

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460810

研究課題名(和文) プロバイオティクスと肝発癌予防

研究課題名(英文) Probiotics and prevention of hepatocarcinogenesis

研究代表者

渡辺 哲 (WATANABE, Tetsu)

東海大学・医学部・客員教授

研究者番号：10129744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食(HF)摂取マウスにおける酪酸菌(CBM)の脂肪肝予防効果を検討した。12週後にはHF群では脂肪肝がみられたが、HF+CBM群では肝への脂肪沈着が著明に抑制された。肝臓の代謝産物の解析(メタボローム)では、肝での脂質代謝の亢進はみられなかった。糞便中の中性脂肪はHF群とHF+CBM群で差がなかった。盲腸の腸内叢細菌の解析では、HF+CBM群ではClostridiumが増加し、C. butyricum(酪酸菌)が関与する酪酸性遺伝子が増加した。肝臓でのマイクロアレイ解析とリアルタイムPCRの結果より、酪酸菌投与による脂肪肝抑制は、肝臓での脂肪の吸収阻害を介する事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the preventive effects of Clostridium butyricum (CBM) on the high fat diet (HF)-induced fatty liver. While the lipid droplets accumulation was prominent in the liver of HF group after 12 weeks treatment, less lipid droplets were observed in the liver of HF+CBM group. Metabolomics measurements revealed no activation of lipid metabolism. Fecal triglycerides (TG) concentration was significantly increased in the HF group compared to that of control group. The fecal TG concentration in the HF+CBM group was almost same as that of the HF group. The analysis of 16S rRNA in the cecal content by sequencer revealed the increase of Clostridium in the HF+CBM group. Moreover, the activation of transcription of butyrate kinase indicates the direct participation of CBM in the production of butyric acid in the HF+CBM group. The results of micro array analysis and real time PCR indicate that the CBM administration inhibits fatty acid uptake in the liver.

研究分野：肝臓病学

キーワード：NASH 腸内細菌叢 酪酸菌 高脂肪食

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年我が国では健診受診者の 20~30% は肝機能異常を有し、その頻度が年々増加していることが報告されている。職場健診においてみられる肝機能障害者の多くは腹部エコーや CT で脂肪肝と診断される。脂肪肝はアルコール性と非アルコール性に分けられるが、多くは非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) であり、メタボリックシンドロームの肝での表現型とされている。NAFLD は、さらに非アルコール性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver; NAFL) と、非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) とに分類される。一般に NAFL は良性疾患と考えられるが、NASH では肝に持続性の炎症がおり、肝線維化とともに肝硬変に進行し、最終的には肝細胞癌に進行する可能性がある。

NAFLD はわが国のみならず、米国を初め先進国での増加が問題となっており、米国での国民の約 30% に NAFLD が見られると報告され、先進国では最も多くみられる肝疾患である。

(2) 腸内細菌叢が NAFLD の発症に関与していることは、NAFLD のマウスの便をコントロールマウスに移植することにより、肥満だけではなく、NAFLD も誘導されることより強く示唆される。多くの NAFLD の患者では肥満やインスリン抵抗性がみられ、腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) を伴う。増加したグラム陰性菌が産生するエンドトキシンが門脈を介して肝臓に流入し、持続的な炎症を引き起こすとされる。

(3) 酪酸は、腸内細菌により食物繊維から腸管内で産生される短鎖脂肪酸の一種で、大腸粘膜栄養素として消費される。酪酸にはその他抗炎症作用や、免疫調整作用、インスリン抵抗性改善作用などが報告されている。また、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用が有り、様々な遺伝子の発現を調整している。我々は、すでにラットの NASH モデルであるコリン欠乏食投与ラットにおいて、酪酸菌投与が NASH の進展の阻止することを明らかにした。

2. 研究の目的

(1) 無菌マウスに酪酸菌を接種し、肝臓や腸管での代謝に及ぼす影響を明らかにする。

(2) 高脂肪食投与マウスを用い、酪酸産生菌 MIYAIRI588 (CBM; 酪酸菌) による脂肪肝阻止効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) 動物実験: 無菌の C57BL/6 (雄) を購入し、アイソレーター中で germ free の状態で飼育した。全体を 4 群に分け (各群 5 匹ずつ)、

germ free (GF) 群、酪酸菌接種群 (CMB)、乳酸菌 (ラクトバチルスアシドフィリス、LA) 接種群、通常飼育 (CV) 群とした。菌を接種後 2 週間目にマウスを解剖し、肝臓、盲腸内容物、血液を採取した。

6 週齢の C57/BL6 マウスをコントロール群 (LF)、高脂肪食投与群 (HF)、高脂肪食 + 酪酸菌投与群 (HF+CBM) の 3 群に分け、13 週齢まで飼育した。その時点でマウスを解剖し、解析に用いた。CBM は餌に 9.0×10^7 cfu/g の割合で添加した。

(2) 組織学的検討: それぞれの群より採取した肝組織は、HE 染色、アザン・マロリー染色、Oil-red O 染色を行った。

(3) 肝組織中の脂肪測定: 肝臓より FOLCH 方により脂質を抽出し、酵素法で総コレステロール、中性脂肪、遊離型コレステロール、リン脂質を測定した。

(4) 糞便中の脂肪測定: 糞便中の中性脂肪量は、市販のキットを用いて行った。

(5) メタボローム解析: 肝臓、盲腸内容物のメタボローム解析を行った。解析は CE-TOFMS (イオン性代謝物質)、LC-TOFMS (脂溶性代謝物質) を用い、ヒューマン・メタボローム・テクノロジー社で行った。

(6) マイクロアレイ解析: 肝臓、回腸末端、骨格筋より RNA を抽出し、マウスの約 3 万の遺伝子発現について Agilent の Sure Scan マイクロアレイスキャナを用いて検討した。

(7) 腸内菌叢の解析: 盲腸内容物より DNA を抽出し、DNA 次世代シーケンサーによる 16S rRNA 解析を行った。また、酪酸産生遺伝子の定量も行った。

(8) 胆汁酸分析: 血清、肝臓、盲腸内容物、糞便について胆汁酸の分析を行った。

4. 研究成果

(1) 無菌マウスにおける酪酸菌接種の影響: 酪酸菌接種 2 週後の体重は、4 群間で差はなかった。無菌およびノトバイオマウスの盲腸内容物の短鎖脂肪酸を測定した結果、酪酸、酢酸、プロピオン酸などは CBM 群で増加し、乳酸は LA 群で増加していた。代謝産物の主成分分析の結果、GF 群と LA 群は類似した傾向を示し、CBM 群と CV 群は各々異なった分布を示した。さらに、GF 群および LA 群に比べ CBM 群での検出量が多かった成分には、タウロコール酸の脱抱合産物 (Cholic acid, Taurine) やポリアミン類 (Putrescine, Spermine, Spermidine) 等が含まれていた。2 群間の比較では、CBM 投与群では GF 投与群に比べ有意にアシルカルニチンである

AC(16:2)やPalmitoylcarnitineが高値であり、特にAC(16:2)はLA群と比較しても有意に高値であった。

(2) 高脂肪食投与マウスにおける酪酸菌の脂肪肝抑制効果：HF群ではコントロール群と比べ体重が増加し、HF+CBM群も同様に増加した。しかし、肝重量の増加はHF群と比べ有意に抑制された。HF群とHF+CBM群では餌の摂取量には差がなかった(図1)。

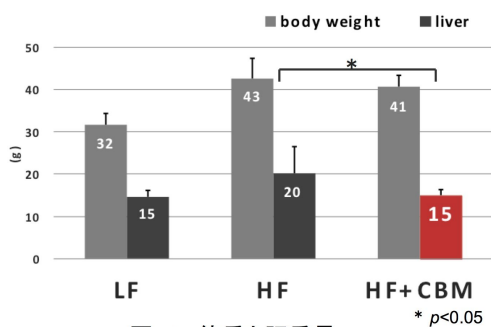


図1 体重と肝重量

肝臓の脂肪染色では、HF群に比べHF+CBM群では著明に脂肪沈着が抑制された(図2)。肝臓の脂質の測定でも、総コレステロールや中性脂肪がHF群ではLF群と比べ有意に増加し、HF+CBM群では有意に減少し、LF群と大差なかった(図3)。

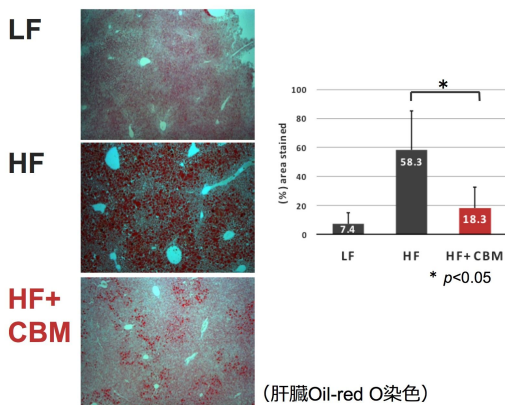


図2 肝臓の脂肪染色

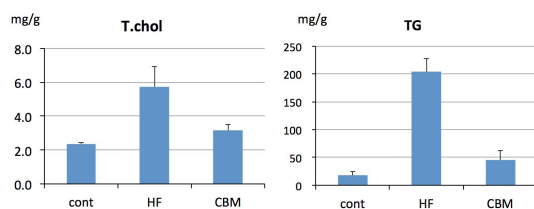


図3 肝臓中の脂質

(3) 糞便中の脂肪量：糞便中の中性脂肪量をキットを用いて検討した。糞便1g当たりの中性脂肪量は、LF群0.52g、HF群12.24g、HF+CBM群2.35gとLF群に比べHF群で

は有意に増加していた。HF群とHF+CBM群では差はみられなかった(図4)。

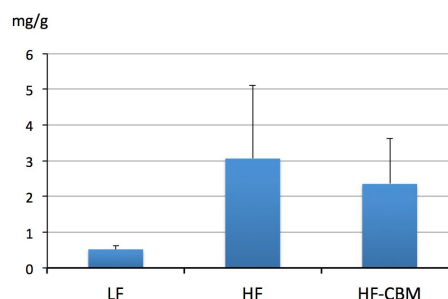


図4 糞便中の中性脂肪量

(4) メタボローム解析：メタボローム解析では、盲腸内容物で脂肪酸がHFで増加し、HF+CBMではさらに増加した。また、肝発癌と関連するとされる二次胆汁酸のDeoxycholic acidがHF群で増加し、HF+CBM群では有意に抑制された(図5)。

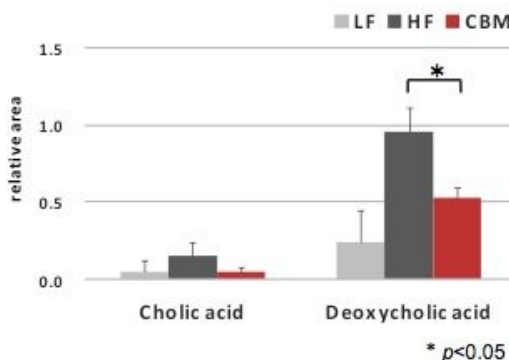


図5 腸管内の二次胆汁酸

肝臓では、HF群とHF+CBM群との間で、解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸経路、尿素回路、プリン・ピリミジン代謝、補酵素代謝、各種アミノ酸代謝、アシルカルニチン及び脂肪酸に分類し検討したが、有意に差があるものはみられなかった。

(5) マイクロアレイ解析：肝臓、筋肉、回腸での遺伝子発現を網羅的に解析した。HF群とLF群で有意に差があり、HF群とHF+CBM群で有意に差がみられる遺伝子に着目した。肝臓においては、HF群でType Iコラーゲン遺伝子とMMP-12遺伝子の発現が増加し、HF+CBM群ではどちらも有意に減少した。これらの現象は、CBM投与による肝における肝線維化の抑制や炎症反応の抑制(MMP-12はマクロファージより産生される慢性炎症に関与するとされている)を示している。筋肉では、HF群で低下した3アドレナリン受容体の遺伝子発現がCBM群で増加していた。

(6) 腸内叢細菌の解析：腸内細菌叢の解析では、門レベル、科レベルではHF群と

HF+CBM 群で大きな差は見られなかったため、属レベルの比較を行った。属レベルの比較では、HF 群と CBM 群に特徴的な違いが認められた。*Clostridiaceae* に属する *Clostridium* 属と属未定のグループが HF 群に比べ CBM 群で有意に増えていた(図 6)。

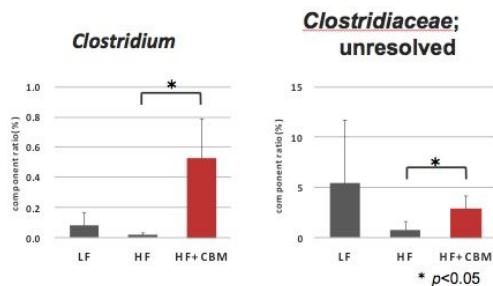


図 6 属レベルではCBM群では*Clostridium*が増加

盲腸のメタボローム解析で酪酸の増加が認められたので、次にこの増加が投与した酪酸菌によるものか否かを検討した。酪酸産生遺伝子は、butyryl CoA:acetate CoA-transferase (but)と butyrate kinase (buk)の 2 種類が存在する。さらに but は *Faecalibacterium prausnitzii* (プラウスニツツィ)を主な種とするグループと *Roseburia*を主なグループとする 2 グループ存在する。本試験で用いた CBM は、こちらの buk 遺伝子を有している。そこでこの 3 グループについて定量的 PCR で定量した。but 遺伝子は 3 群間で差が見られなかった。一方、Buk 遺伝子は、CBM 群でのみ検出された(図 7)。

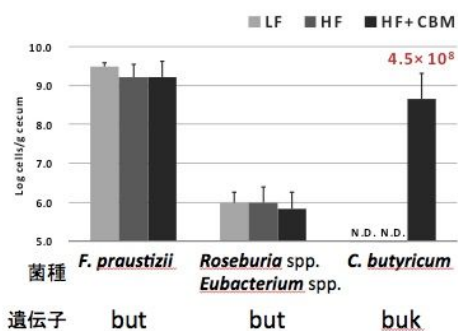


図 7 酪酸菌群ではbuk(butyrate kinase)遺伝子が増加

この buk 遺伝子が、CBM であるのかを確認するために、CBM 特異的なプライマーを用いて菌数を比較した。この結果、HF 群で見られる酪酸は、but 遺伝子を有する菌によるものであるが、CBM 群で増加した酪酸は、CBM そのものが産生したものであると推定された。

(7)胆汁酸の測定：肝臓、血液、腸管、糞便について各種胆汁酸を測定した。測定した項目は、TBA, TCA, CA, TCDC, CDCA, TUDCA, UDCA, TDCA, DCA, THCA, T- α -MCA, α -MCA, T- β -MCA, β -MCA, T- ω -MCA, ω -MCA, THDCA, HDCA である。いずれのサンプルにおいて、3 群間には有意差は見られなかった。

我々は、人の腸管で発見され、酪酸を産生するグラム陽性桿菌である *Clostridium butyricum* (MIYAIRI-588) が、ラットの NASH モデル(コリン欠乏食で作成)においてその進行を阻止し、最終的に肝細胞癌の発生も抑制することを見いだした(PLoS One 8 (5):e63388, 2013)。MIYAIRI-588 投与により、コリン欠乏食で著明となる肝臓の脂肪沈着が抑制され、インスリン抵抗性の改善と門脈のエンドトキシン濃度の低下が見られた。また、腸管でのタイトジャンクションの回復と肝臓での酸化ストレスや炎症が抑制された。さらに肝臓では AMPK や AKT の活性化と nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) の発現が増加し、その標的となる抗酸化に作用する酵素群が誘導された。この研究では、脂肪肝抑制として、CBM 投与によりコリン欠乏食で増加した脂肪産生関連蛋白の低下による事が認められた。

今回の研究でも高脂肪食投与で誘導される肝での脂肪沈着が、CBM 投与で著明に抑制されたが、その機序として、肝臓における脂肪の吸収阻害が示唆された。この事は、肝臓におけるメタボローム解析で脂肪代謝に関する代謝産物に変化がなく、分解系の亢進がみられない事による。さらに、糞便中の中性脂肪量が、HF 群と HF+CBM 群で差がないことより、腸管での吸収阻害ではなく、肝臓での吸収阻害が示唆される。Real-time PCR で脂肪の代謝関連の遺伝子発現を検討したところ、Cyp4A14 と CD36 が HF 群で増加し、HF+CBM で低下した。最近の研究では、どちらも脂肪肝で上昇するが、Cyp4A14 の下流で CD36 が活性化されると考えられている。CD36 は脂肪の取り込みを促進するとされており、HF+CBM 群で発現が低下することより、CBM による脂肪肝抑制効果の一部は、肝での脂肪の吸収阻害によるものと考えられる。今回の研究では、HF 群では盲腸内の酪酸が減少し、HF+CBM 群では LF 群と同じレベルまで回復したが、その増加した酪酸は投与した CBM が産生したものであることが判明した。酪酸には他抗炎症作用や、免疫調整作用、インスリン抵抗性改善作用、筋肉増強作用などが報告されているが、さらにヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用が有り、種々の遺伝子発現の調整を行う。CBM 投与による

CypA14 や CD36 の発現調整の機序の解明のため、今後さらに研究が必要である。

引用文献

Le Roy T, Liopis M, Lepage P, et al:
Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. Gut 62, 2013, 1787-1794

Farhadi A, Gundlapalli S, Shaikh M, et al:
Susceptibility to gut leakiness: a possible mechanism for endotoxaemia in non-alcoholic steatohepatitis. Liver Int 28, 2008,1026-1033

Seki E, Brenner DA. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. Hepatology 48, 2008, 322-335

Endo H, Niioka M, Kobayashi N. et al:
Butyrate-producing probiotics reduce nonalcoholic fatty liver disease regression in rats: New insight into the probiotics for the gut-liver axis. PLoS One 8 (5), 2013, e63388

Zhang X, Li S, Zhou Y, et al: Ablation of cytochrome P450 omega-hydroxylase 4A14 gene attenuates hepatic steatosis and fibrosis. Proc Natl Acad Sci USA 114, 2017, 3181-3185

5 . 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

渡辺 哲、腸内細菌と肝疾患、成人病と生活習慣病、査読無 2015 年、45 (12)、1518-1522

Akira T. Kawaguchi, Hitoshi Endo, Hiroyuki Aikawa, Mariko Yamano, Yo Kawaguchi, Munetaka Haida, Tetsu Watanabe. Effects of Liposome-Encapsulated Hemoglobin on Learning Ability in Tokai High-Avoider Rat After Total Brain Ischemia and Reperfusion. Artificial Organs 査読有 38(8), 2014, 667-674

〔学会発表〕(計4件)

小林典子、田中 守、加川建弘、渡辺 哲、高脂肪食摂取マウスの腸内細菌に対する酪酸菌の影響、第 47 回日本消化吸収学会総会、2016 年 11 月 26 日、神戸ポートピアホテル(兵庫県、神戸市)

Hiroyuki Furuya, Masayuki Tatemichi, Tetsu Watanabe. Survey on hepatitis screening and workplace conditions with hepatitis in Japanese workplace. The 48th Asia-Pacific Academic Consortium for Public Health, Sep 18, 2016, Teikyo University (Itabashi-ku, Tokyo)

古屋博行、立道昌幸、渡辺 哲、神奈川県内の事業者を対象とした肝炎ウイルス検査と肝炎に関する啓発活動に関する調査、第 61 回神奈川県公衆衛生学会、2015 年 10 月 23 日、神奈川県総合医療会館(神奈川県、横浜市)

小林典子、田中 守、遠藤 整、渡辺 哲、酪酸菌が関与する代謝物質とその生理機能、第 46 回日本消化吸収学会総会、2015 年 11 月 27 日、ホテルミラコスタ(千葉県、浦安市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 哲 (WATANABE Tetsu)

東海大学・医学部・客員教授

研究者番号：10129744