様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　3 年　6 月 15 日現在

機関番号：13601
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：18K08684

研究課題名（和文）腸内細菌叢プロファイリングによる肝性脳症の分子機序解明と革新的治療の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of hepatic encephalopathy and development of innovative treatment by intestinal bacterial flora profiling

研究代表者

副島　雄二（soejima, yuji）

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：30325526

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）：生体肝移植における腸内細菌叢の組成や術前・術後経過との関連性について検討した。生体肝移植をうける非代償性肝硬変患者では肝臓提供者と組成が大きく異なり、患者における門脈圧が、Bacteroidetes門及び便中プロピオン酸値と有意に正の相関を示したことを報告した。また、胆汁酸解析において血清胆汁酸解析で患者群の総胆汁酸値、TCDCA値、GCDCA値が有意に高値であり(いずれもp＜0.001)、これらの値がMELDスコアと有意な正の相関を示すことを報告した(各々p=0.022、p=0.023、p=0.0087)。今後、肝移植手術前後での細菌叢の変化およびその臨床的意義を解析していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義
肝硬変はウイルス性肝炎などの原疾患の治療が可能な時期を過ぎると、対症療法が中心となり、特に非代償期においては肝移植以外に確立された治療法がない。また、肝移植後も感染症や拒絶反応といった合併症への不安を常に抱えている。我々の研究成果によって、非代償性肝硬変への腸内細菌叢の関与と肝移植による細菌叢の変化、ドナー細菌叢との関連が明らかになり、さらには便移植など非代償性肝硬変に対する新たな治療法の確立が期待でき、今後も研究を継続する予定である。

研究成果の概要（英文）：We investigated the composition of the gut microbiota in decompensated liver cirrhosis patients undergoing living donor liver transplantation and its relationship to the preoperative and postoperative course. We reported that the composition of the patients differed significantly from that of liver donors, and that portal venous pressure in the patients showed a significant positive correlation with phylum Bacteroidetes and fecal propionate levels. We also reported that the total bile acid, TCDCA, and GCDCA levels in the patients were significantly higher in serum bile acid analysis (all p<0.001), and that these values showed a significant positive correlation with the MELD score (p=0.022, p=0.023, and p=0.0087, respectively). We will continue to analyze the changes in bacterial flora before and after liver transplantation surgery and their clinical significance.

研究分野：消化器外科学

キーワード：生体肝移植　腸内細菌叢　短鎖脂肪酸　胆汁酸　便移植

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

研究者はこれまで、20 年以上にわたり末期肝不全の根治的治療である肝移植医療に従事し、多数の末期肝不全患者のケアを行ってきた。その中での肝性脳症、特に劇症肝炎時の肝性脳症の治療の成否は予後を左右する最も重要なファクターであるにも関わらず、これまで旧来の非特異的治療が行われてきたが、その効果は極めて限定的であった。

肝硬変患者の腸内細菌叢では、健常人と比較し Firmicutes 門が少なく Proteobacteria 門および Bacteroidetes 門が多く、増殖した細菌が産生するリポ多糖など炎症惹起物質が肝硬変の進行に寄与すると報告されている。しかし腸内細菌の構成は個人間でのばらつきが大きく評価が困難であるため、細菌の代謝産物である胆汁酸・短鎖脂肪酸の解析による病態の理解が試みられている。短鎖脂肪酸のうち、細菌代謝物の多くを占めるプロピオン酸、酪酸等がヒトの疾患に影響を及ぼす物質として注目されている。

腸内細菌叢のゲノムワイドな包括的解析により、これまでとは全く異なる独創的なアプローチからの、発症メカニズムに裏付けされた次世代の肝性脳症の特異的治療法の開発が可能ではないかと本研究を着想したことが研究開始当初の背景である。

２．研究の目的

肝硬変はウィルス性肝炎などの原疾患の治療が可能な時期を過ぎると、対症療法が中心となり、特に非代償期においては肝移植以外に確立された治療法がない。また、肝移植後も感染症や拒絶反応といった合併症への不安を常に抱えている。本研究では、1）肝不全患者における腸内細菌叢の 16srRNA 系統解析・フルメタゲノム解析を行い、健常人と比較することにより、その特徴を明らかにし、2）肝不全・脳症発症モデルマウスを用いて腸内細菌叢プロファイリング、腸管粘膜・肝細胞・神経細胞のメタボローム解析を行い、完成脳症発症のメカニズムを明らかにする。3）それらの治験に基づき、有効な腸内細菌移植、菌株カクテルなどを用いた腸内細菌叢エンジニアリングによる肝性脳症改善効果を検証する。

我々の研究成果によって、非代償性肝硬変への腸内細菌叢の関与と肝移植による細菌叢の変化、ドナー細菌叢との関連が明らかになる。さらには便移植など新たな治療法の確立が期待できる。腸内細菌叢とその代謝産物である胆汁酸および短鎖脂肪酸の組成を明らかにし、生体肝移植における腸内細菌叢の組成や術後経過との関連性を検討する。将来的にこれまでと全く異なった視点からの根本的治療を開発することを最終目的とする。

３．研究の方法

対象は、2017 年 6 月から 2018 年 6 月までに生体肝移植を施行した症例のうち同意が得られたレシピエント 18 名、健常人コントロールとしてドナー17 名。レシピエントの原疾患は、B 型肝硬変 2 例、C 型肝硬変 5 例、非アルコール性脂肪肝炎 3 例、原発性胆汁性胆管炎 2 例、アルコール性肝硬変 3 例、Wilson 病を含めたその他 3 例であった。これら患者の生体肝移植あるいは肝グラフト採取術の 1～3 日前の糞便および手術直前に血清を採取し、腸内細菌叢解析ならびに便・血清の短鎖脂肪酸解析、これらのデータと臨床因子との関連性を検討した。

1） 糞便中の 16srRNA の解析により細菌叢を同定した。
2） 糞便・血清の質量分析により血清中の短鎖脂肪酸及び胆汁酸、糞便中の短鎖脂肪酸の質量分析を行った。
3） 臨床因子との関連を検討した。

４．研究成果

1)腸内細菌叢の同定：レシピエントではドナーに比して Firmicutes 門が有意に少なく、Proteobacteria 門が有意に多かった（表 1）。

門 (reads)	レシピエント (n=18)	ドナー (n=17)	p値
Firmicutes	22,238 (17,517-26,960)	28,471 (23,612-33,331)	0.035
Proteobacteria	2,227 (1,088-3,367)	505 (0-1,677)	0.040
Actinobacteria	8,697 (5,346-12,047)	8,464 (5016-11,911)	0.92
Fusobacteria	388 (95.2-682)	8.8 (0-310)	0.075
Bacteroidetes	4,093 (2,297-5,889)	3,437 (1,589-5,286)	0.61
Total	37,846 (33,525-42,166)	41,621 (37,175-46,066)	0.22

表１：便中細菌叢解析(門レベル)

2）短鎖脂肪酸・胆汁酸解析：レシピエントでは、一次胆汁酸値が有意に高く(p=0.0427)、血清短鎖脂肪酸ではレシピエントで血清中のプロピオン酸(p=0.049)がドナー群と比較して有意に高かった（表 2)。便中短鎖脂肪酸解析では、両群に差はみられなかった（表 3)。

短鎖脂肪酸(μg/ml)	レシピエント (n=18)	ドナー (n=17)	p値
酢酸	4.02 (2.25-5.78)	5.79 (3.97-7.60)	0.16
プロピオン酸	0.126 (0.069-0.18)	0.0588 (0-0.118)	0.11
酪酸	0.0456 (0.016-0.074)	0.0271 (0-0.0571)	0.38
3-ヒドロキシ酪酸	15.4 (9.99-20.8)	8.55 (2.98-14.1)	0.081
コハク酸	0.296 (0.218-0.374)	0.361 (0.280-0.441)	0.25
リンゴ酸	0.657 (0.542-0.771)	0.344 (0.226-0.462)	<0.001

表 2：血清短鎖脂肪酸解析

短鎖脂肪酸(μg/ml)	レシピエント (n=18)	ドナー (n=17)	p値
酢酸	1,877 (1,352-2,402)	1,882 (1,357-2,407)	0.99
プロピオン酸	903 (626-1,181)	837 (559-1,114)	0.73
酪酸	389 (200-578)	613 (424-802)	0.097
3-ヒドロキシ酪酸	6.33 (0.824-11.8)	5.34 (0-10.8)	0.80
コハク酸	35.4 (0-208)	211 (38.8-384)	0.15
リンゴ酸	22.7 (7.40-37.9)	7.49 (20.7-51.2)	0.22

表 3：便中短鎖脂肪酸解析

4） 臨床因子との関連性：レシピエントの開腹時門脈圧は、Bacteroidetes 門及び便中プロピオン酸値と有意に正の相関を示した（図 1)。また、門脈圧と腸内細菌、短鎖脂肪酸の関係では、Bacteroidetes 門の代謝産物のひとつであるプロピオン酸が、門脈圧と正の相関を示した（図 2)。

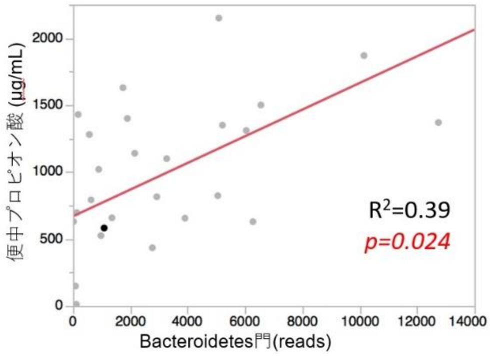

図 1：便中プロピオン酸と Bacteroidetes 門

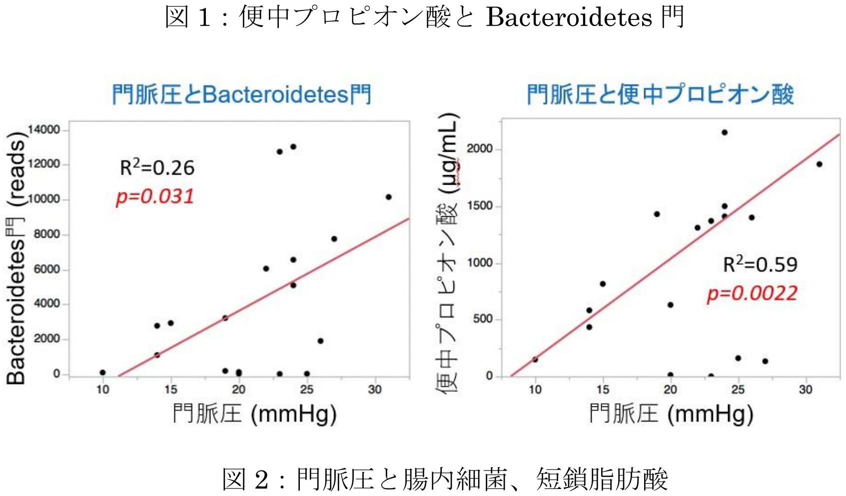

図 2：門脈圧と腸内細菌、短鎖脂肪酸

門脈圧・シャントの有無と Bacteroidetes 門の関係では、シャントがあっても門脈圧が高い群で Bacteroidetes 門は有意に高かった（図 3)。

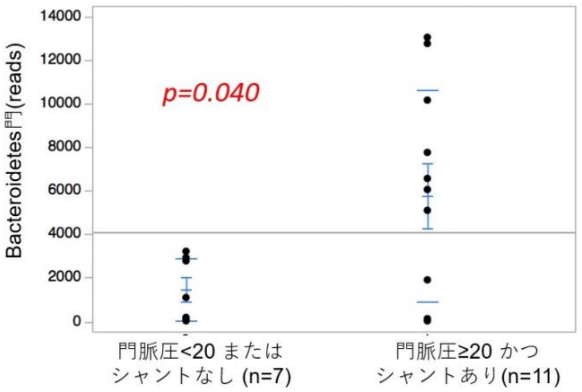

図 3：門脈圧・シャントの有無と Bacteroidetes 門

本解析でレシピエントの腸内細菌叢の組成は、既報での肝硬変患者の腸内細菌叢と同様の傾向を示した。また腸内細菌叢、短鎖脂肪酸および臨床因子間の解析では、Bacteroidetes 門とその代謝産物であるプロピオン酸値と門脈圧が互いに正の相関を示した。Bacteroidetes 門の細菌は、プロピオン酸を産生する。NASH モデルマウスにおいて、腸内細菌叢の変化による門脈圧が制御されると報告されている。この門脈圧の制御において、腸内細菌の産生するプロピオン酸がカギとなる可能性が示唆された。腸内細菌が代謝産物を介して門脈圧上昇に寄与する可能性を示唆し、肝硬変治療標的開発にむけた新たな知見といえる。

＜引用文献＞

Kakiyama G, et al. J Hepatol. 2013;58:949-55.
Baffy G, et al. Liver Int. 2018:00;1-12.
Jia X., et al. Hepatol. 2020;71:893-906.
Urdaneta V. et al. Front Med. 2017;4:163.
Loomba R., et al. Cell Metabolism. 2017;25:1054-62.
Bajaj JS., et al. Hepatol. 2019;70:1690-1703.
Bajaj JS, et al. J Hepatol. 2014:60;940-7.
Kato K et al. Transplant Direct. 2017; 3: e144.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　3件）

１．著者名 Toshima Takeo、Yoshizumi Tomoharu、Inokuchi Shoichi、Kosai-Fujimoto Yukiko、Kurihara Takeshi、Yoshiya Shohei、Mano Yohei、Takeishi Kazuki、Itoh Shinji、Harada Noboru、Ikegami Toru、Soejima Yuji、Shimokawa Mototsugu、Maehara Yoshihiko、Mori Masaki	４．巻 22
２．論文標題 Risk factors for the metabolic syndrome components of hypertension, diabetes mellitus, and dyslipidemia after living donor liver transplantation	５．発行年 2020年
３．雑誌名 HPB	６．最初と最後の頁 511～520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.hpb.2019.08.008	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 －

１．著者名 Maehara Yoshihiko、Soejima Yuji、Yoshizumi Tomoharu、Kawahara Naoyuki、Oki Eiji、Saeki Hiroshi、Akahoshi Tomohiko、Ikegami Toru、Yamashita Yo-ichi、Furuyama Tadashi、Sugimachi Keishi、Harada Noboru、Tagawa Tetsuzo、Harimoto Norifumi、Itoh Shinji、Sonoda Hideto、Ando Koji、Nakashima Yuichiro、Nagao Yoshihiro	４．巻 24
２．論文標題 The evolution of surgical treatment for gastrointestinal cancers	５．発行年 2019年
３．雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	６．最初と最後の頁 1333～1349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-019-01499-7	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 －

１．著者名 Masuda Yuichi、Yoshizawa Kazuki、Ohno Yasunari、Mita Atsuyoshi、Shimizu Akira、Soejima Yuji	４．巻 19
２．論文標題 Small-for-size syndrome in liver transplantation: Definition, pathophysiology and management	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International	６．最初と最後の頁 334～341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.hbpd.2020.06.015	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3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 小斉侑希子
２．発表標題 生体肝移植患者における腸内細菌叢、短鎖脂肪酸、胆汁酸解析と 新たな非代償性肝硬変治療標的の検討
３．学会等名 第74回日本消化器外科学会 総会
４．発表年 2019年

１．発表者名 小斉侑希子
２．発表標題 生体肝移植患者における腸内細菌叢、胆汁酸解析の意義
３．学会等名 第55回日本移植学会総会
４．発表年 2019年

１．発表者名 小斉侑希子
２．発表標題 生体肝移植における腸内細菌叢解析およびメタボローム解析とその意義
３．学会等名 第119回日本外科学会総会
４．発表年 2019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	間野　洋平 (Mano Yohei) (10792244)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	戸島　剛男 (Toshima Takeo) (40608965)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	本村　貴志 (Motomura Takashi) (50719507)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	

６．研究組織（つづき）

	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	吉住　朋晴 (Yoshizumi Tomoharu) (80363373)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	原田　昇 (Harada Noboru) (80419580)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	池上　徹 (Ikegami Toru) (80432938)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	伊藤　心二 (Itoh Shinji) (90382423)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	長尾　吉泰 (Nagao Yoshihiro) (70608968)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	

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