

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09101

研究課題名（和文）腸内細菌叢メタゲノム解析による閉塞性黄疸に伴う肝再生障害改善療法の開発

研究課題名（英文）Development of therapy for improving liver regeneration disorders associated with obstructive jaundice through intestinal microbiota metagenome analysis

研究代表者

清水 明 (Shimizu, Akira)

信州大学・学術研究院医学系（医学部附属病院）・准教授

研究者番号：00447773

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）：閉塞性黄疸に伴う胆汁鬱滞など、腸肝循環に劇的な変化をもたらす病態では腸内細菌叢に乱れが起こり、肝再生能力も障害されるという仮説に基づき、以下の研究を行った。総胆管結紮による胆汁鬱滞モデルを作製し、コントロールモデルと腸内細菌叢多様性の比較を行った。その結果、胆汁鬱滞モデルのDay4の多様性に差を認めたものの、コントロールと胆汁鬱滞モデルの各タイムポイントの多様性に有意な変化を確認することはできなかった。また、コントロールモデルならびに胆汁鬱滞モデルにそれぞれ80%肝切除を付加したモデルを作製、術後2日目ににおける残肝重量/全肝重量比を比較したところ、想定したよりも著明な差は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆汁鬱滞という腸肝循環に大きな変化と影響を及ぼす病態における腸内細菌叢の変化について、その一端を明らかにすることができたが、コントロールと比較して著明な細菌叢変化を生じている証拠を明らかにすることはできず、また肝再生抑制効果に関しても検証は不十分であり、今後の課題と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Based on the hypothesis that obstructive jaundice with biliary stasis, which causes dramatic changes in the enterohepatic circulation, disrupts the gut microbiota and impairs liver regeneration capacity, we conducted the following study. We created a biliary stasis model using common bile duct ligation and compared the gut microbiota diversity with a control model. As a result, while a difference in alpha diversity was observed on Day 4 in the biliary stasis model, no significant changes in beta diversity were confirmed at each time point between the control and biliary stasis models. Additionally, models with 80% hepatectomy added to both the control and biliary stasis models were created. When comparing the ratio of remnant liver weight to total liver weight on postoperative day 2, no significant difference was observed as initially expected.

研究分野：消化器外科

キーワード：腸内細菌叢 胆汁鬱滞モデル 肝切除

1. 研究開始当初の背景

種々の肝胆道疾患に対する肝切除・肝移植などの外科的治療の殆どは、病的背景肝あるいはグラフト肝の速やかな再生を期待して治療が行われている。しかしながら期待した肝再生が起こらない場合（実際の肝再生能力が想定値を下回る場合）、治療の結果、肝不全を惹起し生命予後に重大な影響を与えることがある。従って、肝胆道疾患治療において、肝再生現象は治療の成否を司る critical point と言っても過言ではない。肝再生は、慢性肝炎や肝硬変などの肝細胞障害のみでなく、胆汁鬱滞や脂肪肝、糖尿病、加齢といった種々の病態や体内環境により負の影響を受けることが知られている。さらに近年では、胆汁酸代謝は腸内細菌叢によって影響を受けること¹⁾、胆汁酸が肝再生に関与すること²⁾、胆汁酸の腸管循環障害が肝再生を抑制すること³⁾、さらには腸内細菌叢が肝再生シグナルの活性化に関与すること⁴⁾などが報告されている。我々の腸管内には数百種類以上、およそ 100 兆個にも及ぶ腸内細菌が生息しており、これは地球環境上で最も高密度に微生物が生息する環境である。腸内細菌の集団を腸内細菌叢と呼ぶ。腸内細菌叢は宿主の食事、消化液の量や質などの腸内化合物組成に応じてその構成を最適化すると共に、腸内細菌叢で産生された代謝物質が逆に宿主の生体機能に影響を与えるなど宿主とのクロストークを形成し、生体のホメオスタシス維持に重要な役割を果たしていることが知られている。また近年、メタゲノム解析というサンプルに含まれる細菌叢 DNA を直接抽出して系統組成ならびに機能組成を解析する手法が開発され注目されている（図 2）。閉塞性黄疸に伴う胆汁鬱滞など、腸肝循環に劇的な変化をもたらす病態では、腸内細菌叢にもバランスの乱れが起こり、肝再生能力も障害されている可能性が極めて高いと考えられるが、その機序は不明であり、これまで腸内細菌叢メタゲノム解析と肝再生の関係につき明らかにした研究はない。さらに胆道ドレナージや胆汁還元、さらにはシンバイオティクスといった腸肝循環や腸内環境に大きな影響をもたらす治療が腸内細菌叢にいかなる変化を与えるのかも全く知られていない。

2. 研究の目的

我々は、腸内細菌叢と肝再生能力との関連に着目し、胆汁鬱滞ラットモデルを用いた腸内細菌叢解析、80%肝切除付加胆汁鬱滞ラットモデルにおける腸内細菌叢変化と肝再生能力改善効果を確認し、そこから得られた知見を元に、閉塞性黄疸・胆汁鬱滞肝に対して有効な肝再生促進治療法の開発を行い、その効果を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

閉塞性黄疸では腸内細菌叢の乱れが生じ、肝再生が阻害されるのではないかと、また腸内細菌移植・シンバイオティクスなどの腸内環境回復治療により肝再生能力が改善するのではないかと、という作業仮説を証明するために、以下のような実験系を構築した。

1. 胆汁鬱滞モデルラットにおける腸内細菌叢解析

F344/NS1c ラット雄 8 週齢を使用。総胆管を結紮し胆汁鬱滞モデルを作製。血液検査ならびに肝組織検査を行い閉塞性黄疸が生じていることを確認。糞便を採取し、糞便から DNA を抽出。抽出した DNA 中に含まれる真正細菌由来 16S rRNA 遺伝子の可変領域 V1-V2 を、アダプター配列をつけた PAD-Linker-27F プライマー、および Golay barcode-PAD-Linker-338R プライマーを用いて PCR 法により増幅する。増幅産物を精製後、アンプリコンプールを作成し、MiSeq (illumina) を用いてシーケンシングを行い、得られたリード情報を用いて、遺伝子解析ソフト QIIME による微生物群集構造解析を行う。

2. 胆汁鬱滞モデルラットにおける肝再生抑制効果と腸内細菌叢との関連の検証ならびに腸内細菌叢移植・シンバイオティクスによる肝再生促進効果の検証

胆汁鬱滞モデルラットに腸内細菌を正常化する最小単位モデルである 8 種類の細菌で構成された腸内細菌カクテル (ASF, Altered Schaedler Flora) を移植する。(A) 前処置 (72 時間経口抗生物質: 1.125g アスペルテーム + 0.3g ネオマイシン + 0.15g バンコマイシン + 300ml 滅菌水から 12 時間 10%ポリエチレングリコールに切り替え) の後移植。(B) 前処置なしで移植。移植 1 週間後に血液生化学検査、腸内細菌叢解析ののち、ASF 移植群と無処置群に対して 80%肝切除を付加し、術後 1 週間における生存率、残肝重量増大率、Ki67 labeling index を評価、ASF 移植による肝再生能改善効果を検証する。胆汁鬱滞モデルラットに *Clostridium butyricum* ならびにラクツロース投与を術前 1 週間行い、同様の手法で血液生化学検査、組織学的検査、腸内細菌叢解析

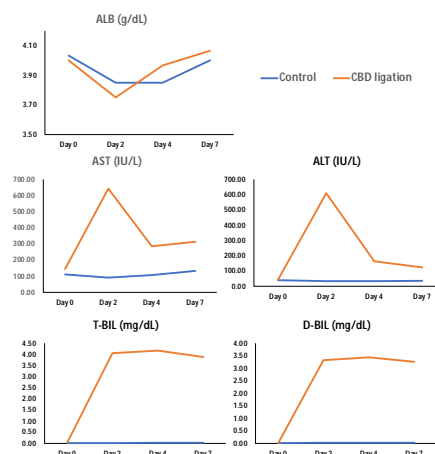


図 1 胆汁鬱滞モデル血液検査結果

を行い、肝切除を付加したのち肝再生改善効果を検証、ASF 移植とも比較検討する。

4. 研究成果

1. 胆汁鬱滞モデルラットにおける腸内細菌叢解析
 総胆管を結紮し、胆汁鬱滞モデルを作製。血液検査にて、術後2日目以降遷延する血清総ビリルビン値の上昇を認め、閉塞性黄疸が確実に生じていることを確認した(図1)。

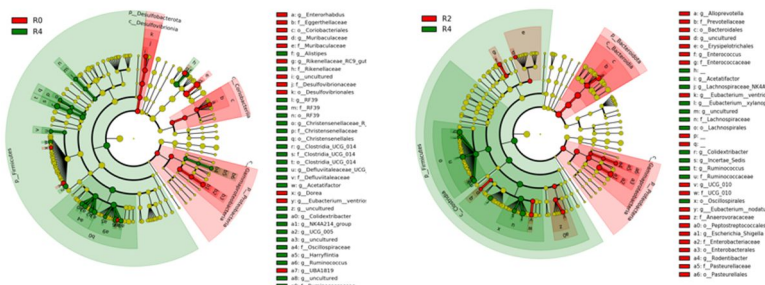


図2 Lefse 解析 (Day0 vs 4) 図3 Lefse 解析 (Day2 vs 4)

続いて、胆汁鬱滞モデルにおける、術直前 (Day 0) と術後各 1, 2, 4 日目 (Day 1, 2, 4) に糞便を採取し、Lefse 解析による群間最近組成比較を行った。Day 0 vs Day 4, ならびに Day 2 vs Day 4 の Lefse 解析の結果(Cladogram) を図 2, 3 に示す。Day 0, 2, 4 の各タイムポイントにおける検出細菌相には、level6 (属レベル) において変化が生じていることが示唆された。

一方、コントロールモデル、胆汁鬱滞モデルにおける多様性ならびに各タイムポイントにおける多様性を検討したところ、胆管結紮モデルの Day 0 と Day 4 の多様性に差を認めたものの、コントロールモデルと胆汁鬱滞モデルとの間に多様性の変化は認められず、総胆管結紮に伴う胆汁鬱滞で腸内細菌叢が大きく変化しているとは言えない結果であった(図4)。

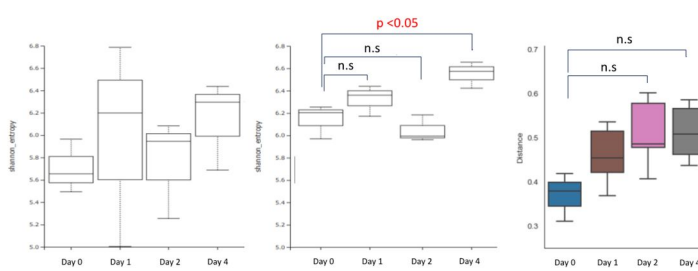


図4 多様性ならびに多様性の検証

また、コントロールモデルならびに胆汁鬱滞モデルに対して介入から5日目に60%肝切除を付加したモデルを作製し、術後2日で残肝重量を測定し、胆汁鬱滞が残肝再生に及ぼす影響を確認した。仮説上は、胆汁鬱滞モデルでは残肝再生が著明に抑制され、術後2日の残肝/全肝重量比 (FLR/Total liver 比) が有意に低下するはずであったが、両群を比較したところ、胆汁鬱滞モデルでは残肝重量が軽量である傾向は認められたが統計学的有意差までには到達しなかった(図5)。

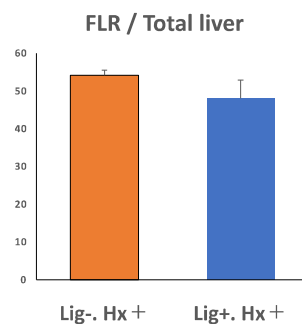


図5 残肝/全肝重量比

前述の腸内細菌叢多様性評価結果ならびに胆汁鬱滞モデルとコントロールモデルとの残肝容積増大率の差が乏しいことから、その後の細菌叢移植やシンバイオティクスによる残肝再生促進効果(抑制効果の消失)を検証するには適切なモデルではないと考えられた。

以上の結果から、胆管結紮による胆汁鬱滞モデルでは、腸内細菌叢の変化はある程度生じているものの、多様性の観点から細菌叢の著明な変化をもたらすには至らず、また腸内細菌叢変化に伴う肝再生抑制(促進)効果を検証するには別のモデルと解析手法をさらに検討する必要がある、今後の課題と考えられた。

【引用文献】

1. Adolph TE, et al. Trends Immunol. 2018 Sep;39(9):712-723.
2. Huang W, et al. Science. 2006 Apr 14;312(5771):233-6
3. Ueda J, et al. Surgery. 2002 May;131(5):564-573.
4. Liu HX, et al. J Hepatol. 2016 Mar;64(3):641-650.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 増尾仁志, 清水明, 生井楓, 副島雄二	4. 巻 44
2. 論文標題 腸内細菌は閉塞性黄疸により影響されるのか	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 胆と脾	6. 最初と最後の頁 223-227
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 無
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
研究分担者	副島 雄二 (Soejima Yuji) (30325526)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	
研究分担者	安川 紘矢 (Yasukawa Koya) (30868071)	信州大学・医学部・特任助教 (13601)	
研究分担者	野竹 剛 (Notake Tsuyoshi) (40645511)	信州大学・学術研究院医学系 (医学部附属病院)・助教 (13601)	

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