論文標題 Treatment and Renal Outcomes Up to 96 Weeks After Tenofovir Alafenamide Switch From Tenofovir Disoproxil Fumarate in Routine Practice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 656 ~ 666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31793	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 該当する

1. 著者名 Urata Noboru, Watanabe Tsunamasa, Hirashima Noboru, Yokomaku Yoshiyuki, Imamura Junji, Iwatani Yasumasa, Shimada Masaaki, Tanaka Yasuhito	4. 巻 10
2. 論文標題 Cytokines and Chemokines Involved in Hepatitis B Surface Antigen Loss in Human Immunodeficiency Virus/Hepatitis B Virus Coinfected Patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 833 ~ 833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10040833	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 Ogushi Katsuaki, Chuma Makoto, Uojima Haruki, Hidaka Hisashi, Numata Kazushi, Kobayashi Satoshi, Hirose Shunji, Hattori Nobuhiro, Fujikawa Tomoaki, Nakazawa Takahide, Wada Naohisa, Iwasaki Shuichiro, Fukushima Taito, Sano Yusuke, Ueno Makoto, Kawano Kuniyuki, Tsuruya Kota, Shomura Masako, Watanabe Tsunamasa, et al.	4. 巻 Volume 13
2. 論文標題 Safety and Efficacy of Lenvatinib Treatment in Child-Pugh A and B Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma in Clinical Practice: A Multicenter Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 385 ~ 396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/CEG.S256691	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 Atsukawa Masanori, Tsubota Akihito, Kondo Chisa, Toyoda Hidenori, Nakamuta Makoto, Takaguchi Koichi, Watanabe Tsunamasa, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Real-World Clinical Application of 12-Week Sofosbuvir/Velpatasvir Treatment for Decompensated Cirrhotic Patients with Genotype 1 and 2: A Prospective, Multicenter Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Infectious Diseases and Therapy	6. 最初と最後の頁 851 ~ 866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40121-020-00329-y	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 Nozaki Akito, Atsukawa Masanori, Kondo Chisa, Toyoda Hidenori, Chuma Makoto, Nakamuta Makoto, Uojima Haruki, Takaguchi Koichi, Ikeda Hiroki, Watanabe Tsunamasu, et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 The effectiveness and safety of glecaprevir/pibrentasvir in chronic hepatitis C patients with refractory factors in the real world: a comprehensive analysis of a prospective multicenter study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology International	6. 最初と最後の頁 225 ~ 238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12072-020-10019-z	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 Toyoda Hidenori, Atsukawa Masanori, Watanabe Tsunamasu, et al.	4. 巻 35
2. 論文標題 Marked heterogeneity in the diagnosis of compensated cirrhosis of patients with chronic hepatitis C virus infection in a real world setting: A large, multicenter study from Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1420 ~ 1425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14982	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 Atsukawa M, Tsubota A, Toyoda H, Takaguchi K, Nakamuta M, Watanabe T, et al.	4. 巻 49
2. 論文標題 Efficacy and safety of ombitasvir/paritaprevir/ritonavir and ribavirin for chronic hepatitis patients infected with genotype 2a in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 369 ~ 376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13292	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 Atsukawa M, Tsubota A, Toyoda H, Takaguchi K, Nakamuta M, Watanabe T, et al.	4. 巻 49
2. 論文標題 The efficacy and safety of glecaprevir plus pibrentasvir in 141 patients with severe renal impairment: a prospective, multicenter study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Alimentary Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1230 ~ 1241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/apt.15218	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 Toyoda H, Atsukawa M, Uojima H, Nozaki A, Tamai H, Takaguchi K, Fujioka S, Nakamuta M, Tada T, Yasuda S, Chuma M, Senoh T, Tsutsui A, Yamashita N, Hiraoka A, Michitaka K, Shima T, Akahane T, Itobayashi E, Watanabe T, et al.	4. 巻 6
2. 論文標題 Trends and Efficacy of Interferon-Free Anti-hepatitis C Virus Therapy in the Region of High Prevalence of Elderly Patients, Cirrhosis, and Hepatocellular Carcinoma: A Real-World, Nationwide, Multicenter Study of 10 688 Patients in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Open Forum Infectious Diseases	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) 10.1093/ofid/ofz185	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 Ikeda H, Watanabe T, Iio E, Tsubota A, Hiraoka A, Nozaki A, Okubo H, Tachi Y, Moriya A, Oikawa T, Matsumoto Y, Tsuruoka S, Tani J, Kikuchi K, Iwakiri K, Tanaka Y, Kumada T, et al.	4. 巻 26
2. 論文標題 Evaluation of 8 week glecaprevir/pibrentasvir treatment in direct acting antiviral naive noncirrhotic HCV genotype 1 and 2 infected patients in a real world setting in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Viral Hepatitis	6. 最初と最後の頁 1266 ~ 1275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jvh.13170	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 Toyoda H, Atsukawa M, Watanabe T, et al	4. 巻 35
2. 論文標題 Real world experience of 12 week direct acting antiviral regimen of glecaprevir and pibrentasvir in patients with chronic hepatitis C virus infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 855 ~ 861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14874	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 Atsukawa M, Tsubota A, Takaguchi K, Toyoda H, Iwasa M, Ikegami T, Chuma M, Nozaki A, Uojima H, Hiraoka A, Fukunishi S, Yokohama K, Tada T, Kato K, Abe H, Tani J, Okubo H, Watanabe T, et al.	4. 巻 35
2. 論文標題 Analysis of factors associated with the prognosis of cirrhotic patients who were treated with tolvaptan for hepatic edema	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1229 ~ 1237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14965	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
--	---------------------------	-----------------------	----

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