

NewsLetter Vol.18 No.1

NASH/NAFLDの基礎と臨床 ～病態解明に向けた新たな展開～

井戸 章雄 (鹿児島大学 消化器疾患・生活習慣病学)

日浅 陽一 (愛媛大学 消化器・内分泌・代謝内科学)

第53回日本消化器免疫学会総会 (2016年7月 於：大阪 会長：荒川 哲男)

〈シンポジウム1：NASH/NAFLDの基礎と臨床 ～病態解明に向けた新たな展開～〉 座長

当セッションではNASH/NAFLDの病態から治療法の開発まで、基礎的および臨床的な内容について幅広く題材を取り上げ、新たな展開につながることを模索し議論された。

まず、「NAFLD・NASHの病態形成と自然免疫」と題して、順天堂大学消化器内科学の池嶋健一先生に基調講演をいただいた。本邦においてNAFLDが増加している現状、その病態にはエネルギーバランスのシフトに伴うインスリン抵抗性を基盤とした代謝異常があること。それに加えて、脂肪組織の産生するアディポカイン、腸内細菌由来成分に対する自然免疫応答などの複数の要因が関わり、さらにPNPLA3 SNPsなどの遺伝的要因、エピジェネティックな制御機構が加わり、発症および進展に寄与するマルチプルパラレルヒット理論について概説された。また肝脂肪化に伴う肝細胞障害機序について、酸化ストレス、小胞体ストレスの関与、その成因としてミトコンドリア機能異常、オートファジーとの関連、VLDLの細胞外放出に関与するTM6SF2についても言及された。またNAFLDでみられる炎症、線維化、発癌と免疫との関わりについても概説された。

次に、演題1「アポトーシス抑制因子AIMと非糖尿病NAFLDの病態と

の関連の検討」が鹿児島大学 消化器疾患・生活習慣病学の小田耕平先生から発表された。Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM) はマクロファージに特異的に産生・分泌される蛋白である。メタボリック症候群、インスリン抵抗性を促進する一方、AIMが肝癌の発症に抑制的に作用することが報告されている。肝生検を施行したNAFLD 230例を糖尿病群、非糖尿病群の2群に分けて検討したところ、血清AIM値には有意差がなく、非糖尿病群のサブ解析で、血清AIM値はNAFL群に比べてNASH群では有意に高値であった。またHOMA-IR、肝線維化、肝病組織所見と相関したことから、NAFLからNASHへの病態進展に関わる細胞内分子と考えられ、非糖尿病NAFLDに対する新たな治療標的となる可能性が考えられた。

演題2は「NAFLDにおけるO-linked-b-N-acetylglucosamine修飾の関連とkupffer細胞への影響」について、大阪医科大学 第二内科の西川知宏先生より発表があった。O-linked-b-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) 修飾は、タンパク質にN-acetylglucosamineが付加される翻訳後糖鎖修飾で、既に糖尿病との関連は示唆されているが、NAFLDとの関連は不明であった。本検討では、NAFLD、HBVおよびHCVによる慢

性肝炎における肝組織を用いて、O-GlcNAc修飾を免疫染色して評価した。その結果、HBVおよびHCVによる慢性肝炎ではO-GlcNAc修飾は発現していなかったが、NAFLDでは発現がみられた。また同時にkupffer細胞の発現型を細胞表面マーカーの蛍光染色で検討したところ、NAFLDのマクロファージはM2マクロファージであった。M2マクロファージは抗腫瘍免疫を抑制することから、これらの事象がNAFLDの発癌に影響している可能性が考えられた。発表後の議論では、O-GlcNAc修飾がどのようにM2マクロファージに影響するのか、またNASH、NAFLの差、肝線維化と炎症との関連についても議論された。

演題3では「インスリン抵抗性と腸内細菌の非アルコール性脂肪肝炎への関与についての検討」が、岡山大学消化器肝臓内科の和田望先生より発表された。同研究では、インスリン抵抗性と腸内細菌叢由来パターン認識受容体 (TLR) シグナルに注目してNAFLからNASHへと病態が進行することへのサイトカインの関与について検討された。NAFLD患者と健常者の血清をBio-Plex Proヒトサイトカインアッセイパネルを用いて解析したところ、NAFLD患者でMIP-1 α が高く、健常者からNASHに進行するに従ってIP-

10の段階的な増加がみられた。またCD14陽性ヒト単球細胞株であるTHP-1では、高glucose-インスリン添加群でMIP-1 α が高く、さらにTLR2 ligand添加群でIP-10の発現増加がみられた。NAFLDにおけるインスリン抵抗性の増加と、TLRシグナルの増加がIP-10の段階的上昇を介してNASHへの進行に関わる可能性が示唆された。発表後、TLR刺激としての腸内細菌叢の役割や、それによるIP-10発現機序、またむしろ腫瘍阻害作用があるとも考えられるIP-10が増加することによるNASHの発癌機序について議論があった。

演題4は「非アルコール性脂肪肝炎(NASH)肝線維化病態へのケモカイン受容体CCR9の関与」について、慶応義塾大学 消化器内科の三宅麗先生より発表があった。肝線維化に関与するCCR9陽性マクロファージ急性肝障害及び肝線維化の病態に関与しているが、本研究ではNASHの病態におけるケモカイン受容体CCR9の関与がCCR9KOマウスを用いて検証された。同マウスに高脂肪高コレステロール食(HFHC)を負荷したところ、通常のマウスに負荷した場合と異なり、肝細胞内脂肪滴の蓄積が減少した。また、TNF- α 、IL-1 β 、LIGHTなどの炎症性サイトカイン、 α SMA、Collagen 1、TGF- β 、Timp1などの線維化マーカーのmRNA発現が低下し、肝組織の線維化が有意に抑制された。また、CCR9KOマウスではTNF産生能を有する免疫細胞数が低下しており、肝線維化抑制に関与していることが示唆された。発表後、CCR9を介した免疫細胞の誘導とそれに伴う炎症が、NASHの病態にどのように関わるか、またCCR9KOによる肝類洞壁細胞、肝星細胞への影響の有無、また同マウスでみられた肝組織における脂肪沈着、ballooningの差異などが議論された。

演題5では、「NASHにおける小腸粘膜からの食事由来パルミチン酸の吸収動態変化と病態への影響」について、愛媛大学 消化器・内分泌・代謝内科学の宇都宮大貴先生が発表した。NASH

の病態において、肝臓における酸化ストレス、炎症に関わるkeyとなる栄養素として、長鎖脂肪酸のひとつであるパルミチン酸に注目し、同脂肪酸の吸収動態を内視鏡を用いて解析した検討である。固体となるパルミチン酸を液状化して上部消化管内視鏡を十二指腸水平部まで挿入し、噴霧して、その吸収動態を見た結果、病初期のNASH患者(Brunt stage 1-2)において、全体に吸収の亢進がみられた。また、比較的進行したNASH患者では投与早期の吸収は亢進しているものの、投与後期では吸収が低下し、肝障害の進行に伴う β 酸化能の低下が原因として考えられた。一方、小腸粘膜生検を用いた検討で、病初期のNASHにおける小腸粘膜のCD36活性化、粘膜細胞内のMTTP発現増加がみられ、パルミチン酸吸収促進に関与していることが示唆された。発表後、NASHの進行に伴うパルミチン酸吸収経路の変化の有無、腸内細菌叢の変化との関連、NASHに関連する遺伝子多型との関係などが議論された。

演題6「腸管透過性を介した非アルコール性脂肪肝炎の病態進展における腸内細菌叢とエンドトキシンの関連性の検討」は、横浜市立大学 肝胆膵消化器病学の結束貴臣先生より発表された。NAFLDにおける腸内細菌叢と病態との関連について、腸内細菌叢に由来すると考えられるエンドトキシンを測定し、NASH発生機序との関連を検討した。まず、NAFLD患者の腸内細菌叢について解析したところ、*Faecali-bacterium*属(*F.B.*)の有意な低下がみられた。また、NASHの肝線維化進行に伴い、*F.B.*は低下し、エンドトキシン活性値の増加がみられた。腸管透過性の評価をラクトローズ・マンニトール試験で行ったところ、NASHの高度肝線維化進展例ではlactulose mannitol ratio (LMR)が上昇しており、*F.B.*、エンドトキシン活性、LMRに各々有意な相関がみられた。NAFLDでは*F.B.*低下がみられ、それに伴う腸管透過性亢進、血中エンドトキシンの増加が、NASHの発症、

病態進展に寄与していると考えられた。*F.B.*はエンドトキシン非産生菌であり、発表後はエンドトキシン増加を来す機序についての議論があったほか、NASHでみられるballooningとの関係、肝線維化に伴う門脈圧亢進症による腸管透過性亢進との関係などについて議論があった。

演題7では「高脂肪食・抗生物質によるマウス脂肪性肝疾患の病態変化に伴う肝内免疫細胞の検討」について、慶応義塾大学薬学部 山田翔士先生が発表した。高脂肪食による腸内細菌叢の変化や、脂肪酸代謝の変化について肝内免疫細胞に注目して検討した。高脂肪食を負荷したマウスと、その後抗生剤を投与したマウスで比較したところ、抗生剤投与群では脂肪肝の改善、肝臓内TG濃度の低下がみられた。肝内脂肪酸合成や β 酸化は抗生剤投与による変化はみられなかった。腸内細菌叢の解析では、高脂肪食により*Clostridium*属subcluster 14aの増加がみられ、糞便メタボローム解析ではC14から26の飽和脂肪酸が増加していた。これらは抗生剤の投与により低下した。高脂肪食群では肝内マクロファージが増加し、TNF α 、IL-1 β 、MCP-1が有意に増加し、抗生剤投与により減少した。また、単離した肝マクロファージにパルミチン酸を添加したところ、高脂肪食を負荷したマウスでのみTNF α 発現の亢進がみられた。これらのことから、高脂肪食負荷により肝内マクロファージが増加し、炎症性サイトカイン産生能の亢進、その結果、NASHの病態進展に関わっている可能性が考えられた。発表後、炎症性サイトカイン増加の機序としての腸内細菌叢の関与、吸収量に変化する飽和脂肪酸の種類とNASHの病態との関連、治療法として考えられる方法などについて議論があった。

本シンポジウムでは、肝疾患の中で最も関心の高い領域となりつつあるNAFLD、NASHについて、その病態の複雑さを改めて認識するとともに、その病態には肝臓だけではなく、消化管、腸内細菌叢、脂肪組織からのサイ

トカインなど、様々な要因が関与していることが複数の検討で明らかになった。また、多数の消化管領域の専門の

先生を交えて議論することで、新たな視点、アイデアも供出され、活発で実りのある議論となった。本企画を考案

された、会長の荒川哲男先生に深く御礼を申し上げたい。

消化器疾患とマイクロバイオータ ～腸内細菌を学び、消化器疾患を知る～

内藤 裕二 (京都府立医科大学大学院医学研究科 消化器内科学)

藤原 靖弘 (大阪市立大学大学院医学研究科 消化器内科学)

第53回日本消化器免疫学会総会 (2016年7月 於:大阪 会長:荒川 哲男)

〈シンポジウム2:消化器疾患とマイクロバイオータ ～腸内細菌を学び、消化器疾患を知る～〉座長

本シンポジウムは内藤裕二 (京都府立医大) と藤原靖弘 (大阪市大) の司会により行われた。内容は食道から大腸までの消化管のみならず、肝臓や膵臓を含む消化器疾患全般とマイクロバイオータとの関連についての多彩な研究であり、活発な討論がなされた。

沢田ら (大阪市立大学) は逆流性食道炎ラットモデルを用いて、T-RFLP解析によるマイクロバイオータの病態への関与を報告した。使用したモデルは食道空腸吻合術による慢性胃・十二指腸逆流モデルであり、バレット食道発生率と食道腺癌発生率とマイクロバイオータとの関連をみたものである。胃粘膜保護薬rebamipideの治療により、バレット食道と腺癌の発生率が共に抑制されるが、その抑制効果に *Lactobacillales* の関与を示した。ヒトの逆流性食道炎では同様の研究は極めて少なく、癌予防に対するマイクロバイオータ解析からの新たな展開を期待できる内容であった。

灘谷ら (大阪市立大学) は胃内のマイクロバイオータに関する報告であった。生検検体を利用した16S rRNA シークエンス解析であり、胃内にはピロリ菌以外にも多くの細菌叢の存在を明らかにした点で新たな知見であった。生検検体を使用しているため、その細菌叢はいわゆる粘膜関連細菌叢と考えられ、ピロリ感染の有無によるデータ解釈にも、粘液層の関与があると考ええる。ピロリ菌を除菌してもその後の胃癌発生は比較的高頻度であり、胃癌とマイク

ロバイオータと関連に関する研究が進むことを期待したい。

加藤ら (横浜市立大学) らは、プロトンポンプ阻害剤 (PPI) 投与後の16S rRNA シークエンス解析による腸内細菌叢の変化とメタボローム解析による代謝物の変化を報告した。PPI投与後便中 *Actinobacteria* 門、特に *Bifidobacterium* 属が有意に減少し、代謝物として β -Try と Malic acid が減少し、Piperidineが増加することを見いだしている。マイクロバイオータが様々な代謝物を生成することが知られており、その中には創薬の標的になるものもある。マイクロバイオータを標的にした予防・治療を考慮した場合、こういった代謝物の解析、同定が今後の大きな研究テーマである。

高城ら (防衛医科大学) は心的外傷ストレスモデルを用いて、定量的PCRによるマイクロバイオータの解析を報告した。重要なことは、ストレス環境下では行動パターンによって変化するマイクロバイオータが異なることで、さらにその変化が直接あるいは間接的に生体側の遺伝子発現に影響を与えることである。バリア機能にとって重要な密着結合に関与する分子種の変化とマイクロバイオータの変化との関連を追及することが重要な課題となる。

村上ら (京都府立医大) は母子分離ストレスモデルを用いて大腸の運動機能ならびに腸内細菌叢の影響を報告した。母子分離ストレスにより腸内細菌叢の構成の変化が見られ、CRHに対する反応性亢進ならびに腸管運動の亢進が確

認された。臨床的にIBSと腸内細菌叢との関連を示す根拠が報告されつつあり、基礎的な病態解明として今後の発展が期待される研究である。

山口ら (愛知医科大学) は、*Clostridium difficile* (CD) 関連疾患の実態調査を報告した。検査施行4366症例中のCD陽性率は23.7%であり、Toxin A+Bが大半を占めていた。IBD患者での陽性率は10.8%であること、Binary toxin陽性例はまれであったこと、予後は良好であったことを報告した。今後、欧米のように有病率、特に難治例の増加について注意深い監視が必要であることが認識された。

小宮ら (横浜市立大学) は大腸癌患者における局所ならびに唾液中の *Fusobacterium* 属細菌の相同性について検討した。結果、*Fusobacterium* の相対存在率は非癌部に比べて癌部で高く、大半が *Fusobacterium nucleatum* であった。検出された *Fusobacterium* は唾液・癌組織に相同性が確認され、口腔内由来である可能性を示唆した。大腸癌における腸内細菌の関与は現在のトピックスであり、介入試験など今後の検討が期待される。

渡邊ら (近畿大学) は、poly (I:C) をMRL/MpJマウスに反復投与することによりヒトIgG4関連疾患モデルとして自己免疫性膵炎を作成し、様々な免疫担当細胞やサイトカインの動態を確認した。さらに抗生剤投与により膵炎発症抑制を観察した。腸内細菌に対する免疫応答が膵炎発症に影響を及ぼ

す興味深い研究であり、自己免疫性膵炎の病態に迫る研究として今後期待される。

中本ら（慶應義塾大学）らはConA反復投与による肝臓内の免疫寛容における腸内細菌叢の関与を検討した。免疫寛容期に*Lactobacillus*属が増加することを確認し、腸管除菌後のマウスに単

菌移植を行いConAによる肝障害を誘導したところ、腸管粘膜のIntegrity保持と肝臓への免疫担当細胞増加、肝障害減弱が確認された。特異的腸内細菌と肝疾患との関与を基礎的に証明した研究として重要である。

本シンポジウムでは、様々な消化器疾患において腸内細菌の構成が異なる

ことを示す研究が多かった。それら細菌叢の変化が原因なのか結果なのかはまだまだ不明である。多くの研究は特定の細菌種は同定されておらず、病態機序も不明な点が多い。今後、腸内細菌と臓器との関連において疾患病態解明や創薬につながることを期待してシンポジウムの報告を終える。

炎症性腸疾患の病態への腸内細菌の関与の深さは？

安藤 朗（滋賀医科大学医学部 消化器内科）

金井 隆典（慶應義塾大学医学部 消化器内科）

第53回日本消化器免疫学会総会（2016年7月 於：大阪 会長：荒川 哲男）

〈シンポジウム3：炎症性腸疾患とマイクロバイオータ～免疫応答からみた病態解明と治療～〉 座長

さまざまな免疫関連の遺伝子改変マウスにIBD類似の慢性腸炎が自然発症するが、これらのマウスを腸内細菌が成立しない無菌環境下で飼育しても腸炎は発症しない。また、IBDはヒトの消化管のうち特に細菌が豊富に存在する回腸末端から大腸に好発する。これらのことから、IBDの発症に腸内細菌の存在は必須であると考えられてきた。さらに、腸内細菌研究の進歩から、IBDと健常人には腸内細菌の構成の違い（Dysbiosis）があり、このdysbiosisが病気の発症、進展に影響しているのではないかと考える説明がなされてきた。ところが、*Clostridium difficile*腸炎に高い有効率が報告されている糞便移植の効果がUC患者では限定的であることが明らかになりつつある。すなわち、IBDの病態における腸内細菌の意味について、質的な変化よりも腸内細菌叢というmassとしての存在に意味があることが臨床経験から明らかになりつつある。そのような背景の中で、IBDの病態を腸内細菌との関わりの中から明らかにすることを目的としたシンポジウムが企画された。

まず、大阪大学の竹田 潔教授には、

腸上皮の表面を覆う粘液層恒常性の維持機構について基調講演をいただいた。竹田先生らのグループが発見されたLypd8という蛋白が、大腸の内粘液層（外粘液層と異なり、内粘液層は無菌に保たれている）の維持に重要な役割をはたしており、Lypd8遺伝子を欠失したマウスでは腸内細菌が容易に上皮細胞と接触しさらに陰窩に侵入する。腸内細菌と上皮細胞の直接的な接触が腸管炎症のトリガーになることが知られていることから、Lypd8は強固な粘液層を維持することによって腸内細菌と上皮細胞の直接の接触をブロックすることによって腸管の恒常性の維持に寄与していることを示していただいた。粘液層が上皮と細菌の間の壁の様な働きにより炎症刺激の伝達をブロックしているものと推察される。

次に、兵庫医科大学の高川先生らは、IBD感受性遺伝子として報告されているLRRK2という分子がautophagyに対する負の制御因子であることを示された。LRRK2の発現が腸内細菌叢の構成に影響して恒常性の維持に寄与している可能性を示された。

北里研究所病院の黒沼先生らは、高

脂肪低炭水化物食が腸内細菌叢の中の*Lactobacillus*の増加と*Bacteroides*の減少を誘導することを報告された。以前の報告では脂肪は腸管炎症にたいして刺激的に作用し、食物繊維に代表される炭水化物は短鎖脂肪酸の産生などを介して抗炎症的に作用するとされてきた。多少、これまでの報告と相反する結果とも捉えられるが、腸内細菌叢の変化からは抗炎症作用が予想され興味深い結果と感じられた。

最後に、慶應義塾大学の寺谷先生らは、迷走神経の肝臓枝を遮断することが腸炎の悪化につながることを見いだされた。一方、この減少は抗菌剤投与マウスやMyd88欠損マウスではみられなかったことから、腸内細菌かその代謝産物が迷走神経を介して腸炎に対して防御的に作用していると説明された。神経を介した腸炎に対する作用を初めて明らかにした画期的な発表と考えられた。

以上、腸内細菌はさまざまな作用を介して腸内環境の恒常性に寄与していることが明らかになった。