

氏名・(本籍)	石岡 充彬 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	医博甲第 931 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Altered Gut Microbiota Composition and Immune Response in Experimental Steatohepatitis Mouse Models (脂肪性肝炎モデルマウスにおける腸内細菌叢と免疫応答の変化)
論文審査委員	(主査) 教授 眞鍋 求 (副査) 教授 中永 士師明 教授 美作 宗太郎

学位論文内容要旨

Altered Gut Microbiota Composition and Immune Response in Experimental Steatohepatitis Mouse Models

(脂肪性肝炎モデルマウスにおける腸内細菌叢と免疫応答の変化)

申請者氏名 石岡 充彬

研究目的

脂肪性肝炎をはじめ種々の肝疾患の病態に腸内細菌や腸内免疫の変化が影響を及ぼすと考えられているが、詳細は不明である。そこで我々は、食餌性脂肪性肝炎モデルとして用いられる高脂肪食(HF)、コリン欠乏食(CDAA)、メチオニン-コリン欠乏食(MCD)各種ダイエットモデルマウスを用い、標準食(NC)を与えたマウスと腸内細菌叢を比較し、脂肪性肝炎の病態の鍵となる腸内細菌の解明を目的とした。また、炎症性疾患をはじめとする全身疾患の病態形成に重要な役割を果たすとして近年注目される IL-17 についても検討を加えた。

研究方法

8 週齢雄性 WT マウス(C57BL/6)を 4 群(各群 n=10)に分け、それぞれ NC(3.42kcal/g)、HF(5.06kcal/g)、CDAA(4.35kcal/g)、MCD(3.91kcal/g)を 8 週投与した。肝・腸・門脈血を回収し、脂肪性肝炎の重症度について生化学的および組織学的検討をした。腸内細菌や腸管免疫と関連の深い IL-17 についても検討を加えた。また、同時に回収した糞便より抽出・精製した DNA 溶液を元に次世代シーケンサーを用いて各種脂肪性肝炎モデルマウスの腸内細菌叢を解析した。解析には Roche 社 GS Junior によるエマルジョン PCR を用いたパイロシーケンシング法と、Illumina 社 Miseq によるブリッジ PCR を用いた DNA 合成シーケンシングの両方法を用いた (GS Junior を用いた手法はデータ量やコスト面で劣るが、ロングリードを得意とし、質の高い解析データを得られる。一方で Miseq を用いた手法では、GS Junior と比較してリード末端の質が落ちやすい欠点を持つが、安価に膨大なデータ量を得られる利点があり現在の主流である)。

研究成績

各食餌投与により NC、HF、CDAA 群はそれぞれ 23%、75%、25%の体重増加を示した。一方で MCD 群は 35%の体重減少を示した。組織学的には HF で単純性脂肪肝が誘導され、CDAA および MCD 群で脂肪性肝炎が誘導された。また脂肪化・炎症細胞浸潤の程度は CDAA 群で最も強く、ALT 値や炎症性サイトカイン発現も CDAA 群で最も増加した。加えて、組織学的にはいずれの群においても肝の線維化は認めなかったものの、CDAA 群においては線維化マーカーの有意な上昇を認めた。腸内細菌叢の主成分分析では各群間で腸内細菌構成が大きく異なる事が示唆された。門レベルでは *Firmicutes* 門 (グラム陽性) および *Bacteroidetes* 門 (グラム陰性) とで全体の 85%以上を占めた。*Firmicutes/Bacteroidetes* 比 (F/B 比) は、肥満と関連するとの報告があり、HF 群では既報と一致し、体重増加に伴い著明な F/B 比の上昇を認めたが、CDAA、MCD 群でも同様に F/B 比の上昇を認めた。より下位の階級へ解析を進めると、*Firmicutes* 門は HF、CDAA、MCD 各群で増加していたものの、その構成は大きく異なり、NC 群や単純性脂肪肝のみであった HF 群では *Lactobacillus* や *Lactococcus* を含む乳酸菌群がその大半を占めたのに対し、CDAA、MCD 群においてはそれら乳酸菌群の減少が顕著であった。また脂肪性肝炎が最も顕著であった CDAA 群でエタノール産生能を有するとされる *Clostridium phytofermentans* の増加を認めた。一方、*Bacteroidetes* 門においては抗炎症作用を有するとの報告のある *Parabacteroides goldsteinii* の減少を各群で認めた。*Firmicutes* 門、*Bacteroidetes* 門に次ぐ構成要素である *Proteobacteria* 門は全細菌叢における占有率は少ないものの、Toll-like Receptor 4 (パターン認識受容体のひとつで、主にグラム陰性菌由来のリポポリサッカライド(LPS)をリガンドとし、脂肪性肝炎の病態との関連が広く認知されている)のリガンドである LPS 供給源として重要と考えられ、脂肪性肝炎を示した CDAA、MCD 群で *Desulfovibrio vulgaris* と *Helicobacter hepaticus* の増加を認めた。また CDAA 群では回腸 Paneth 細胞に IL-17 は発現増加を認め、門脈血中 IL-17 濃度も上昇した。IL-17 にはケモカイン誘導作用があることから、肝マクロファージを IL-17 で刺激すると CXCL-2 などのケモカインの増加を認めた。実際、CDAA 群では肝でのケモカイン発現増加とマクロファージや好中球などの炎症細胞増加を認めた。

結論

各食餌性脂肪性肝炎モデルマウス間で腸内細菌叢に大きな違いがあり、特に最も脂肪性肝炎が顕著であった CDAA 群においては乳酸菌群や抗炎症作用を持つとされる *Parabacteroides* の減少、エタノール産生菌や LPS 産生菌群の増加などを認め、脂肪性肝炎促進への関与が示唆された。また IL-17 シグナル経路を含む腸管免疫の変化も病態への関与が示唆された。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査：眞鍋 求

申請者：石岡 充彬

論文題名：Altered Gut Microbiota Composition and Immune Response in Experimental Steatohepatitis Mouse Models.

（脂肪性肝炎モデルマウスにおける腸内細菌叢と免疫応答の変化）

要旨

申請者らは、脂肪性肝炎の発症基盤における腸内細菌叢の役割を解明するため、次世代シーケンサーを用いて食餌性脂肪性肝炎モデルマウスにおける腸内細菌叢を解析するとともに、腸管 Paneth 細胞における IL-17 発現様式を検討した。その結果、脂肪性肝炎が最も顕著であったコリン欠乏食群では、(1) 乳酸菌群や抗炎症作用を持つ菌が減少している、(2) エタノール産生菌や LPS 産生菌群が増加している、(3) IL-17 の発現が回腸 Paneth 細胞において増強している、(4) 門脈中 IL-17 濃度が上昇している、などの所見が得られた。これらの所見は、脂肪性肝炎の発症基盤である腸管免疫の変化に、腸内細菌叢が重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

IL-17 は種々の全身性炎症性疾患との関連が報告されているが、NASH における報告はまだない。本研究の斬新さは、NASH モデルマウスにおいて腸管 Paneth 細胞および門脈血中で IL-17 の発現が亢進していることを初めて見出し、同時にこれらの変化が抗生剤投与により抑制されることも示すことで、腸内細菌叢の変化と IL-17 経路の関連性を結論づけたことである。

2) 重要性

NASH 患者数の増加に伴い、NASH が今後肝細胞癌の発癌経路として重要性を高める中、その発症メカニズムは未解明な部分が多く、また十分なエビデンスを持った治療法も確立されていない。本研究において申請者が、脂肪性肝炎の発症基盤における腸内細菌叢の役割と IL-17 経路を介した腸管免疫の変化を解明したことは、新たな治療介入の糸口として、臨床的にも有用性が期待できる点において重要であると考えられる。

3) 実験の正確性

本研究は、糞便からの DNA 抽出・精製から次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢解析に至るまで、様々な手法を用い再現性を確認している。これらの結果には統計学的検討が加えられており、研究結果の妥当性を担保するに十分な客観性、正確性を有していると判断される。

4) 表現の明瞭さ

食餌性脂肪性肝炎モデルマウスにおける腸内細菌叢の変化と腸管免疫 IL-17 経路について、その研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔かつ明瞭に記載していると考えられる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。