



シリーズ 腸内細菌叢 6

# 肥満による肝がん促進機構と腸内細菌

## Obesity-induced liver cancer development and gut microbiota

おお たに なお こ  
大 谷 直 子  
Naoko Ohtani

### キーワード

腸内細菌、癌、腸肝循環、LPS、デオキシコール酸

### はじめに

ヒトの腸内には500～1000種類ほど、数にして100兆個以上の腸内細菌が存在するといわれており、腸内細菌は宿主が代謝できない物質を代謝したり、宿主の免疫システムを調節して宿主と共生している。近年、次世代シーケンサーによる大量のシーケンシングやメタボローム解析技術といった網羅的解析技術の発達により、菌を単離できなくても、菌に由来するDNAの塩基配列により菌を分類したり、菌による代謝物の種類を明らかにできるようになってきた。そして、その腸内細菌が産生する代謝物は、ヒトの病態に様々な影響を及ぼしていることが明らかになってきている。正常細胞が癌化する場合、通常、多くのケースでは遺伝子変異に起因すると考えられる。しかし、腸内細菌のもつ毒素やタンパク質、腸内細菌による代謝産物により、発癌の鍵となる癌遺伝子産物が活性化したり、DNA損傷や遺伝子変異を促進し、それが発癌につながるケースが考えられる。また、腸内細菌により発癌の影響を受ける標的臓器は、腸管はもちろんのこと、腸管以外の全身の臓器も腸内細菌の代謝物や菌体成分等に曝され、影響を受けていることが次々と報告されている。特に肝臓は、腸管から吸収されたそれらの物質が門脈を通じて90%以上が肝臓に運ばれ、その後一部は胆汁中に排出され、また再び腸管から再吸収される腸肝循環という循環を介して、長期にわたって腸内

細菌の影響を受ける臓器であると考えられる。本稿では、腸内細菌叢由来の菌体構成成分や代謝産物等による発癌促進作用という視点から、腸肝循環により腸内細菌代謝物の影響を受ける肝臓に焦点を絞り、腸内細菌により癌が促進される可能性について、考えられるメカニズムを概説する。

### I. 体内を循環する腸内細菌関連物質

腸内細菌はヒトが代謝できない物質を代謝し、そして、その代謝物はヒトの病態に様々な作用を及ぼしていることが明らかになってきている。例えば、腸内細菌が食物繊維を代謝して産生する酢酸、プロピオン酸、酪酸等の短鎖脂肪酸(特に酪酸)はエピジェネティックなメカニズムで制御性T細胞の誘導を介して炎症を抑制することが示されている<sup>1)</sup>。また、Gタンパク質共役受容体に短鎖脂肪酸が結合し、肥満の制御にもかかわっている<sup>2)</sup>。一方、菌体構成成分、例えば、グラム陰性菌の外膜成分であるLPS(リポポリサッカライド、lipopolysaccharide)やグラム陽性菌の細胞壁構成成分のリポタイコ酸は、それぞれ、自然免疫受容体TLR4(Toll-like receptor 4)<sup>4)</sup>やTLR2を介して炎症を誘発することが知られている。また、腸内細菌が一次胆汁酸を代謝して産生する二次胆汁酸のデオキシコール酸やリトコール酸はDNA損傷を誘発し、発癌に寄与すると考えられる<sup>3)</sup>。

腸内細菌の代謝産物は菌が存在する腸内だけでなく、腸から吸収されて血中に入り、腸から離れた遠隔臓器にも作用する<sup>4,5)</sup>。特に肝臓という臓器に関しては、腸管から吸収されたそれらの物質のほとんどが門脈を通じて肝臓に運ばれ、その後一部は胆汁中に排出されてまた腸管から再吸収される腸肝循環

という循環を介して、長期にわたって腸内細菌の影響を受けると考えられる。

## II. 腸内細菌と肝硬変および肝硬変関連肝がん

慢性肝炎から肝硬変という病態にまで進行すると、肝がんを併発するケースが多いことはよく知られている。その際、グラム陰性腸内細菌細胞壁外膜成分のLPSが肝硬変や、肝硬変に合併する肝がんの発症に重要であることが示された。2007年 Schwabeらのグループは、LPSを認識する自然免疫受容体TLR4を介する炎症シグナルによって、肝硬変を促進することを報告した<sup>6)</sup>。TLR4を介するシグナルは、肝臓の間質に存在するマクロファージを活性化すると同時に、肝星細胞に影響し、TGF-betaの抑制因子の発現を低下させることによって、TGF-betaシグナルを活性化し、肝線維化を促進することが報告された。また最近、肝硬変患者における腸内細菌の解析結果が報告された<sup>7)</sup>が、肝硬変患者ではグラム陰性菌が増加しており、肝硬変患者においてはSchwabeらが報告した機構が働いている可能性があること示唆される。またさらに同グループは四塩化炭素誘発性肝硬変にともなう肝がん発症のマウスモデルで、低濃度のLPSの持続投与が肝がんを促進することを示した<sup>8)</sup>。以上の知見から、肝硬変にともなう肝がんの誘発にLPS-TLR4経路を介する炎症が関与している可能性がある。

## III. 腸内細菌と非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)

近年、ワクチンの開発や肝炎ウイルスそのものに対する治療薬の進歩により、ウイルス性肝炎患者数は減少に転じ、肝炎ウイルスのキャリアー数も著しく減少している。その一方で、非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis, NASH) は増加傾向が著しい。あまり症候性のない単純脂肪肝から、2割程度の患者が、明らかな肝炎症状を示すNASHに進行することが知られているが、なぜ、病原体の見当たらない単純脂肪肝から、炎症細胞の浸潤が生じるのか、そのメカニズムは十分に明らかになっていなかった。この疑問に対して、近年、グラム陰性

腸内細菌の外膜の構成成分であるLPSが関与しており、LPSの低濃度かつ長期間にわたる肝臓への暴露が、NASHの引き金になることが示された<sup>9)</sup>。さらに、高脂肪食や果糖の過剰摂取による肥満病態では腸のバリア機能が低下したleaky gut状態になっており、腸内細菌の成分が腸管から吸収されやすくなっていることが示唆されている。また、LPSをリガンドとして認識する自然免疫受容体TLR4の共受容体であるCD14が脂肪肝では発現が高まっていることも示され、脂肪肝ではLPS-TLR4の経路が活性化しており、低濃度のLPSの長期暴露が慢性肝炎を惹起する可能性が示された<sup>9)</sup>。

## IV. 肥満と腸内細菌

2005年、Jeffery Gordonらはレプチン遺伝子に変異のあるob/obマウスの腸内細菌を解析し、野生型マウスの腸内細菌と比較して、ob/obマウスではBacteroidetes門が少なくFirmicutes門(グラム陽性菌)が増えており腸内細菌全体の50%以上を占めていることを報告した<sup>10)</sup>。翌年、同じグループは、ヒトにおいても同様に肥満したヒトの腸内細菌を解析した結果、マウスと同様にFirmicutes門が多く、同じ個体が痩せていくと、Firmicutes門が減少し、Bacteroidetes門の割合が増えていくことを示した<sup>11)</sup>。後述の研究で、筆者らのグループも高脂肪食をマウスに摂取させ肥満させたところ、Firmicutes門が肥満マウスでは著しく増加していることを確認し、Gordonらの報告と同様の肥満による腸内細菌の変化を確認している<sup>12)</sup>。これらの研究結果から、肥満に伴い、腸内細菌の構成が大きく変化することがますます明らかになった。

また、Gordonらは腸内細菌が肥満を誘導することを明らかにした。近年、個々の腸内細菌の機能解析が発達した理由のひとつに、無菌マウスの飼育方法が確立されたことがあげられる。無菌動物は帝王切開によって取り出した新生仔をアイソレーター内に無菌的に搬入し、人工保育することによって得られる。現在では、無菌コロニーが確立されているため、既存の無菌動物を里親とすることによって新たな無菌マウスを得ることができるようになっている。この無菌マウスに既知の1種類または複数の菌株のみを摂取させ腸内にそれらの菌を定着させたマ

ウス、すなわちノトバイオートマウスの作製によって、同グループから非常に興味深い報告が2013年になされた<sup>13)</sup>。Gordonらのグループは肥満した双子のヒト腸内細菌、または、やせている双子のヒトの腸内細菌を無菌マウスに定着させる実験を行った。その結果、肥満した双子由来の腸内細菌が定着したマウス(以後、Obと記載)は、やせている双子由来の菌が定着したマウス(以後、Lnと記載)よりも、有意に体脂肪量が増加しており、肥満することが明らかになった。この研究結果は、肥満している個体の腸内細菌には肥満を促進させる菌が存在し、宿主のエネルギー供給を亢進させる働きがあることを示唆している。さらにこの報告では、LnとObを同じケージで飼育するコハウス(cohouse)実験を行ったところ、LnとコハウスしたObは、コハウスしないObに比べて体脂肪量が有意に減少した。このことはLnのマウス、すなわち肥満していないマウスに定着している菌のほうが肥満しているマウスに定着している菌に打ち勝ち、腸内に定着し得る能力があることを示している<sup>13)</sup>。

## V. 腸内細菌と肥満誘導性肝がん

非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)を素地とする肝がんにはウイルス性肝炎に伴う肝がんと同様、肝硬変を経過して発症する肝がん以外に、肝硬変をほとんど認めず肝がんを発症する例が多く報告されている<sup>14)</sup>。肝硬変を伴わないNASH肝がんは、それ特有の肝がん発症機構が存在する可能性があると考えられる。

最近、筆者らは肥満とともに増加する腸内細菌の代謝物デオキシコール酸により肝がんが促進されるメカニズムを明らかにした。筆者らは新生仔マウスに化学発癌剤、DMBA(7,12-dimethylbenz[a]anthracene)を1回のみ塗布し、その後、肥満させる実験を行ったところ、食餌性肥満マウス、遺伝性肥満マウスとも、普通食摂取群のマウスに比べて、有意に肝がんを多く発症することを確認し、肥満という病態が、肝がんを促進する可能性があることが示唆された<sup>12)</sup>。さらに肝がん組織の詳細を調べたところ、肝星細胞において、「細胞老化」が生じており、細胞老化に伴って発癌促進作用のある多くの炎症性サイトカインやプロテアーゼなどが分泌されるSASP(se-

nescence-associated secretory phenotype)と呼ばれる現象が生じ<sup>15)</sup>、発癌促進的な微小環境を形成していることが明らかになった(図1)。

細胞老化とは、正常細胞に発癌の危険性があるDNAダメージ等が生じると誘導される、不可逆的増殖停止状態であり、生来正常細胞に備った癌抑制機構である<sup>15)</sup>。しかし、細胞老化を起こした細胞はすぐには死滅せず長期間生存し続けるため、周囲に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられていた。そのひとつがSASPという現象である。上述した肥満誘導性肝がんの組織では、肝星細胞において、細胞老化の原因であるDNA損傷の蓄積や、細胞老化の誘導因子であるp21やp16の発現が見られ、細胞老化を起こしていると考えられた。さらに肝星細胞においてはSASP因子として知られる様々な種類の炎症性サイトカインやケモカインも検出された。このことから肥満により肝星細胞にDNA損傷が起こり、細胞老化とそれに伴うSASPが起こることで、発癌促進作用がある炎症性サイトカインが分泌され、結果的に周囲の肝実質細胞の癌化が促進された

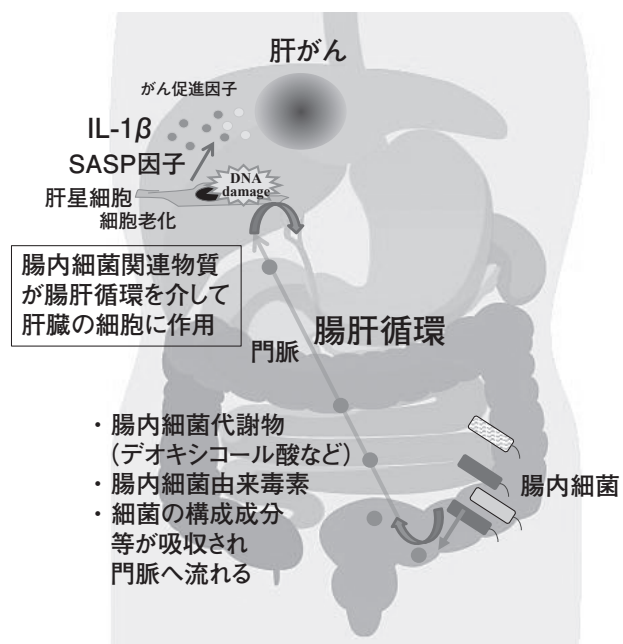


図1 肥満によって変化する腸内細菌の代謝産物が肝がんを促進する

肥満により腸内フローラが変化し、2次胆汁酸産生菌が増加する。それにより一次胆汁酸のコール酸が代謝され、2次胆汁酸のデオキシコール酸の濃度が上昇する。腸内のデオキシコール酸は約90%が吸収され、門脈を介して肝臓に達し、肝臓の間質に存在する肝星細胞の細胞老化を誘発し、それによって分泌されたSASP因子が肝がんを促進する(文献12、Supplementary Figure16の一部を改変)。

のではないかと考えられた (図 2)。

この仮説を検証するため、次に肝星細胞からの SASP 因子の産生を抑制することを試みた。まず、SASP 因子でありかつ、他の様々な SASP 因子の発現に必要な、サイトカインカスケードの上流に位置する炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  をコードする遺伝子を欠損したノックアウトマウスを用いて同様の実験をしたところ、IL-1 $\beta$  欠損マウスでは、SASP 因子の産生がほとんど見られず、肝癌の発症率も著しく低下することがわかった。この解析結果から、SASP により分泌される IL-1 $\beta$  やその下流因子が発癌促進に働くことが強く示唆された。さらに、肝臓では肝星細胞特異的に発現する HSP47 の発現を生体内でノックダウンし肥満マウスの肝星細胞を特異的に除去したところ<sup>16)</sup>、この処置においても肝癌の発症率が著しく低下することがわかった。これらの実験結果から肥満により細胞老化を起こした肝星細胞が SASP 因子を介して周囲に存在する肝実質細胞の癌化を促進している可能性が強く示唆された (図 1)。

次に筆者らは肥満によって誘導されるどのような

変化が肝星細胞の細胞老化を誘導するのか調べたところ、興味深いことに、肥満により肝癌を発症したマウスでは、肥満で増加した腸内細菌が産生する 2 次胆汁酸、デオキシコール酸が、野生型マウスに比べて血中で数倍増加していることを見出した。メタ 16SrRNA 遺伝子解析をしたところ、クロストリジウムクラスター XI や X IVa に属する菌が著しく増加していた。腸内で腸内細菌が持つ 7 $\alpha$ -dehydroxylation の作用により、産生されるデオキシコール酸のほとんどは腸管から吸収され、腸肝循環を介して肝臓に移行する。デオキシコール酸は、ROS の産生を介して<sup>17)</sup> 細胞老化を誘導することが培養細胞で確認されたため、肝臓に到達したデオキシコール酸は肝星細胞に DNA ダメージを与え、細胞老化を誘導する可能性が示唆された。興味深いことに、デオキシコール酸の産生を抑制する DFAIII (difructose anhydride III) や、胆汁酸の体外排出を促進するウルソデオキシコール酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA) を投与して体内のデオキシコール酸の濃度を低下させた肥満マウスでは、肝癌の発症率および肝星細胞の細胞老化が著しく低下していた。逆に、肥満マウ

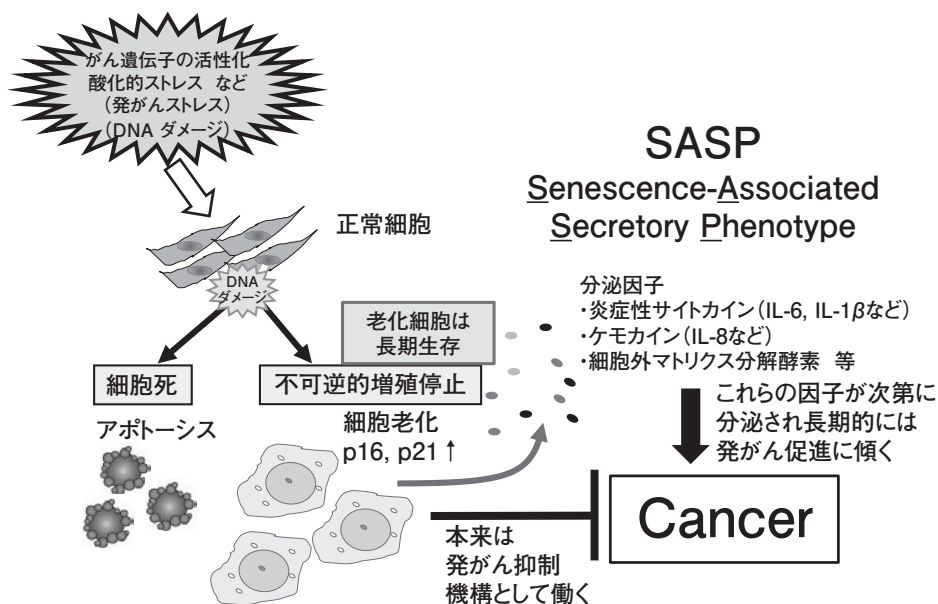


図 2 細胞老化による SASP の作用

正常細胞が強い DNA ダメージを受けると、アポトーシスにより細胞は自ら死滅するか、細胞老化が誘導され不可逆的細胞増殖停止が起こる。これらは DNA ダメージを被った異常細胞が増えないようにするための生体防御機構である。しかし、長く生き残った老化細胞から、炎症性サイトカインなど様々な分泌因子が放出されることが最近明らかになり、この現象は SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) と呼ばれている。SASP 因子のなかには発がんを促進的に働くものもあることが知られており、長期的には細胞老化は発がんを促進的に働いている可能性がある。細胞老化はこのような 2 面性を持つ (図は筆者作成)。

スに抗生物質を投与し腸内細菌を除去した条件下で、デオキシコール酸を経口投与してみたところ、抗生剤投与により低下した肝臓発症率が、デオキシコール酸投与により著しく復活し、同時に腫瘍部では肝星細胞の細胞老化と SASP も誘導されていた。これらの結果から、肥満により増加した腸内細菌が産生する二次胆汁酸のデオキシコール酸が、腸肝循環を介して肝臓に運ばれ肝星細胞に細胞老化および SASP を誘導することで肝臓の形成を促進していることが明らかになった (図 1)。

今回のマウスで見られた肝臓は肝線維化が少なく、肝硬変を伴わない脂肪肝から発症する肝臓発症モデルと考えられた。実際にヒトの NASH 肝臓の臨床検体を調べたところ、NASH 肝臓のうち 3 分の 1 程度の頻度で、今回のマウスモデルと同様に、肝星細胞で細胞老化や SASP が検出され、ヒトの NASH 肝臓においても、筆者らの報告したマウスモデルと同様のメカニズムで肝臓が発症する可能性が示唆された<sup>12)</sup>。

## おわりに

上述してきたように、腸内細菌叢の変化にともない、菌の代謝産物や菌体構成成分が体を循環することによって、腸内細菌が腸だけでなくさまざまな遠隔臓器に病態変化をもたらすことが明らかになってきている。本稿では、腸内細菌と肝疾患・肝がんの関連について、最近の知見を述べてきたが、本稿で述べた肝疾患以外にも、腸内細菌が腸から遠く離れた脳へ腸内細菌関連物質が作用し、うつ病や多発性硬化症などの脳神経系疾患にも関わっていることが示されており、腸内細菌叢を変えることにより、脳神経系疾患の改善を目指す研究分野も発展してきている<sup>18)</sup>。今後、各臓器の病態の鍵となる腸内細菌代謝物や菌の関連物質が同定されれば、それを標的とした各病態の予防法や治療法が開発されることが期待される。

## 文 献

1) Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013 ; **504** : 446-450.

2) Kimura, I, Inoue D, Maeda T, et al. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 ; **108** : 8030-8035.

3) Louis P, Hold GL, Flint H J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol*. 2014 ; **12** : 661-672.

4) Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, et al. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients*. 2015 ; **7** : 2839-2849.

5) Burcelin R, Serino M, Chabo C, et al. Gut microbiota and diabetes : from pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetol*. 2011 ; **48** : 257-273.

6) Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med*. 2007 ; **13** : 1324-1332.

7) Qin N, Yang F, Li A. et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature*. 2014 ; **513** : 59-64.

8) Dapito DH, Mencin A, Gwak GY. et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell*. 2012 ; **21** : 504-516.

9) Imajo K, Fujita K, Yoneda M, et al. Hyperresponsivity to low-dose endotoxin during progression to nonalcoholic steatohepatitis is regulated by leptin-mediated signaling. *Cell Metab*. 2012 ; **16** : 44-54.

10) Ley, R.E., Bäckhed F, Turnbaugh P et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 ; **102** : 11070-11075.

11) Ley, R.E., Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology : human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 2006 ; **444** : 1022-1023.

12) Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K. et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*. 2013 ; **499** : 97-101.

13) Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 2013 ; **341** : 1241-1244.

14) Takuma Y, Nouse K. Nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma : our case series and literature review. *World J Gastroenterol*. 2010 ; **16** : 1436-1441.

15) Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*. 2011 ; **192** : 547-556.

16) Sato Y, Murase K, Kato J et al. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nature Biotechnol*. 2008 ; **26** : 431-442.

17) Payne CM, Weber C, Crowley-Skillicorn C et al. Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF-kappaB through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells. *Carcinogenesis*. 2007 ; **28** : 215-222.

18) Cryan JF, and Dinan TG. Mind-altering microorganisms : the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2013 ; **13** : 701-712.