

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 660 号	氏名	岩尾正雄
審査委員会委員	主査氏名	花田礼子	
	副査氏名	猪股雅史	
	副査氏名	水上一弘	
論文題目 Supplementation of branched-chain amino acids decreases fat accumulation in the liver through intestinal microbiota-mediated production of acetic acid (分岐鎖アミノ酸の補充は腸内細菌叢を介した酢酸の生成を通じて肝臓の脂肪蓄積を減少させる)			
論文掲載雑誌名 Scientific Reports			
論文要旨 【背景と目的】 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の病因の1つとして、近年、腸内細菌叢との関連性が報告されている。高脂肪食負荷により NAFLD を発症した実験動物モデルに分岐鎖アミノ酸 (BCAA) を投与すると、筋肉組織での脂肪消費が促進され、肝臓の脂肪蓄積が減少することが先行研究にて発表されたが、その詳細な作用機序は明らかとなっていない。本研究では、BCAA の投与が食餌誘導性肥満モデルラットの腸内細菌叢にどのような影響を及ぼすか、そして、その変化が NAFLD の病態改善にどのように寄与するかという点に焦点を当てて実験を行った。 【研究対象・方法】 実験 1) 8 週齢の SD ラットを通常食 (ST 群)、BCAA を添加した通常食 (ST-BCAA 群)、高脂肪食 (HF 群)、BCAA を添加した高脂肪食 (HF-BCAA 群) を与える計 4 群に振り分けて、各食餌 8 週間投与した上で、次世代シーケンサーによる腸内細菌叢の解析や肝組織の病理学的評価などを行った。実験 2) 8 週齢の SD ラットを高脂肪食 (HF 群)、セルロースフリーの高脂肪食 (HF-cel(-)群)、BCAA を添加した高脂肪食 (HF-BCAA 群)、セルロースフリーで BCAA を添加した高脂肪食 (HF-cel(-)-BCAA 群) の計 4 群に振り分けて、各食餌を 8 週間投与した後、実験 19 と同様の実験を施行した。 【結果と考察】 HF-BCAA 群では腸内細菌 <i>R.flavifaciens</i> が増加し、その結果、門脈血中の酢酸濃度の上昇が認められた。さらに、同群では酢酸濃度の上昇に伴い、肝臓での AMPK 活性化や脂肪合成関連遺伝子の発現抑制を介して脂肪合成抑制が認められた。一方、これらの現象は HF-cel(-)-BCAA 群では認められなかった。本結果から、HF-BCAA 群では、 <i>R.flavifaciens</i> の増加により、セルロースを基質とした酢酸産生が増加し、増加した酢酸は門脈を介して肝臓に運ばれ、肝細胞での AMPK の活性化、脂肪合成関連遺伝子 FAS や ACC の発現を抑制することにより、肝での脂肪合成が抑制され、NAFLD 改善作用を呈することが明らかになった。本結果から NAFLD に対する新たな治療戦略への応用が期待される。 本研究は BCAA 経口投与による腸内細菌を介した脂肪合成抑制、NAFLD 改善のメカニズムの一端を明らかにした研究であり、高脂肪食摂取時の BCAA 経口投与が NAFLD 薬物治療の選択肢の一つとなる可能性が示唆された。以上より、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第 660号	氏名	岩尾正雄
審査委員会委員	主査氏名	花田礼子 (花)	
	副査氏名	猪股雅史 (猪)	
	副査氏名	水上一弘 (水)	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 高脂肪食投与において、どのくらいの期間で NAFLD が生じ、NASH に移行するのか。 2. SD ラット以外の実験動物では検証しているか。 3. BCAA 投与による腸内細菌叢の変化は、組成の変化の他に、菌量の変化はあるのか。 4. 高脂肪食により <i>R.flavescens</i> の増加を認めるが、酢酸合成や AMPK が増加しないのはなぜか。 5. 通常食群において、BCAA 投与しても <i>R.flavescens</i> の増加を認めないのはなぜか。 6. セルロース無しの食事は、肝臓以外の臓器や代謝系に影響はないのか。 7. BCAA 投与は NAFLD 改善効果を認めるが、NASH 脂肪肝の治療として酢酸の直接的な投与は創薬として考えられるか。 8. BCAA は肝疾患において有効である印象が強いが、過量投与や過剰に体内にあると何か影響することがあるのか？ 9. BCAA が HCC の発生を抑制するという記載に対する機序について説明せよ。 10. 今回回盲部から採便を行った理由について説明せよ。 11. 腸内細菌はかなり個体差があるが、その点に関する実験の再現性について、マウスの条件の工夫などはあるか。 12. Figure3 について。セルロース free のマウスから <i>R.flavescens</i> が検出できなくなっているが、HF-cel(-)+BCAA で酢酸や AMPK 活性は低下を認めないのはなぜだと考えるか。 13. 本研究結果では BCAA が脂肪蓄積を抑制するが、すでに肝臓に蓄積された脂肪を除去する効果は期待できるのか。 14. 今後、<i>R.flavescens</i> を抽出した薬剤の投与なども可能になる可能性などはないか。 15. どのような背景や疑問点を持ってこの研究を開始したのか。 16. NAFLDにBCAAを投与すると、筋肉での脂肪消費が促進され、肝臓の脂肪蓄積が減少するが、現在、報告されているメカニズムはどのようなものか。 17. 統計解析は何のソフトを用いておこなったのか。 18. Western blotting の定量化の方法を具体的に説明してほしい。 19. 文献を参考に3%BCAA添加をおこなっているが、過剰BCAA添加では何かside effectが認められるのか。また、3%未満BCAA投与の場合、最低どれ程のBCAA添加量で肝臓のTG低下効果が認められるのか。 20. 本論文ではなぜ標準偏差(SD)を用いて解析したのか。 21. Western blotting の定量化ならびにAMPKのELISAで用いた各群のn数はいくらか。 22. Western blotting のY軸は何を基準としたデータ(割合)か。 23. BCAA食負荷時には肝臓の炎症は抑制されるのか。炎症性サイトカインなどのマーカーは確認しているか。 24. 本論文では8週間のBCAA食負荷であったが、さらに長期間BCAA負荷を行うと体重変化が認められると考えるか。 25. Lipolysisのマーカー動態に変化はないか。 26. アルコール摂取時も、アルコール代謝により肝臓で酢酸が生成されるが、これも AMPK 活性化や NAFLD 改善に有効か。 27. 線維化を起こした状態(NASH)へのBCAA食は有効と考えることができるか。 28. BCAA投与群にCellulose含有量を通常よりさらに多く添加するとNAFLD抑制効果の増大が認められるか。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 岩尾 正雄

論 文 題 目

Supplementation of branched-chain amino acids decreases fat accumulation in the liver through intestinal microbiota-mediated production of acetic acid

(分岐鎖アミノ酸の補充は腸内細菌叢を介した酢酸の生成を通じて肝臓の脂肪蓄積を減少させる)

要 旨

ア. 緒言 (目的)

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の病因については、「multiple-hit hypothesis」が提唱され、腸内細菌叢などの様々な要素が NAFLD の病状の進行に関与していると想定されており、その一つとして腸内細菌叢に関わる変化が挙げられている。NAFLD の実験動物モデルに分岐鎖アミノ酸 (BCAA) を投与すると、筋肉組織での脂肪消費が促進され、肝臓の脂肪蓄積が減少することが報告されている。BCAA とヒトやげっ歯類などの腸内細菌叢との関連性や、BCAA の投与による腸内細菌叢の変化が NAFLD に及ぼす影響を明らかにした報告は認められない。本研究では、BCAA の投与が食餌誘導性肥満モデルのラットの腸内細菌叢に影響を及ぼすかどうか、そして、その変化が NAFLD の病態の改善に寄与するかどうかを明らかにすることを目的とした。

イ. 研究対象および方法

実験 1) 8 週齢の SD ラットを通常食 (ST 群)、BCAA を添加した通常食 (ST-BCAA 群)、高脂肪食

(HF 群)、BCAA を添加した高脂肪食 (HF-BCAA 群) を与える計 4 群に振り分けて、各食餌 8 週間投与した。評価項目としては次世代シーケンサーによる腸内細菌叢の解析や肝組織の病理学的評価などを行った。肝組織の脂肪化は、脂肪の膜を染める *adiphophin* 抗体を用いた免疫染色で評価した。

実験 2) 8 週齢の SD ラットを高脂肪食 (HF 群)、セルロースフリーの高脂肪食 (HF-cel(-)群)、BCAA を添加した高脂肪食 (HF-BCAA 群)、セルロースフリーで BCAA を添加した高脂肪食 (HF-cel(-)-BCAA 群) の計 4 群に振り分けて、各食餌を 8 週間投与した後、実験 1 と同様の評価を行った。

ウ. 結果

実験 1) 腸内細菌叢の解析では、HF 群で *Coprococcus* 属が減少して、BCAA 添加により *Ruminococcus flavefaciens* が有意に増加していた。この細菌種はセルロースを発酵して酢酸を産生するため、門脈血中の酢酸濃度を測定すると、HF-BCAA 群で有意に増加していた。この酢酸は AMP キナーゼの活性化を介し、脂肪合成関連遺伝子の FAS や ACC の発現を抑制して、肝での脂肪合成を抑制することが報告されており、本実験でも HF-BCAA 群で、他群と比して AMPK が有意に活性化され、FAS と ACC の mRNA とタンパク発現量は HF 群と比して有意に低下していた。肝脂肪化の評価では、HF 群と比して HF-BCAA 群で脂肪化が改善されていた。

実験 2) HF-BCAA 群では実験 1 と同様に他群と比して、*R. flavefaciens* の増加、門脈血中の酢酸濃度の増加、AMPK の活性化、FAS や ACC の発現の低下と肝組織での脂肪化の改善が認められた。しかし、HF-cel(-)-BCAA 群では上記変化は認められなかった。この結果から、BCAA による *R. flavefaciens* の増進促進にはセルロースが必須であり、産生される酢酸量が増加しなければ AMPK の活性化や FAS および ACC の発現抑制は起こらず、肝脂肪化も改善しないことが示唆された。

エ. 考察・結語

今回の実験結果から、BCAA は以下の作用機序で肝脂肪化を改善することが示唆された。BCAA の投与で、腸内細菌として *R. flavefaciens* が増加する。増加した *R. flavefaciens* はセルロースを基質として酢酸を産生して、その酢酸は門脈血を介して肝臓へ運ばれる。それにより肝細胞の AMPK が活性化され、脂肪合成関連遺伝子である FAS や ACC の発現が抑制され、肝での脂肪合成が抑制されることで、肝の脂肪化が改善すると考えられた。以上の結果から、BCAA は NAFLD における薬物治療の選択肢の一つとなる可能性が考えられた。