

脂肪肝患者における腸内細菌叢、ならびに 腸内細菌による酪酸産生能の解析

(研究助成金 50万円)

東海大学医学部内科学系消化器内科 教授 加川 建 弘

[1986年 慶應義塾大学医学部卒業]

共同研究者 東海大学医学部内科学系消化器内科・助教 広瀬 俊 治
東海大学医学部内科学系消化器内科・助教 鶴谷 康 太

〔助成応募書〕

研究目的

脂肪肝はメタボリック症候群の肝における表現型であり、食事の欧米化とともに罹患率が年々上昇している。脂肪肝の約10-20%は脂肪肝炎（NASH）と呼ばれ、肝硬変、肝臓に移行することが知られており、脂肪肝疾患に対する治療薬の開発は、健康寿命を延ばすために医学が対応すべき喫緊の課題となっている。

近年、腸内細菌が様々な疾患の発症と密接に関係していることが明らかとなってきた。中でも、肥満や糖尿病患者において、腸内細菌叢の多様性が減少していることや、特定の腸内細菌が増加していることが報告されている。また、やせたヒトの便を肥満者に移植すると、インスリン感受性が改善することから、腸内細菌が生体機能の調節に重大な役割を果たしていることは間違いないと思われる。腸内細菌が生体に及ぼす影響の中で最も注目されているのが、短鎖脂肪酸である。腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸は生体の栄養源になるだけでなく、様々なシグナルを介して、生体機能を調節している。なかでも酪酸にはエネルギー消費の増大、脂肪の β 酸化亢進を介して、メタボリック症候群を是正する働きがあることが報告されている。我々は予備実験で脂肪肝マウスに酪酸産生菌であるミヤリ菌を投与することで脂肪肝が改善されることを明らかにした。ミヤリ菌は人の腸管内で見いだされた嫌気性菌で、長年整腸剤として用いられており、安全性に問題がないことは証明されているため、将来、この菌が脂肪肝の治療、及び予防にプロバイオティクスとして使用できる可能性があると考えている。

本研究は、ミヤリ菌を脂肪肝治療に使うための予備研究として、脂肪肝疾患患者の腸内細菌叢を次世代シーケンサーで解析するとともに、腸内細菌による酪酸産生能を定量的に測定し、脂肪肝疾患における腸内細菌叢の特徴を明らかにすることを目的とする。

研究実施計画の概要

1. 対象

肝生検で組織診断をおこなった脂肪肝患者60人（単純性脂肪肝30人，NASH30人）から文書による同意を得た後，便を採取し，次世代シーケンサーで腸内細菌叢を解析する。対照として健常者60人からも同様に便を採取して解析する。

2. 方法

- ① 腸内細菌叢の解析：便から bead beating 法により DNA を抽出し，次世代シーケンサーにより V3-V4 領域のペアエンド配列のメタ 16S rRNA 遺伝子を解析し，アンプリコン解析から腸内細菌叢の分布を作成する。腸内細菌叢の多様性を健常人と比較するほか，特定の細菌が増加，あるいは減少していないか検討する。
- ② 酪酸産生能の解析：酪酸は腸内細菌が有する butyryl CoA: acetate CoA-transferase (but)，あるいは butyrate kinase (buk) により産生される。but 遺伝子は，産生する菌種により，さらに but (F) (Faecalibacterium prausnitzii [Clostridium クラスター IV] に主に存在する)，but (R) (Roseburia 属，Eubacterium 属 [Clostridium クラスター XIVa] に主に存在する) に分けられる。一方，buk 遺伝子はミヤリ菌などの Clostridium 属 (Clostridium クラスター I) に存在する。この3つの遺伝子をリアルタイム PCR にて定量的に解析し，健常人と比較する。

3. 本研究は東海大学医学部臨床研究審査委員会の承認を得ている (16R-286号)。

I 緒言

脂肪肝はメタボリック症候群の肝における表現型であり，食事の欧米化とともに罹患率が年々上昇している。脂肪肝の約10-20%は脂肪肝炎 (NASH) と呼ばれ，肝硬変，肝癌に移行することが知られており，脂肪肝疾患に対する治療薬の開発は，健康寿命を延ばすために医学が対応すべき喫緊の課題となっている。

近年，腸内細菌が様々な疾患の発症と密接に関係していることが明らかとなってきた。中でも，肥満や糖尿病患者において，腸内細菌叢の多様性が減少していることや，特定の腸内細菌が増加していることが報告されている。また，やせたヒトの便を肥満者に移植すると，インスリン感受性が改善することから，腸内細菌が生体機能の調節に重大な役割を果たしていることは間違いないと思われる。腸内細菌が生体に及ぼす影響の中で最も注目されているのが，短鎖脂肪酸である。腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸は生体の栄養源になるだけでなく，様々なシグナルを介して，生体機能を調節している。なかでも酪酸にはエネルギー消費の増大，脂肪の β 酸化亢進を介して，メタボリック症候群を是正する働きがあることが報告されている。我々は予備実験で脂肪肝マウスに酪酸産生菌であるミヤリ菌を投与すること

で脂肪肝が改善されることを明らかにした。ミヤリ菌は人の腸管内で見いだされた嫌気性菌で、長年整腸剤として用いられており、安全性に問題がないことは証明されているため、将来、この菌が脂肪肝の治療、及び予防にプロバイオティクスとして使用できる可能性があると考えている。

本研究は、ミヤリ菌を脂肪肝治療に使うための予備研究として、脂肪肝疾患患者の腸内細菌叢を次世代シーケンサーで解析するとともに、腸内細菌による酪酸産生能を定量的に測定し、脂肪肝疾患における腸内細菌叢の特徴を明らかにすることを目的とする。

II 研究方法

1. 対象

肝生検で組織診断をおこなった脂肪肝患者60人（単純性脂肪肝30人，NASH30人）から文書による同意を得た後，便を採取し，次世代シーケンサーで腸内細菌叢を解析する。対照として健常者60人からも同様に便を採取して解析する。なお，本研究は東海大学医学部臨床研究審査委員会の承認を得ている（16R-286号）。

2. 方法

- ① 腸内細菌叢の解析：便から bead beating法によりDNAを抽出し，次世代シーケンサーによりV3-V4領域のペアエンド配列のメタ16S rRNA遺伝子を解析し，アンプリコン解析から腸内細菌叢の分布を作成した。腸内細菌叢の多様性を健常人と比較するほか，特定の細菌が増加，あるいは減少していないか検討した。
- ② 酪酸産生能の解析：酪酸は腸内細菌が有する butyryl CoA:acetate CoA-transferase (but)，あるいは butyrate kinase (buk) により産生される。but 遺伝子は，産生する菌種により，さらに but (F) (Faecalibacterium prausnitzii [Clostridium クラスタ IV]) に主に存在する)，but (R) (Roseburia 属，Eubacterium 属 [Clostridium クラスタ XIVa]) に主に存在する) に分けられる。一方，buk 遺伝子はミヤリ菌などの Clostridium 属 (Clostridium クラスタ I) に存在する。この3つの遺伝子をリアルタイムPCRにて定量的に解析し，健常人と比較した。

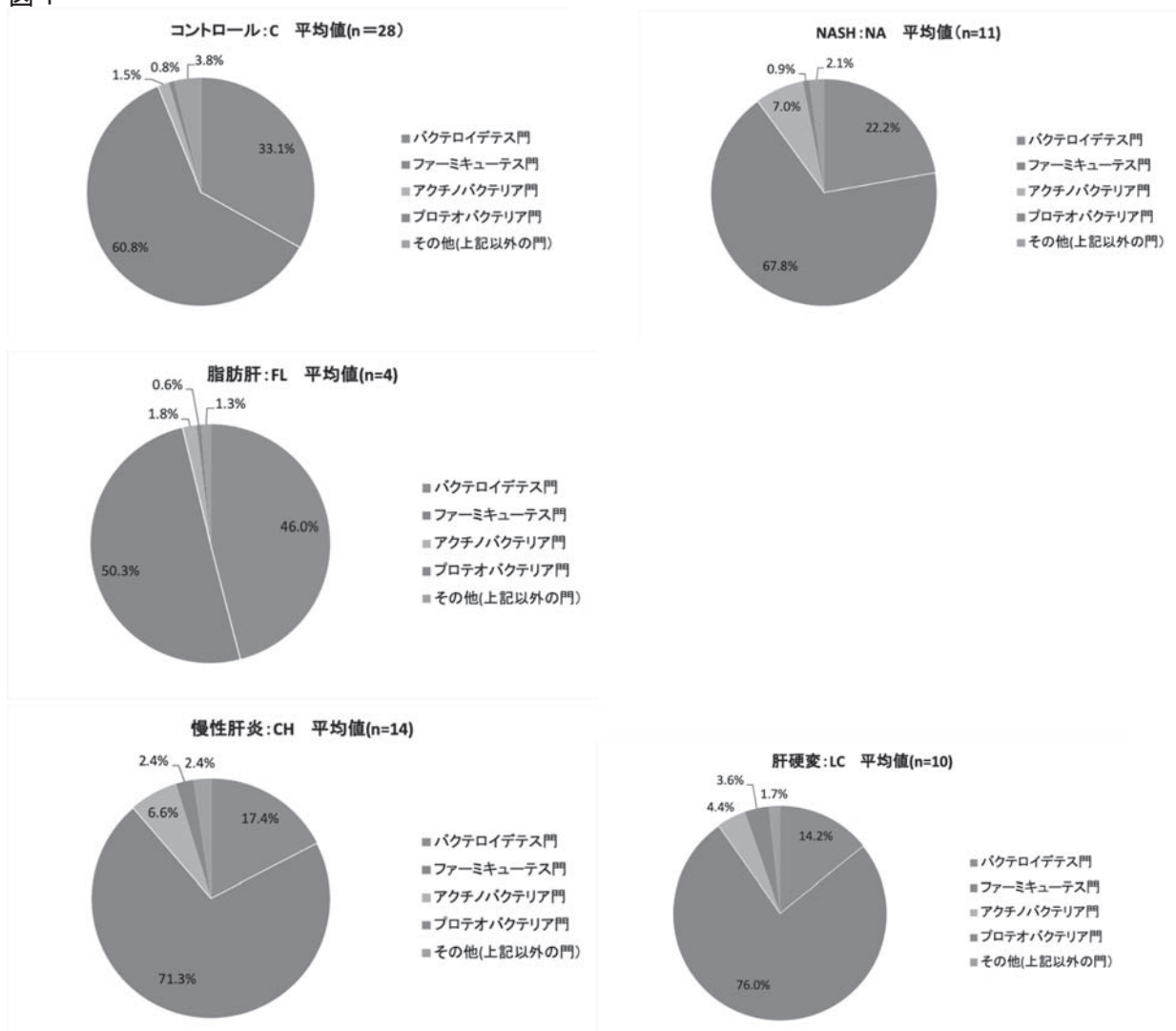
III 研究結果

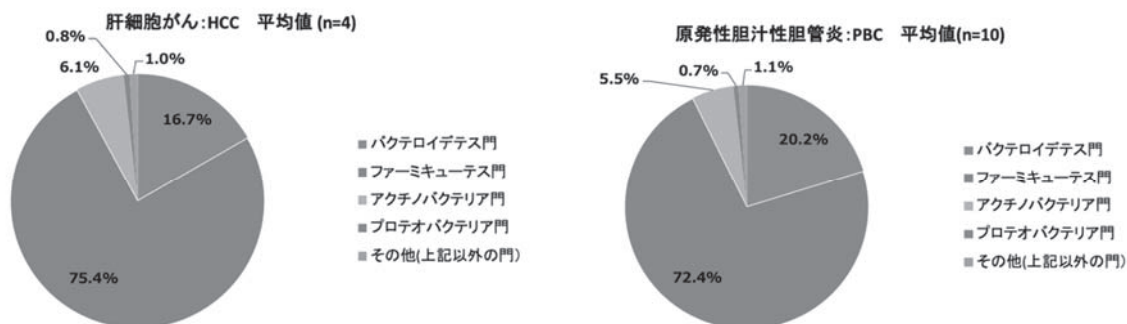
1. 各疾患群における腸内細菌叢

現在までにNASH12例，単純性脂肪肝4例の他，比較として慢性肝炎15例，肝硬変10例，原発性胆汁性胆管炎 (PBC) 11例，肝細胞癌4例，健常コントロール28例の解析を行った。健常コントロールではバクテロイデテス門が33.1%，ファーミキューテス門が60.8%，アクチノバクテリア門が1.5%，

プロテオバクテリア門が0.8%，そのほか3.8%であった（図1）。これに対し，NASH群ではバクテロイデテス門が22.2%，ファーミキューテス門が67.8%，アクチノバクテリア門が7.0%，プロテオバクテリア門が0.9%，そのほか2.1%であり，コントロールに比し，バクテロイデテス門が少なく，ファーミキューテス門が多いという結果であった。一方，単純性脂肪肝ではバクテロイデテス門が46.0%，ファーミキューテス門が50.3%，アクチノバクテリア門が1.8%，プロテオバクテリア門が0.6%，そのほか1.3%であり，バクテロイデテス門が多く，ファーミキューテス門が少なかった。一方，比較とし採取した慢性肝炎ではバクテロイデテス門が17.4%，ファーミキューテス門が71.3%，アクチノバクテリア門が6.6%，プロテオバクテリア門が2.4%，そのほか2.4%、肝硬変ではバクテロイデテス門が14.2%，ファーミキューテス門が76.0%，アクチノバクテリア門が4.4%，プロテオバクテリア門が3.6%，そのほか1.7%、肝細胞癌ではバクテロイデテス門が16.7%，ファーミキューテス門が75.4%，アクチノバクテリア門が6.1%，プロテオバクテリア門が0.8%，そのほか1.0%、PBCではバクテロイデテス門が20.2%，ファーミキューテス門が72.4%，アクチノバクテリア門が5.5%，プロテオバクテリア門が0.7%，そのほか1.1%であった。現在，症例数を増やし，属レベルでの解析を行っているところである。

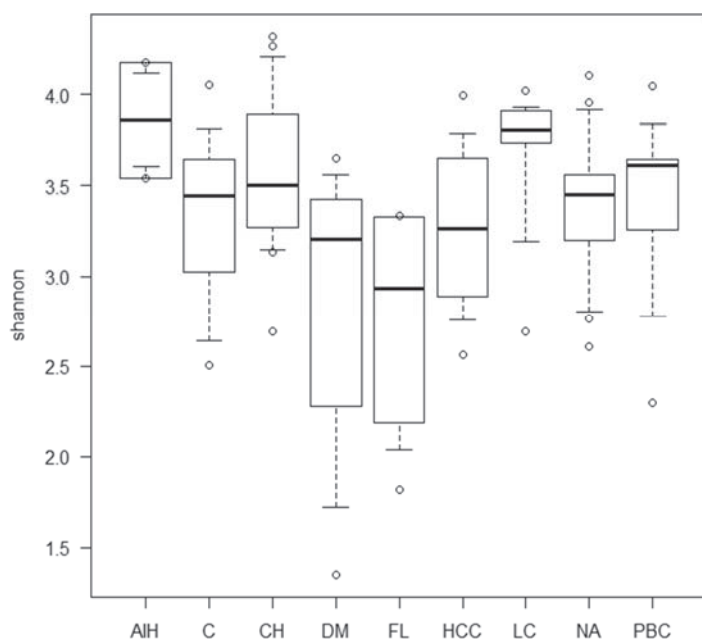
図 1





2. 腸内細菌叢の多様性

次に各疾患における腸内細菌の多様性について解析した。解析はShannon指数を用いて行った(図2)。各疾患のShannon指数は自己免疫性肝炎(AIH) 3.86, コントロール3.35, 慢性肝炎(CH) 3.58, 糖尿病(DM) 2.73, 単純性脂肪肝(FL) 2.75, 肝細胞癌(HCC) 3.27, 肝硬変(LC) 3.68, NASH 3.39, PBC 3.42であった。

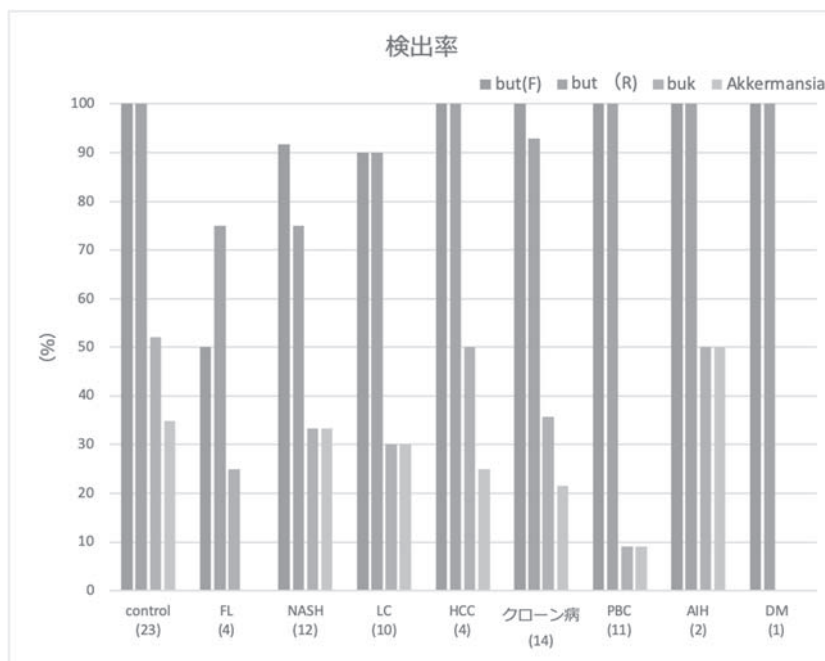


3. 酪酸産生能の解析(図3)

but (F) が検出された症例の割合は、ほとんどの疾患群で100%であったが、単純性脂肪肝(FL)群で50%, NASH群で91.7%であった。but (R) が検出された症例の割合も、ほとんどの疾患群で100%であったが、単純性脂肪肝(FL)群で75%, NASH群で75%, 肝硬変(LC)で90%, クロウン病で92.9%であった。bukに関しては、コントロール群で52.2%, FL群で25%, NASH群で33.3%, LC群で30%, 肝細胞癌(HCC)群で50%, クロウン病群で35.7%, PBC群で9.1%, 自己免疫性肝炎(AIH)群で50%, 糖尿病(DM)群で0%であった。また、近年肥満との関連が指摘されている *Akkermansia muciniphila* の解析をおこなった。同菌を検出した症例の割合はコントロール群で

34.8%, FL群で0%, NASH群で33.3%, LC群で30%, 肝細胞癌 (HCC) 群で25%, クローン病群で21.4%, PBC群で9.1%, 自己免疫性肝炎 (AIH) 群で50%, 糖尿病 (DM) 群で0%であった。

図3



IV 考察

今回の解析では各疾患群において腸内細菌叢の門レベルでの明らかな違いは検出されなかった。腸内細菌叢の多様性は単純性脂肪肝でやや低い結果であった。これまでの報告では、肥満、NASH患者ではファーミキューテス門が多いという報告や、多様性の低下 (dysbiosis) が報告されている。今後は症例数を増やして、さらに属レベルまで詳細に検討する予定である。

but (F) やbut (R) はコントロール群においてすべての症例で検出されたが、単純性脂肪肝、NASH、LC群では一部の症例で検出できなかった。またミヤリ菌などのClostridium属 (ClostridiumクラスターI) が有するbuk遺伝子の検出率も単純性脂肪肝、NASH、LC、PBC群で低かった。さらに、肥満者において菌数の低下が指摘されている*Akkermansia muciniphila*の検出率は単純性脂肪肝、PBC群で低値であった。以上の結果から、各疾患において腸内細菌叢の何らかの特徴がある可能性が有り、今後症例を増やして検討する予定である。

V 結語

次世代シーケンサーを用いて、単純性脂肪肝、NASHをはじめ、各種肝疾患における腸内細菌叢の

解析を行った。今後、症例を増やして詳細に検討する予定である。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人総合健康推進財団に深謝いたします。

【参考文献】

- 1) Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228): 480-4.
- 2) Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418): 55-60.
- 3) Vrieze A1, Van Nood E, Holleman F, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*. 2012 Oct; 143(4): 913-6.