

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11719

研究課題名(和文) 腸内環境を介した非アルコール性脂肪肝炎の発症リスクの低減に関する研究

研究課題名(英文) Intervention to gut microbiota and reduction of the risk of non-alcoholic steatohepatitis.

研究代表者

片岡 佳子 (KATAOKA, Keiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：40189303

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)：食餌誘導性非アルコール性脂肪肝炎(NASH)マウスモデルを用いて、幼若期(出生直後から満3週齢)の抗菌薬暴露の影響を検討した。抗菌薬無しで8週齢から高脂肪食を与えた陽性対照群に比べて、3種類の抗菌薬(バンコマイシン、ポリミキシン、アンピシリン)の投与群でNASHへの有意な影響はなかった。しかしながら、アンピシリン暴露群の一部マウスでは、体重著減と肝障害の進行がみられ、4および8週令時の菌叢構成と高脂肪食開始後の菌叢の変化パターンが同群の他個体とは異なっていた。幼若期の菌叢形成過程への抗菌薬暴露による介入が、高脂肪食による腸内環境の変動に影響して、重症化につながる場合があると考えられている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトやマウスモデルの非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の進展には個体差があり、そこに腸内環境の相違がかかわっている可能性が報告されているが、詳細は未解明である。今回の研究成果は、幼若期マウスの抗菌薬暴露が菌叢形成過程を攪乱し、成長後でも高脂肪食の影響を受けやすいタイプの腸内環境を作り出す可能性があることを示している。今後、マウス数を増やし、高脂肪食の影響を受けやすい個体の菌叢および腸内環境の経時的な変化を比較解析することにより、NASHの進展を予防するために有用な細菌やその代謝産物に関する知見を期待できる。抗菌薬は感染症治療に必須であるが、その適正使用の重要性も示している。

研究成果の概要(英文)：A diet-induced non-alcoholic steatohepatitis (NASH) mouse model was used to examine the effects of antimicrobial exposure in childhood (immediately after birth to 3 weeks of age) on the NASH level and gut microbiota. Compared to the positive control group that was given a high-fat diet from 8 weeks of age without antimicrobial drugs, no significant effect on NASH was observed in the group receiving three kinds of antibacterial drugs (vancomycin, polymyxin, and ampicillin). However, one female mouse in the ampicillin-exposed group showed severe weight loss and progression of liver damage, and its gut microbiota composition was different from the other individuals at 4 and 8 weeks of age, and the changing pattern of microbiota composition during an intake of high-fat diet.

Intervention to the bacterial flora formation process in early childhood by antimicrobial exposure might affect changes in the intestinal environment due to high-fat diets, leading to severe illness.

研究分野：微生物学(細菌学)、健康科学

キーワード：腸内細菌叢 非アルコール性脂肪肝炎 食餌誘導性マウスモデル 抗菌薬暴露 幼若期

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生活スタイルの変化に伴い増加を続けている生活習慣病において、患者と健常人の腸内菌叢の相違が発症リスクや疾患の進展と関連する可能性が注目され、様々な疾患の患者で、腸内菌叢が健常人とは異なること、菌叢構成菌種の多様性が低下する、構成比が変化する等が報告されている (Deveraji S. et al., 2013; Grabherr F et al., 2019)。一方で食物繊維など特定の食物成分が直接または腸内環境の変化を介して、様々な疾患の発症リスクを低減するとの報告もある。

ヒト腸管の管腔内には 500 種、10 兆個の腸内菌が常在し、絶妙なバランスを保ってヒトと共生している。腸内菌叢は、母親から受け継ぐ微生物に加えて、出生以降の環境要因の影響を受けて個人ごとに固有の細菌叢が形成される。おそらく、腸内菌叢の形成が始まる生後早期に多彩な微生物に暴露されることによって、バランスの取れた安定した個人ごとの腸内環境が形成される。いったん確立した菌叢の構成は健常人では非常に安定に保たれる。腸内菌の定着は、腸管上皮の細胞間密着結合や種々の抗菌物質の分泌など腸管バリア機能を強化している。また、腸内菌はヒトとは異なる代謝系を持ち、ヒトの分解できない食物成分から酢酸や酪酸等の有機酸を合成し、脂肪の摂取時に腸管内に放出される胆汁に含まれる胆汁酸の代謝にも関わっている。これらの代謝産物は吸収され全身に分布して、宿主の生体機能に大きな影響を与える。腸内菌の存在自体および有機酸や胆汁酸などの代謝産物がヒト腸管のバリア機能に関わる分子の発現や肝臓での脂質代謝、細胞機能に影響を及ぼすことが近年報告されている (Haque TR. et al., 2016; Alard J. et al., 2016)。

一方、食生活の変化や何らかのストレスなどによって、腸内菌とヒトとの共生関係に不具合が生じたときに、*dysbiosis* の状態となり、ある疾患のリスクが高まるのではないかと考えられている。腸内菌叢は常に宿主であるヒトの体内に常時存在し、相互に影響を及ぼしあっている。おそらく、菌叢の形成過程における宿主との適切な相互作用の積み重ねが、多様性と可塑性、柔軟性を持つ腸内環境の確立と安定性には非常に重要であり、疾患感受性とも関係している (Milani C. et al., 2017; Nogacka AM et al., 2018)。しかしながら、疾患感受性と腸内菌叢やその代謝産物を含む腸内環境との関連については、まだ未解明の点が多く、発症リスクの上昇あるいは減少につながる腸内菌や腸内環境は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の食餌誘導性モデルマウスを用いて、プレバイオティクスやプロバイオティクスによる介入や、幼若時の抗菌薬投与による腸内環境への介入を行い、腸内環境への影響を解析するとともに、脂肪肝炎の発症への影響を調べ、発症リスクと腸内環境との関連や発症を予防するためにはどのような腸内環境が重要なのかを明らかにしようと考えた。成体では菌叢は非常に安定に保たれるが、菌叢が確立される幼少期の介入が腸内環境に及ぼす影響は大きく、介入により欠落あるいは増加した腸内菌由来の機能が詳細に明らかになれば、そこを標的とした予防策を開発することができると考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 食餌誘導性 NASH モデル

C57BL/6J マウス (雄、雌 (8 週齢)) は日本チャールズリバー (株) より購入した。高脂肪の

特殊飼料として、ウェスタンダイエット（リサーチダイエット社，D12079B）またはコレステロール添加高脂肪食（リサーチダイエット社，D12336N）を与えて NASH モデルを作製した。通常食としてはオリエンタル酵母工業（株）製の通常食 MF を用いた。

動物実験は、徳島大学動物実験管理規則に従い、徳島大学動物実験委員会により承認された実験計画（承認番号 T30-132 号）に沿って、徳島大学先端研究推進センター動物資源研究部門において行った。購入したマウスを交配し、妊娠したマウスを個別ケージに移し、体重増加量を目安として出産日を予測し、仔マウスを実験に用いた。マウス腸内菌叢の形成過程への介入する場合には、出産 1~2 日前から飲料水の代わりに抗菌薬水溶液、200mg/L パンコマイシン、1000mg/L ポリミキシン B、100mg/L アンピシリンを自由摂取させた。大まかな抗菌スペクトラムは、パンコマイシンがグラム陽性菌対象、ポリミキシン B がグラム陰性菌対象、アンピシリンがほぼ全菌対象であり、抗菌薬への暴露濃度は先行文献を参考にした。

仔マウス（ $\text{C57BL/6J}$ ）は、母マウスと同ケージ内で、出生直後から離乳する 3 週齢までの間、飲料水、またはパンコマイシン、ポリミキシン、アンピシリンの水溶液を自由摂取させ、抗菌薬への暴露を行った。4 週齢からは通常食（MF）を摂取させ、8 週齢から 28 週齢の間に、ウェスタンダイエット（D12079B）またはコレステロール添加高脂肪食（D12336N）を自由に摂取させた。陰性コントロール群は抗菌薬暴露なしで通常食 MF を食べさせた群とした。

実験期間中は毎週、体重測定を行い、空腹時血糖値を 2 週間ごとに測定した（グルコカードおよび G センサー（Arkray））。実験開始から 20 週間後（動物実験終了時）に、イソフルラン麻酔下に全血、肝臓及び精巣周囲脂肪組織を採取した。血清を  $-30^{\circ}\text{C}$  に冷凍保存した。肝臓は全葉重量測定後、一部を切り出して 4%PFA でホルマリン固定・パラフィン包埋し、HE 染色標本作製した。

## （2）脂肪性肝疾患の評価

抗菌薬暴露なしで通常食 MF のみを摂取させた群（陰性対照群）抗菌薬暴露なしで D12079B または D12336 を摂取させた群（陽性対照群）に比べ、上記の抗菌薬暴露群で NASH のレベルに影響が出るかどうかを、血清中のバイオマーカー（ALT，TBA）の測定（オリエンタル酵母工業（株）長浜ライフサイエンスラボラトリー（滋賀県））および肝臓の HE 染色標本上での、脂肪滴の量、小葉内炎症、Ballooning の顕微鏡下観察とスコア化により、NASH の評価を行った。

## （3）マウス糞便菌叢の解析

抗菌薬暴露後の 4 週齢時、8 週齢時、および実験期間終了時に便を採取し、生理食塩水に懸濁し塗抹して、グラム染色を行い、大まかな菌叢の変化を観察した。腸内菌叢の解析は Terminal-RFLP 法（長島浩二ら、2014 年）により行った。便から DNA 抽出を行い、16S リボソーム RNA 遺伝子の PCR 増幅、*Bs*II 処理、フラグメント解析（GeneMapper ver.4.1）を行った。さらに、T-RF フラグメントの出現パターンについてクラスター分析（Excel 多変量解析 ver.7.0）を行った。

## （4）統計学的手法

エクセル統計 Statcel 3 を用いて行った。多群間の検定にはクラスカル・ウォリス検定を用い、独立した 2 群の差の検定については、等分散とみなせる場合はスチューデントの t 検定、等分散とみなせない場合はウェルチの t 検定を使用した。また、正規分布に従わない場合はマン・ホイットニ 検定を用いた。いずれの検定においても、危険率 5% 未満 ( $p < 0.05$ ) を有意差ありと判定した。

#### 4 . 研究成果

当初の計画では、高脂肪高コレステロール食(Ejima C et al., *Physiol Rep*, 2016)を C57BL/6J マウスに自由摂取させるモデルに、食物繊維の混餌投与、または *Bifidobacterium* 培養菌の胃内投与を行う予定であったが、マウスの摂食量が安定せず、陽性対照群において十分な脂肪肝炎の発症が見られなかった。また、*Bifidobacterium* 培養菌の投与効果についても、個体ごとに大きなばらつきがみられた。そこで、実験用特殊飼料について再考し、“少ない介入で作製するモデルマウス”(Tsuneyama K., 肝臓, 2018)を参考にし、徳島大学疾患病理学分野(常山幸一教授)に相談し、よりマウスに適した食餌誘導性の NASH モデルを使用することにした。腸内環境への介入を行うので、できるだけマウス側の身体的負担の少ないタイプのモデルを選択し直した。以下、その結果を報告する。

##### ( 1 ) 出生～満 3 週齢(離乳完了)の抗菌薬投与が NASH に及ぼす影響(D12079B diet)

8 週令から特殊飼料 D12079B を与えた陽性対照群のマウスでは、オスでもメスでも通常食群に比べて体重が増加し、体重増加量はオスの方が多かった。出生直後から離乳完了まで飲料水の代わりにバンコマイシン、ポリミキシン B、アンピシリンの水溶液を自由摂取させた抗菌薬暴露群でも同様に通常食群に比べて体重が増加し、特殊飼料に切り替えた直後の 8 週令～12 週令の 4 週間および実験期間終了時の体重増加量には抗菌薬暴露なしの陽性対照群との有意な差はみられなかった。実験終了時の肝臓および精巣周囲脂肪組織の重量は、通常食群に比べて陽性対照群では増加していたが、抗菌薬暴露による有意差は見られなかった。空腹時血糖値(実験終了直前の測定値)にも有意な差はみられなかった。陽性対照群では肝障害のマーカーである血清 ALT 値が上昇し、血清 TBA が上昇した個体も出現していたが、オスでもメスでも幼若時の抗菌薬暴露による有意な影響はみられなかった。

肝臓の HE 染色標本上で、陰性コントロール群をゼロベースにして脂肪変性、小葉内炎症、Ballooning を観察して NASH の評価を行い、スコア化した。各スコアおよび合計スコアを群間で比較したところ、陽性対照群では組織標本上で肝臓への脂肪の蓄積、小葉内炎症が認められ、脂肪肝炎が起こっていることを確認したが、どのスコアについても、各種の抗菌薬暴露群と陽性対照群との群間の有意差はみられなかった。しかしながら、アンピシリン暴露群のメス 3 匹のうち 1 匹は、実験途中で体重が著しく減少したため 24 週齢で安楽死させた(この時点で、血清 ALT 値: 131 IU/ml ; TBA 値 62  $\mu$ mol/L)。

##### ( 2 ) 出生～満 3 週齢(離乳完了)の抗菌薬投与が NASH に及ぼす影響(D12336N diet)

D12336 を与えた陽性対照群のオスのマウスでは、通常食 MF 群に比べて体重増加が抑制され精巣周囲脂肪組織の重量も少なかったが、肝臓の重量は増加していた。空腹時血糖値の上昇はみられなかったが、血清 ALT 値および TBA 値も上昇していた。オスについて群間の比較を行ったところ、幼若時の抗菌薬暴露による有意な影響はみられなかった。メスの陽性対照群マウスでは、通常食群と比べて体重の増加は同等であったが、肝臓の重量、血清 ALT 値および TBA 値が有意に上昇していた。メスについても群間の比較を行ったところ、バンコマイシン暴露群で血清 ALT 値が陽性対照群に比べて有意に高かった以外は、幼若時の抗菌薬暴露による有意な影響はみられなかった。

肝臓の HE 染色標本上で NASH の評価を行った結果、陽性対照群では組織標本上で肝臓への脂肪の蓄積、小葉内炎症が認められ、脂肪肝炎が起こっていることを確認した。D12336 に添加されているコール酸濃度(0.5%)でもマウスでは毒性が現れやすいことを考慮に入れて、血管周

困の炎症巣を外して観察を行い、抗菌薬暴露の影響を評価した。どの評価項目についても、陽性対照群と抗菌薬暴露群との群間の有意差はみられなかった。

なお、アンピシリン暴露群のオス4匹のうち1匹は、実験途中で体重が著しく減少したため11週齢で安楽死させた（この時点で、肝臓重量0.8g、血清ALT値：4710 IU/ml；TBA値3070  $\mu$ mol/L）。また、ポリミキシンB暴露群のメス6匹のうち1匹は、実験途中で体重が著しく減少したため13週齢で安楽死させた（この時点で、肝臓重量1.1g、血清ALT値：1710 IU/ml；TBA値3580  $\mu$ mol/L）。

### （3）出生～離乳完了（満3週齢）の抗菌薬投与が腸内環境に及ぼす影響

抗菌薬暴露の終了した仔マウスの4週令の時点での便のグラム染色像では、抗菌薬なし群の個体に比べて、バンコマイシン投与群ではグラム陽性菌が減少、ポリミキシン投与群ではグラム陰性菌が減少、アンピシリン投与群では全菌数が減少する傾向がみられた。雌雄の間で抗菌薬の影響の出方に顕著な差は見られなかった。

D12079B diet 摂取群について、長嶋らのT-RFLP法によりマウスの経時的な腸内菌叢の変化を調べた。アンピシリン暴露群では、4週令時の総菌量が少なく8週齢では増加していた。同暴露群内で比べると、早期に安楽死に至った個体では、4および8週令時の菌叢構成が他個体とは異なっており、*Clostridiales*目や *Proteobacteria*門に相当するTRFピークの比率が高かった。さらに、高脂肪食摂取により一般に増加する *Erysipelotrichiales*目に相当するT-RFが増加せず、*Clostridiales*目や *Proteobacteria*門に相当するT-RFピークの比率が高いままであった。マウス個体数を増やして、代謝産物も含めた詳細な解析が必要であるが、幼若期の抗菌薬暴露による菌叢形成過程への介入が成長後の腸内環境の安定性に影響し、高脂肪食による腸内環境の悪化を通して、著しい重症化を引き起こしているものと考えている。

マウスの場合は離乳が完了した4週齢以降に大きな菌叢の変化が起こり、偏性嫌気性グラム陰性桿菌の集団が出現することが報告されている（Kibe R et al., 2004）。我々の先の研究（平成27～29年度科研報告書）では、8週齢から高脂肪高シヨ糖食を与えたマウスでは血清中のバイオマーカーや肝臓内脂質量の個体差が大きく、肝障害関連マーカーが増加しない非肥満個体が存在した。一方、菌叢がまだ安定しない時期の4週齢から実験食を開始したマウスでは、腸内菌叢が食餌による影響を容易に受けて通常食群とは大きく異なる菌叢へと変化していた。この実験の通常食摂取マウスの腸内菌叢の特徴は、ゲノムの比較解析から腸管の健康やdysbiosisなどとの関連が示唆されている偏性嫌気性グラム陰性桿菌 *Bacteroidales* family S24-7 (Ormerod KL et al., 2016) が高い存在比率で含まれていることだった。

抗菌薬アンピシリンについては、その一時的な投与によって菌叢中のほぼ全菌が抑制されるが完全消失ではないこと、抗菌薬中止の後に腸内菌の再定着が起こるが無処理マウスに匹敵する複雑な菌叢を再獲得することはなく、腸内環境もそれを反映したものになる、と報告されている（Castro-Mejia JL et al., 2018）。本研究では、出生直後から3週齢までの幼若期に抗菌薬暴露の介入を行ったが、菌叢形成の攪乱によって特定の腸内菌の定着が阻害されると、8週齢からの特殊飼料開始後の腸内環境がNASHをより促進してしまうものになるのかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kataoka Keiko, Nemoto Hideyuki, Sakurai Akiko, Yasutomo Koji, Shikanai Masataka	4. 巻 78
2. 論文標題 Preventive effect of fermented brown rice and rice bran on spontaneous type 1 diabetes in NOD female mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Functional Foods	6. 最初と最後の頁 104356 ~ 104356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jff.2021.104356	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田修己、田中莉乃、東野乃、櫻井明子、片岡佳子
2. 発表標題 NASHモデルマウスにおける離乳期までの時期の抗菌薬暴露が腸内環境に及ぼす影響
3. 学会等名 第45回徳島県医学検査学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東野乃、田中莉乃、松田修己、櫻井明子、片岡佳子
2. 発表標題 高脂肪特殊飼料摂取におけるNASHモデルマウス肝臓組織の線維化の検討
3. 学会等名 第45回徳島県医学検査学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田修己、田中莉乃、東野乃、櫻井明子、片岡佳子
2. 発表標題 NASHモデルマウスにおける幼若期の抗菌薬暴露が腸内環境に及ぼす影響
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋笠未有、竹元結麻、藤本望、村田梨菜、櫻井明子、片岡佳子
2. 発表標題 NASHモデルマウスにおける離乳までの時期の抗菌薬暴露の影響について
3. 学会等名 第44回徳島県医学検査学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本望、樋笠未有、櫻井明子、片岡佳子
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスにおける幼若期の抗菌薬暴露の影響
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021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	櫻井 明子  (SAKURAI Akiiko)  (70707900)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教   (16101)	

	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 協力者	藤本 望  (FUJIMOTO Nozomi)		

#### 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
---------	---------