

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	林 秀美
学位論文題目			
<p>The effect of heat-killed <i>Lactobacillus brevis</i> SBL88 on improving selective hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease mice without altering the gut microbiota (Heat-killed <i>Lactobacillus brevis</i> SBL88はNAFLDマウスの腸内細菌叢を変えずに 選択的インスリン抵抗性を改善する)</p>			
共著者名			
<p>Koji Sawada, Hiroki Tanaka, Kazuki Muro, Takumu Hasebe, Shunsuke Nakajima, Toshikatsu Okumura and Mikihiro Fujiya</p>			
<p>Journal of Gastroenterology and Hepatology; 2023 Oct;38(10):1847-1854 doi:10.1111/jgh.16337. Epub 2023 Aug 30.</p>			
研究目的			
<p>非アルコール性脂肪性肝炎 (NAFLD) は肝硬変や肝細胞癌へ進展しうる病態だが、その治療は食事・運動療法が中心で、効果的な薬物療法は確立されていない。腸内細菌へ治療介入する試みが多数報告されているが、その報告は数種類の腸内細菌のカクテル療法が中心である。Heat-killed <i>Lactobacillus brevis</i> SBL88 (<i>L. brevis</i> SBL88) はエタノール誘発肝障害モデルマウスにおいて血清ALTの上昇や脂肪肝の発症を抑制することが報告された。また、以前我々は日本の常習飲酒者を対象に無作為化二重盲検プラセボ対照臨床試験を行い、<i>L. brevis</i> SBL88が血清γGTとTGを下げ、アルコールによる肝障害を緩和する可能性があることを報告した。しかし、<i>L. brevis</i> SBL88の非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) に対する効果は不明である。今回我々はheat-killed <i>L. brevis</i> SBL88をNAFLDモデルマウスに単体投与することでその効果とメカニズムを検討することを目的として本研究をおこなった。</p>			
材料・方法			
<p>●微生物：<i>L. brevis</i> SBL88は札幌ビール株式会社から提供を受け、<i>Lactobacilli</i>-MRS brothを用いて37℃で1日嫌気培養し、遠心分離によって収集、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて3回洗浄した。その後121℃で20分加熱して微生物を死滅させ、凍結乾燥した。</p> <p>●動物モデル：8週齢の雄性マウスC57BL/6Jにhigh fat diet (HFD) を16週間給餌し、NAFLDモデル (HFDマウス) を作製した。1% heat-killed <i>L. brevis</i> SBL88を含むHFDを8週齢の雄性マウスC57BL/6Jに16週間給餌し、SBLマウスを作製した。各マウスはイソフルランで麻酔をかけた後、体</p>			

重測定と心臓からの採血を行い、生化学パラメータを分析した。採血後に肝臓を採取し組織学的検査、ウェスタンブロット (WB) 法、real-time PCR法での分析を行った。

● *in vitro* 共培養実験：ヒト肝癌細胞であるHuh7とヒト腸管細胞であるCaco-2 BBEをトランスウェルで共培養した。Huh7を下部のウェルで培養し、100 μ Mのパルミチン酸を負荷した。Caco-2 BBEを上部のウェルで培養し、heat-killed *L. brevis* SBL88を加えた群と加えない群を作り共培養開始後12時間と24時間時点でHuh7のRNAと蛋白を抽出し、real-time PCR法およびWBでの検討を行った。Huh7の脂肪滴はBODIPYを用いて評価した。

● 肝臓のTG含有量：マウス肝臓組織を粉砕し、酵素法によりTG濃度を分析した。

● 病理組織学的検査：肝臓を10%ホルマリン緩衝液で固定し、パラフィンに包埋して切片にし、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。脂肪滴はImageJソフトを使用して分析した。

● 腸内細菌叢の分析：terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法 (Nagashima法) を用いて腸内細菌叢を評価した。

● RNA sequencingとpathway解析：肝臓からRNAを抽出し、次世代シーケンサーIon Proton™システムでsequencingを行い、Genomics Workbench Systemで解析した。得られた結果を元にMetaCoreを用いてpathway解析を行った。

● 統計学的解析：各検討は2群間ではStudent's t検定、3群以上では分散分析 (ANOVA) を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。RNA sequencingにおいてはfold change > 1.5 かつ $p < 0.05$ を有意な変化ありとした。

成 績

1. SBLマウスにおけるNAFLD進展抑制効果

SBLマウスとHFDマウスの食餌摂取量は同程度であったがSBLマウスはHFDマウスに比較し有意に体重増加が抑制された。血液検査ではALT、総コレステロールおよびインスリン濃度に関してSBLマウスはHFDマウスに比較し有意に低値であったが、TGに有意な差はなかった。肝病理組織検査ではSBLマウスの脂肪滴の面積がHFDマウスより大幅に低下していた (SBL:4.2%、HFD:16.8%、 $P < 0.01$)。

2. SBLマウスの腸内細菌叢の変化

腸内細菌叢についての解析では既報の通りコントロール群と比較しHFDマウスではBacteroidalesの割合が減少し (HFD:3%、control:23.8%、 $P < 0.01$)、Erysipelotrichaceaeの割合が増加していた (HFD:50.3%、control:31.7%、 $P < 0.05$)。しかしHFD群とSBL群では腸内細菌叢の割合に有意な差を認めなかった (HFD:3%、SBL:6.4%、 $P = 0.77$ 、HFD:50.3%、SBL:42.7%、 $P = 0.45$)。

3. SBLマウス肝臓のRNA sequencing

SBLマウスおよびHFDマウスから得られた肝臓におけるRNA sequencingの結果、459/34,114遺伝子の発現が変化していた。MetaCoreを用いたpathway解析ではインスリンシグナルの変化を認めており糖脂質代謝経路が主要な分子経路の1つであることが示唆された。

4. SBLマウスにおける糖代謝

糖新生を制御することが知られているinsulin receptor substraete-2 (IRS-2)のmRNA発現がHFDマウスに比べSBLマウスで有意に亢進していたが、IRS-1の発現には有意差を認めなかった。IRS-2によって抑制されるFoxO1の発現はSBLマウスで有意に低下していた。FoxO1は肝臓での糖新生を促進するため、IRS-2の過剰発現によるFoxO1の抑制および糖新生の抑制がNAFLDへの進展を抑制している可能性が示唆された。

5. SBLマウスにおける脂質代謝

脂質代謝関連遺伝子のmRNA発現に関しては、SREBPはSBLマウスとHFDマウスで有意差を認めなかった。一方、IRS-1の下流にあるFASのmRNA発現はSBLマウスにおいて有意に低下していた。

6. *In vitro*におけるheat-killed L. brevis SBL88の効果

トランスウェルの上部にheat-killed L. brevis SBL88のみを加えた群およびCaco-2 BBEを培養したのみの群ではHuh7の脂肪滴は有意な差を認めず、Caco-2 BBEにheat-killed L. brevis SBL88を加えた群でのみHuh7の脂肪滴は減少していた。この群では*in vivo*の実験と同様にIRS-2のmRNA発現低下とWBでのFoxO1の発現低下を認めた。

考 案

今回我々は初めてheat-killed L. brevis SBL88にNAFLDの病態を改善する可能性があることを明らかにした。本研究ではSBLマウスにおいてIRS-2の発現が有意に高く、その結果IRS-2シグナルによって抑制されるFoxO1の発現も低下していた。このことからheat-killed L. brevis SBL88はIRS-2シグナルを介して糖新生抑制に寄与していると考えられる。一方、IRS-1の発現はHFDマウスとSBLマウスで有意差を認めず、これらの結果からheat-killed L. brevis SBL88はNAFLDの発症機序の1つである選択的肝インスリン抵抗性を部分的に改善できる可能性が示唆された。選択的肝インスリン抵抗性はM. S. BrownとJ. L. Goldsteinにより提唱された概念で2型糖尿病マウスにおいてインスリンが糖新生を抑制しない一方で脂肪新生は継続するというものである。

Heat-killed L. brevis SBL88は肝細胞の脂肪滴沈着を抑え、肝組織のTG上昇を抑えたが、血中TGの変化は認めなかった。また、脂質代謝を制御するIRS-1のmRNA発現にもHFDマウスとSBLマウスで有意差はなく、SBL88は血中TGは低下させずに肝組織のTGと脂肪滴の沈着を抑制する可能性が示唆された。

また、HFDマウスとSBLマウスで腸内細菌叢の割合に有意差はなく、heat-killed L. brevis SBL88は腸内細菌叢を変化させることなくNAFLDの進展を抑える効果を示しており、SBL88は個々の患者の腸内状態にかかわらずNAFLD予防薬となりうる可能性が示唆された。このことは*in vitro*の実験からも支持された。

今回の研究の限界としては第1に腸内細菌叢の解析がT-RFLP法によるもので、次世代シーケンサーによる解析は行っていない点である。しかし*in vitro*の結果から特定の微生物の影響を受けてい

る可能性は低いと考えられる。第2にSBL88は腸内細菌叢に関与せず直接的に影響を及ぼすことは推測できたが、エフェクター分子の同定はできていない点である。このエフェクター分子の解明にはさらなる研究が必要ではあるが、今回の研究で重要な点はheat-killed *L. brevis* SBL88は死菌でありこれまで報告されていたプロバイオティクスのように定着の必要がなく、すでに常習飲酒者に対する投与で安全性と忍容性が評価されていることである。

結 論

今回我々はNAFLDモデルマウスにheat-killed *L. brevis* SBL88単体投与により腸内細菌叢を変化させることなく選択的インスリン抵抗性を部分的に改善させNAFLDの病態が改善することを初めて明らかにした。




引 用 文 献

1. Segawa S, Wakita Y, Hirata H, Watari J. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates alcoholic liver disease in ethanol-containing diet-fed C57BL/6N mice. *Int. J. Food Microbiol.* 2008; 128: 371-7.
2. Wakita Y, Kanda H, Shimizu C et al. Effect of *Lactobacillus brevis* SBC8803 on gamma-glutamyl transferase in Japanese habitual drinkers: a double-blind, placebo-controlled study. *Food Nutr. Sci.* 2012; 3: 678-84.
3. Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab.* 2008; 7: 95-6.

参 考 文 献

1. Sawada K, Hayashi H, Nakajima S, Hasebe T, Fujiya M, Okumura T. Non-alcoholic fatty liver disease is a potential risk factor for liver injury caused by immune checkpoint inhibitor. *J Gastroenterol Hepatol.* 2020; 35: 1042-8
2. Nakajima S, Tanaka H, Sawada K, Hayashi H, Hasebe T, Abe M, Hasebe C, Fujiya M, Okumura T. Polymorphism of receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta gene in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2018; 33: 283-90
3. Hayashi H, Sawada K, Hasebe T, Nakajima S, Sawada J, Takiyama Y, Takiyama Y, Okumura T, Fujiya M. A Successful Case of Hepatocellular Carcinoma Treated with Atezolizumab Plus Bevacizumab with Multisystem Immune-related Adverse Events. *Intern Med.* 2022; 61: 3497-502

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	林 秀美
審査委員長 川辺 淳一 			
審査委員 入部 玄太郎 			
審査委員 中山 恒 			
学位論文題目 The effect of heat-killed <i>Lactobacillus brevis</i> SBL88 on improving selective hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease mice without altering the gut microbiota 掲載雑誌 : Journal of gastroenterology and hepatology 38, 1847-1854, 2023			
(審査評価・結果のみとし、800字以内で提出すること。)			
<p>本研究で、SBL88 菌の NAFLD 病態への効果を、高脂肪食負荷マウスモデルを用いて検証した。高脂肪食 (HFD) と共に加熱殺菌した SBL88 を与えると、体重増加と共に肝臓脂肪沈着が抑制された。一方で、腸内細菌叢には大きな変化は認められなかった。RNAseq 解析などから、SBL88 の作用機序としてインスリンシグナル IRS2 系の亢進による肝インスリン抵抗性改善作用である、さらに <i>in vitro</i> 細胞実験系から、SBL88 の作用は腸管上皮を介した肝への間接作用であることを明らかにした。</p> <p>本研究結果は乳酸菌あるいはこれらの成分が、NAFLD 治療戦略の選択肢となりえる可能性を示しており、今後の同疾患の治療法の発展に貢献する優れた研究である。各審査員の口頭試問および論文発表会での質疑応答から、研究の限界や今後の研究発展に対する展望についても十分理解しており研究テーマ周辺領域に対する知識は十分であると認めた (補足)。以上より本論文を学位論文として適切であると判定した。</p>			
補足 1 具体的な口頭試問での確認点については以下の通りである。			
① NAFLD の臨床上的課題含めた研究の動機、および研究内容の的確かつ明瞭な説明力。 ② SBL88 の肝臓への作用機序について、特に加熱滅菌 SBL88 の何が有効成分なのか？ 腸管上皮から間接的に働く標的分子について。 ③ SBL88 処理の肝臓以外の臓器への作用の可能性。 ④ 臨床応用にむけた次のステップにむけての課題点。 これらの点について適切な説明や考察が口頭試問および論文発表会での質疑応答でもなされていた。			