

氏名	やまだ しょうじ 山田 翔士
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博士甲第 4833 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	高脂肪食誘導 NASH-HCC マウスモデルにおける病態と腸内細菌叢・代謝物との関係性の検討～mTOR signaling と酸化ストレスの関与～
論文審査委員	(主査) 教授 齋藤 英胤 (医学博士) (副査) 教授 有田 誠 (博士(薬学)) 准教授 金 倫基 (博士(薬学))

論文内容の要旨

【目的】

近年、わが国では飲酒以外の原因による脂肪肝が増加している。正常の肝臓から肝臓に脂肪が蓄積し、非アルコール性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease、以後 NAFLD) を発症する。また炎症や線維化が進展することにより病態が非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis、以後 NASH) に進展する。10 %の NAFLD 患者が NASH に進展すると報告されており、10 %の NASH 患者が肝硬変や肝細胞癌 (HCC) へと病態が悪化していく。さらに NASH から肝硬変に進展した患者の 40 %に HCC が発生すると言われている。日本における肝硬変や HCC は、これまで主に C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染に伴うものが 70%程度を占めていたが、HCV に対する副作用の少ない画期的な経口薬が開発され、次第にその数が減少している。このような背景をもとに NASH を起因とする肝硬変や HCC の患者の割合が増加している。また、飽食の時代と言われるように、食の欧米化やカロリーの高い食事が蔓延し、交通手段の進歩による運動不足が重なり、NASH 自体の発生数が増加している。しかし、NASH を起因とする HCC のメカニズムに関して詳細は分かっていない。効果的な治療法を確立するためにも NASH を起因とする HCC の病態の解明は必要と考えられる。また、病態を網羅的に解明するために人の検体を頻回に採取することは難しく、倫理的にも許容できないことが多いため、動物における研究からヒトへの応用を考えることが妥当と考えた。

これまでの研究においては、マウスに高脂肪食 (high-fat diet; HFD) を給餌することに加え、化学発癌物質を投与することが NASH から HCC を誘導するマウスモデルとして一般的に用いられてきた。2 次胆汁酸は、腸内細菌によって 1 次胆汁酸から代謝されるが、deoxy cholic acid (DCA) のような 2 次胆汁酸は、HCC において肝星細胞

からの細胞老化因子 (SASP) の産出を促進し、NASH の病態に寄与するとされている。さらに 2 次胆汁酸の一部には、病態を改善する効果が認められている。これまでの報告では、化学発癌物質、胆汁酸 (DCA)、腸内細菌の 3 つの要素のうち、どの 1 つが欠けても HCC は発生していない。

本研究では、マウスに新しいタイプの HFD を化学発癌物質なしで負荷し、NASH から肝発がんが生ずるかを検証する。また HFD の負荷に加え、抗生物質を投与して腸内細菌叢を変化させた。これらの方法により NASH-HCC の病態と腸内細菌叢・代謝物の関係性を検討した。マウスを用いた *in vivo* の実験においては、腸内細菌叢、炎症、腸内細菌の代謝物、肝臓や糞便における胆汁酸などの代謝物組成、タンパク質レベルの発癌シグナル、肝臓、血中の酸化 / 抗酸化指標の解析を行い、*in vitro* では、特定の腸内細菌における有益な 2 次胆汁酸への代謝能力の検討、hepatoma cell line の HepG2 を用いて *in vivo* で認められる発癌経路活性化リガンド候補物質の検索を行った。

【方法】

A. 飼育プロトコール

野生型の C57BL/6J マウスをコントロール食群 (CONT)、高脂肪食群 (STHD-01)、STHD-01 給餌に抗生物質投与を併用した群 (STHD-01+Abx) の 3 群に分けた。マウスはコントロール食または高脂肪食を 9 週 (短期実験) または 41 週 (長期実験) 給餌し、抗生物質投与に関しては餌投与の 1 週間前から剖検直前まで続けた。

B. 病理・生化学的検査

病理検査は本 (慶應) 大学病院の肝臓専門医と病理医に確認を行い、生化学的検査は肝障害の指標や総胆汁酸の測定に関して比色法を用いた。

C. 遺伝子発現の解析

肝臓や小腸から採取したサンプルから RNA を、ISOGEN を用いて精製後、reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)、quantitativePCR (qPCR) を実施した。

D. HPLC を用いた胆汁酸の網羅的解析

Folch 溶媒やエタノールで前処理した肝臓・糞便のサンプルを、high performance liquid chromatography (HPLC) を用いて網羅的に胆汁酸解析を行った。

E. Western blot 解析

前処理を行った肝臓サンプルを、SDS - PAGE 法で電気泳動後、セミドライ方式でニトロセルロースメンブレンに転写後、抗原抗体反応を行い、各種タンパク質の解析を

行った。

F.細胞を用いたリガンド刺激実験

Hepatoma cell line の HepG2 を用いて farnesoid X receptor (FXR) のアゴニストである cholic acid (CA)、chenodeoxy cholic acid (CDCA)、DCA の単投与実験、炎症性サイトカインの TNF- α 、IL-1 β の単・共投与実験、DCA と PI3K 阻害剤の単・共投与実験を行った。

G. 抗酸化物質のメタボローム解析、抗酸化力解析

肝臓のメタボロームに関して capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS)、liquid chromatography (LC)-TOFMS を用いて解析し、抗酸化力に関しては Reactive Oxygen Metabolites-derived Compounds (d-ROMs) test や Biological Antioxidant Potential (BAP) test を用いて解析した。

【結果】

A. 肝臓の病理所見や病態に関わる因子

STHD-01 群においては肝傷害や炎症の増加を伴って HCC が発生した。STHD-01 群の肝臓の組織学的検索では、異型性や monotonous cell への置換など HCC の特徴が認められた。STHD-01+Abx 群ではこれらの特徴が改善した。また STHD-01 群では肝細胞傷害の指標である aspartate aminotransferase (AST)・alanine aminotransferase (ALT) 値の有意な上昇や炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (以後 Tnf)- α や interleukin (IL)-1 β の有意な上昇が見受けられ、これらが STHD-01+Abx 群では改善しており、fluorescence activated cell sorting (FACS) 解析の結果、炎症の活性化はマクロファージの賦活化が原因であると認められた。

B. 腸内細菌叢の特徴と肝臓・小腸での胆汁酸合成・再吸収関連遺伝子発現と糞便・肝臓における胆汁酸網羅的解析

腸内細菌の総菌数は CONT と STHD-01 群で違いは認められなかった。一方、腸内細菌の種類比率は異なっていた。STHD-01 群で *Bacteroides* や *Clostridium* cluster XIII は増加し、*Streptococcus*、*Bifidobacterium* や *Prevotella* は減少していた。STHD-01+Abx 群においては、腸内細菌の総菌数が 100 分の 1 に減少し、*Enterococcus* が優勢であった。

糞便や肝臓中における総胆汁酸量は STHD-01 を給餌した 2 群で短期および長期実験において上昇していた。胆汁酸合成に関与する酵素に関しては 3 群間で大きな変化はなく、再吸収に関与するトランスポーターは、短期実験においては STHD-01 群で減少し、STHD-01+Abx 群で回復していたものが、長期実験では STHD-01+Abx 群でも

STHD-01 と同様に有意に減少していた。糞便については、CONT・STHD-01 群で 2 次胆汁酸が高い比率で検出された。STHD-01+Abx 群では腸内細菌叢が減少したことにより 2 次胆汁酸への代謝が減少し、そのほとんどが 1 次胆汁酸であった。肝臓において優勢な胆汁酸は、短期実験と長期実験で比較すると群によっては優勢な胆汁酸に違いが認められた。

肝臓で検出された DCA と tauro-DCA という FXR のアゴニストである有害な 2 次胆汁酸は STHD-01 群で検出され、STHD-01+Abx 群で検出されなかった。STHD-01+Abx 群では 1 次胆汁酸で NAFLD 進展抑制作用がある tauro- β -muri cholic acid (T β MCA) が多く検出され、2 次胆汁酸は urso deoxy cholic acid (UDCA) が特異的に検出された。In vitro で検討を行ったところ、STHD-01+Abx 群の優勢な腸内細菌 *Enterococcus* で CDCA を UDCA に代謝する能力があることが分かった。

C. 腸内細菌代謝物がリガンドとなった発癌経路の活性化に関する *in vivo*, *in vitro* での検討

Mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナリングにおける FXR アゴニストの振る舞いを解析するために、筆者たちは mTOR・extracellular signal regulated kinase (Erk)・janus kinase (Jak)-signal transducer and activator of transcription (Stat)3 という肝臓に関与する発癌シグナルを検討した。mTOR だけが、STHD-01 群で有意に上昇し、STHD-01+Abx 群で有意に減少した。そこで hepatoma cell である HepG2 細胞に FXR のアゴニストである CA、CDCA と DCA を投与したところ、DCA でのみ mTOR が活性化し、また DCA は、マウスの肝臓内の生理的濃度に近い濃度でも mTOR を活性化しており、阻害剤による抑制実験の結果 phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 依存的に作用することが明らかになった。

D. Nrf2 活性化に伴う抗酸化効果

肝臓において酸化・抗酸化関連タンパク質である Nrf2 が上昇していた。メタボローム解析により、肝臓中の抗酸化物質である glutathione (GSH)/glutathione disulfide (GSSG)、nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)⁺ や nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)⁺ が STHD-01 群で減少し、STHD-01+Abx 群での上昇・回復が認められた。血漿中の抗酸化力が STHD-01+Abx 群で他の 2 群と比して有意に上昇していた。

[考察]

1. STHD-01 群にて生じた NASH-HCC の病態は、組織学的検索および肝臓・血中マーカーの結果から STHD-01+Abx 群では改善が認められ、NASH-HCC 病態形成における腸内細菌の役割が大きいことが考えられた。

2. STHD-01 群では monocyte/macrophage 系細胞の賦活化が示唆された。STHD-01+Abx 群では monocyte/macrophage 系の賦活化は低下し、その結果肝傷害や炎症が抑制されたと考えられた。これは、短期投与の系で認められた MCP-1 の上昇が関与していると思われた。
3. 腸内細菌叢に関して長期実験の CONT 群と STHD-01 群の菌叢比較、短期実験と長期実験間での各群の菌叢比較で菌叢の割合が異なっていた。STHD-01+Abx 群では菌数が 100 分の 1 に減少していたが、菌叢に関しては、短期・長期実験でもほとんど *Enterococcus* が占めていた。
4. 肝臓中のコレステロール量は、STHD-01 給餌両群において増加していた。胆汁酸合成酵素の発現を調べた結果、HFD 給餌によりコレステロール合成酵素の発現が上昇した。STHD-01+Abx 群による大きな変化は認められなかったことから、肝臓における合成酵素の活性は、腸内細菌叢との関連がないことが考えられた。
5. 小腸回腸部における胆汁酸再吸収トランスポーター等の遺伝子発現を調べた。短期実験における STHD-01 群では、腸管内腔側→粘膜内→門脈血側に至る胆汁酸輸送に関与する遺伝子の発現が低下し、胆汁酸の再吸収が抑制されていた一方、STHD-01+Abx 群では回復していた。長期実験では STHD-01 群と同様に STHD-01+Abx 群でも胆汁酸輸送に関与する遺伝子発現が低下していた。これは肝臓中の総胆汁酸量の結果と一致した。すなわち、HFD 負荷が長期に続くと肝臓への脂肪流入を抑制するようトランスポーターの発現が動くことが考えられた。これは、過剰な脂肪の吸収を抑制しようとする生体の防御能ではないかと考えられた。また、糞便や肝臓中の胆汁酸組成より胆汁酸輸送に関与する遺伝子のうちトランスポーター発現制御には FXR のアゴニスト・アンタゴニストが関与している可能性が考えられた。
6. HPLC による網羅的な胆汁酸分析によって、STHD-01 群では、胆汁酸の組成内に占める 2 次胆汁酸の割合や種類が増加していた。また STHD-01+Abx 群では、腸内細菌の減少 (1/100) により 2 次胆汁酸への代謝が減少していた。その結果、NAFLD 進展抑制作用がある T β MCA が優勢であった。肝臓中の短期・長期実験の胆汁酸組成の解析では、STHD-01 群で細胞老化作用がある DCA とその抱合体が検出されたが、STHD-01+Abx 群では、これらの胆汁酸は検出されなかった。これらより、STHD-01+Abx 群においては、総菌数の低下に加え有害な 2 次胆汁酸に代謝する細菌叢の消失、さらに有益な胆汁酸に代謝する細菌叢の増加が、病態抑制に働いたものと考えられた。
7. *In vivo*, *in vitro* の結果より、発癌関連タンパク質である mTOR の活性化は *in vivo*, *in vitro* の結果より DCA の生理的濃度で活性化されることが示唆され、その活性化は FXR ではなく、PI3K を介していることが考えられた。*In vivo* の肝臓内では、mTOR の上昇が認められたが、*ERK* や *JAK-STAT* の発現上昇は認められなかつ

たことから、本実験における発癌は mTOR シグナルの活性化によるものと思われた。

8. STHD-01+Abx 群で優勢であった 4 種の *Enterococcus* のうち *Enterococcus faecalis* を含む 2 種類は、CDCA から抗腫瘍効果を持つ UDCA に代謝を確認することができ、これが STHD-01+Abx 群の病態抑制に寄与していることが示唆された。
9. タンパク発現、メタボロームの結果より STHD-01+Abx 群では、肝臓における *Nrf2* の発現上昇が認められ、GSH/GSSG, NAD⁺, NADH⁺の上昇、全身の抗酸化力が上昇し、このことも STHD-01+Abx 群の肝臓での病態抑制に関わっていたことが示唆された。

[結論]

新しいタイプの高脂肪食では化学発癌物質の投与なく肝臓が癌発生し、抗生物質の投与によって抑制されていた。筆者たちの解析では、食餌や腸内細菌叢の変化による胆汁酸代謝やそれに伴う肝臓への胆汁酸の再吸収が変化していた。腸内細菌によって代謝された 2 次胆汁酸 DCA による PI3K を介した mTOR シグナリングの活性化や TβMCA・UDCA による NAFLD 抑制・抗腫瘍作用など、肝臓病態に胆汁酸が大きな役割を果たしていることが明らかになった。

論文審査結果の要旨

山田翔士君は、マウスに Ejima らの開発した新しい高脂肪食 STHD-01 を摂餌し、短期間（9 週間）で非アルコール性脂肪肝炎（NASH）、長期間（31 週間）で肝細胞がん（HCC）を生ずることを確認している。化学発がん物質投与なしで、高脂肪食摂餌だけで発がんを認めた実験系はこれまでで初めてであり、ヒトにおける NASH 誘発性肝臓がんの良いモデルを作成したと考えられた。山田君は、このモデルを用いて、腸内細菌、脂肪酸代謝物、胆汁酸代謝物を網羅的に解析し、発がんに至る病態を一つ一つ解明した重要な論文で、消化器病学、腫瘍学に多大な貢献をしたと評価された。

副査からは、全般的に presentation の方法について種々のアドバイスを受け、審査会での発表は審査教員の理解しやすいものとなった。論文内容に関しては、大きく分けて脂肪酸、腸内細菌、胆汁酸、発がん経路の 4 点について討議された。

脂肪酸については、糞便中の脂肪酸の組成が異なることについての考察を求められ、腸内での細菌叢の違いにより脂質代謝が変化したことが討議された。また、高脂肪食群で *cyp7a1* の発現が上昇していたことについて質問があり、FGF19 の関与が考えられる

と回答された。

腸内細菌については、胆汁酸代謝活性を検討する際に、好気性培養のみで検討していたが、嫌気性培養も検討する必要があるのではないかとされた。また、単離された菌株により2次胆汁酸が代謝されたことについて、胆汁酸代謝酵素遺伝子の確認を質問された。これらに関しては、今後の検討に委ねることとした。

胆汁酸については、T β MCAの細胞に対する作用の検討がないことについて質問があったが、マウスの細胞系がなく現実的でないことが回答された。またDCAがmTOR経路を活性化することに関して質問され、CDA-TGR5-mTORの順に活性化されるものと考えられると回答された。さらに、本マウスの高脂肪食摂取軍における体重減少の原因として、甲状腺ホルモンの影響以外に、胆汁酸がTGR5を刺激して腸管内のL細胞からGLP-1の分泌を亢進することも一因でないかと討議された。

発がん経路に関しては、mTOR以外の経路の検討が少し不十分であることが指摘された。これに関しては、今後の検討が必要とされた。

また、Nrf2の下流の物質について、血中の酸化物質、抗酸化物質について議論された。

以上、細部に若干の解析不十分なところもあるが、不十分な領域に関しての周辺知識も十分にあり、論理的な思考力、実験計画力、遂行力も優れており、山田翔士君は、薬学博士として十分な資質を持っていることが確認された。

論文目録

【主論文に関する原著論文】

1. Yamada S, Takashina Y, Watanabe M, Nagamine R, Saito Y, Kamada N, Saito H. Bile acid metabolism regulated by the gut microbiota promotes non-alcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma in mice. *Oncotarget* 2018; 9(11): 9925-9939.
2. Yamada S, kamada N, Amiya T, Nakamoto N, Nakaoka T, Kimura M, Saito Y, Ejima C, Kanai T, Saito H. Gut microbiota-mediated generation of saturated fatty acids elicits inflammation in the liver in murine high-fat diet-induced steatohepatitis. *BMC gastroenterology* 2017; 17: 136.

【参考論文】

1. Yamada S, Kimura M, Saito Y, Saito H. Nrf2-mediated anti-oxidant effects contribute to suppression of non-alcoholic

steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma in murine model. J. Clin. Biochem. Nutr. 2018; in press.

1. Ueki S, Murakami Y, Yamada S, Kimura M, Saito Y, Saito H. microRNA-mediated resistance to hypoglycemia in the HepG2 human hepatoma cell line. BMC Cancer 2016; 16(1): 732.
2. Takaki Y, Saito Y, Takasugi A, Toshimitsu K, Yamada S, Muramatsu T, Kimura M, Sugiyama K, Suzuki H, Arai E, Ojima H, Kanai Y, Saito H. Silencing of microRNA-122 is an early event during hepatocarcinogenesis from non-alcoholic steatohepatitis. Cancer Sci. 2014; 105(10): 1254-1260.