

氏 名	松井 將太
(ふりがな)	(まつい まさひろ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲博医第27号
学位審査年月日	令和4年1月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Ileal bile acid transporter inhibitor improves hepatic steatosis by ameliorating gut microbiota dysbiosis in NAFLD model mice (腸内胆汁酸トランスポーター阻害剤は、腸内細菌叢の乱れを修正することにより NAFLD モデルマウスの肝脂肪化を改善する)
論文審査委員	(主) 教授 高井 真司 教授 田中 慶太郎 教授 中村 志郎

学位論文内容の要旨

《序 論》

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) には現時点で効果的な薬物療法はない。その発症には、腸内細菌叢の dysbiosis や胆汁酸が関与すると指摘されている。胆汁酸には一次胆汁酸と二次胆汁酸があり、腸内細菌によって一次胆汁酸から二次胆汁酸が合成される。いずれの胆汁酸も回腸末端に存在する ileal bile acid transporter (IBAT) により再吸収されるが、二次胆汁酸は回腸末端の腸管細胞における Fibroblast growth factor 15 (Fgf15) 産生亢進と肝臓の cholesterol 7-alpha-hydroxylase (Cyp7a1) 産生抑制を導くことで肝脂肪化を促す。IBAT inhibitor (IBATi) はマウスでの NAFLD 発症を予防すると報告されるも、腸内細菌叢の dysbiosis にどのような影響を与えるかは不明である。今回、

申請者らはIBATiが腸内細菌叢の変化を介してNAFLDにどのような影響を与えるか検討した。

《方 法》

6週齢雄のC57/BL6マウスに対し12週間、High fat diet (HFD) 及びElobixibat 2.5 $\mu\text{mol/kg}$ を経胃投与してHFD+IBATiマウスを作製した。同様にHFDのみを投与してHFDマウスを、通常食を投与してControl dietマウスを作製した。便移植実験では6週齢のマウスに8週間HFDを投与しつつ、10週齢時に消化管滅菌後HFD+IBATiマウスの便(50mg/マウス)を2日毎に3回移植して、HFD+IBATi便移植マウスを作製した。また、対照群として同方法でHFDマウスの便を移植しHFD便移植マウスを作製した。治療効果の検討では6週齢雄マウスに12週間HFDを投与し、その12週齢時からElobixibatを6週間投与してIBATi-Txマウスを作製した。各群のマウスより血清、肝臓、回腸末端、便を採取した。血清AST、ALT、Total Cholesterol (T-Cho)、LDLをELISA法で測定した。腸内細菌叢解析は便の16S rRNA解析を行い、便中胆汁酸は高速液体クロマトグラフィーで測定した。肝臓の*Cyp7a1*及び回腸末端の*Fgf15*の遺伝子発現量はreal time-PCR法で測定した。肝脂肪化はNAFLD activity scores (NAS)で病理学的に評価した。

《結 果》

HFDマウスで認めた肝のNAS上昇、血清AST、ALT、T-Cho、LDL上昇、回腸末端の*Fgf15*発現上昇、肝臓の*Cyp7a1*発現低下はHFD+IBATiマウスにてすべて改善を認めた。また、HFDマウスの便中には二次胆汁酸である ω -Muricholic acid (ω MCA)を多く認めたがIBATi投与で減少した。腸内細菌叢の検討では、HFDマウスで認めた α 多様性の低下はIBATi投与にてControl dietマウスと同レベルまで回復した。 β 多様性では異なるクラスター形成を認めた。科レベルではHFDマウスで増加した*Streptococcaceae*はIBATi投与にて低下した。*Streptococcaceae*と判定した配列はBasic Local Alignment Search Toolにより*Lactococcus lactis*もしくは*Lactococcus cremoris*であると特定され

た。これらの菌による胆汁酸代謝の影響を Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes で調べたところ、一次胆汁酸を脱共役する bile salt hydrolase を保有すると判明した。また、HFD マウスでは脱共役後の胆汁酸から二次胆汁酸を合成する 7α -dehydroxylase をもつ *Lachnospiraceae Dorea* も増加しており、複合的な腸内細菌叢の変化が二次胆汁酸増加につながると考えられた。

次に腸内細菌叢の変化が NAFLD に影響するかを便移植にて検討した。HFD+IBATi 便移植マウスは HFD 便移植マウスと比較し脂肪肝とその他パラメータの改善を認めた。また、HFD+IBATi 便移植マウスでは便中の MCA が減少し、腸内細菌叢の比較でも *Streptococcaceae* が減少した。

最後に IBATi の治療効果を調べた。IBATi-Tx マウスでも同様に脂肪肝とその他パラメータはすべて改善した。IBATi-Tx マウスの便中の MCA は低下し、腸内細菌の解析でも *Streptococcaceae* は減少した。

《 考 察 》

IBATi は胆汁酸代謝において重要な役割を示すが、IBATi 以外にも IBAT を阻害する菌が知られている。特に腸内病原性大腸菌は type 3 secretion system を介し IBAT を阻害するが、今回の腸内細菌叢解析では認めなかった。その他の腸内細菌による IBAT への影響については、今後の研究テーマの一つと考えられる。

《 結 論 》

IBATi は腸内細菌叢の変化を介して NAFLD モデルマウスの肝脂肪化を改善した。

論文審査結果の要旨

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) には、現時点で効果的な薬物療法はない。その発症に腸内細菌叢の *dysbiosis* や胆汁酸が関与すると指摘されている。腸内細菌により一次胆汁酸から二次胆汁酸が合成される。いずれの胆汁酸も回腸末端に存在する ileal bile acid transporter (IBAT) により再吸収されるが、二次胆汁酸は回腸末端の腸管細胞における Fibroblast growth factor 15 (Fgf15) 産生の亢進と肝臓の cholesterol 7-alpha-hydroxylase (Cyp7a1) 産生を抑制して肝脂肪化を促す。IBAT inhibitor (IBATi) はマウスでの NAFLD 発症を予防するも、腸内細菌叢の *dysbiosis* にどのような影響を与えるかは不明である。今回、申請者らは IBATi が腸内細菌叢の変化を介して NAFLD にどのような影響を与えるかを検討するため、モデルマウスを作製した。まず、6 週齢マウスに対し 12 週間、High fat diet (HFD) 及び IBATi を経胃投与し HFD+IBATi マウスを、HFD のみを投与し HFD マウスを作製した。次に腸内細菌叢の変化が NAFLD に影響するかを検討するため便移植モデルを作製した。6 週齢マウスに 8 週間 HFD を投与しつつ、消化管滅菌後 10 週齢時に HFD+IBATi マウスの便を移植し、HFD+IBATi 便移植マウスを作製した。対照群として HFD マウスの便を移植し HFD 便移植マウスを作製した。その結果、HFD+IBATi 便移植マウスは肝の NAFLD activity scores 低下、血清 AST、ALT、LDL 低下、回腸末端の *Fgf15* 発現低下、肝臓の *Cyp7a1* 発現上昇を認めた。また、HFD+IBATi 便移植マウスでは二次胆汁酸である ω MCA が便中で減少し、腸内細菌叢の比較でも *Streptococcaceae* が減少した。これらの結果より IBATi は腸内細菌叢の変化を介し NAFLD モデルマウスの肝脂肪化を改善したことが示唆された。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

mBio 12(4): e0115521, 2021 Aug

doi: 10.1128/mBio.01155-21