

2013 年度採択 Translational Research 振興事業 最終報告書

1. 研究テーマ

腸管免疫と腸内細菌叢への治療介入を行う新規動脈硬化予防法の開発研究

2. 研究代表者名（氏名、所属、職名）：

平田 健一、神戸大学大学院医学研究科 内科学講座 循環器内科学分野、教授

3. 研究組織（氏名、所属、職名）：

山下智也、神戸大学大学医学部附属病院 循環器内科、准教授

佐々木直人、神戸大学大学院医学研究科 内科学講座 循環器内科学分野、助教

石田達郎、神戸大学大学院医学研究科 地域社会医学・健康科学講座 地域医療ネットワーク学分野、特命教授

新家俊郎、神戸大学医学部附属病院 循環器内科 冠動脈疾患治療部、准教授

本田賢也、慶応大学大学院医学研究科 微生物免疫学講座、教授

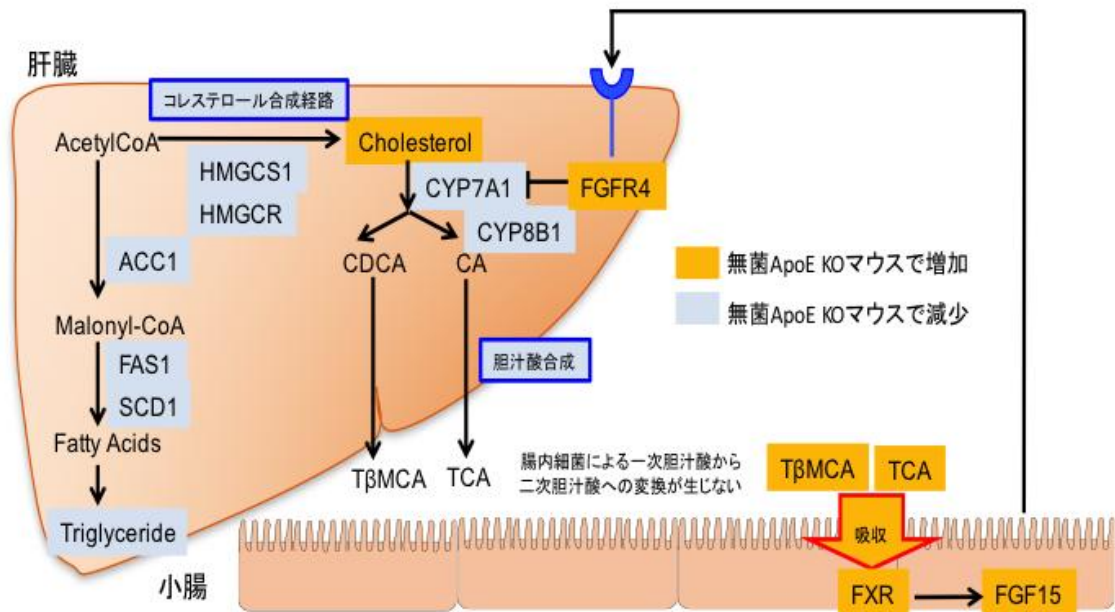
4. 3年間の活動報告

Germ free マウスの確立と動脈硬化における腸内細菌叢の役割の解明.

無菌(Germ free; GF)マウスにおいて血清総コレステロール値が高値になることが判明したにもかかわらず、大動脈基部の動脈硬化巣の面積は減少するという結果が得られた。その機序の解明を行い、腸内細菌が脂質代謝と動脈硬化の形成にどのように影響を及ぼしているのかを明らかにする研究を行った。

(結果) GF)マウスにおいて血清コレステロール値が上昇する機序に関して、次ページに示すような機序が関連していることが分かった。腸内細菌が存在しないと、腸内での一次胆汁酸の二次胆汁酸への変換がなされず、結果として腸内の一次胆汁酸である taurocholic acid (TCA) and tauro- β -muricholic acid (T β MCA)の濃度が正常のマウスと比べて上昇していた。さらに、これらの腸管からの吸収が増加して、肝臓に戻っていく胆汁酸の量が増加して、結果として胆汁酸の合成が低下していた。胆汁酸の合成は、コレステロールからなされるので、コレステロールの肝臓での消費量は低下し、肝臓でのコレステロール含有量は低下していた。コレステロールの合成も低下しているようであるが、結果として肝臓でのコレステロールの含有量が増加していた。その結果として、肝臓へ戻ってくるコレステロール量が減少し、その手前にあたる血中にコレステロール

が残ることにより、血中コレステロールが上昇しているようである。



この研究成果は、腸内細菌が生体内のコレステロール代謝に大きな影響を及ぼしていることの証明であり、この成果を利用した脂質異常症の新規治療法の開発に発展する可能性がある。

上記の血中コレステロール値の上昇にもかかわらず、動脈硬化の面積が減少したことで、やはり腸内細菌の別の生体内での作用機序・役割が想定された。免疫機能への影響を無菌マウスで調査し、様々な臓器において T 細胞の数が減少していることが分かってきた。

腸内細菌叢の存在は、血清脂質代謝には良い影響を与えており、無菌では血清コレステロールの上昇を招いた。しかし、腸内細菌叢は全身免疫的には活性化の方に作用しており、無菌は抗炎症的に作用した。腸内細菌叢は全体としては、動脈硬化を悪化させる方向に作用しているようであり、無菌状態は動脈硬化抑制的に作用することが判明した。

近年、腸内細菌の代謝産物（トリメチルアミン N オキシド TMAO）が動脈硬化性心血管イベントの発生に関連していることが報告されており、無菌状態が TMAO の低下を介して動脈硬化抑制的に作用した可能性も示唆される。さらなる、腸内細菌叢と動脈硬化の関連を調査することにより、新規の予防法開発につながる可能性があると考え、さらに研究をすすめていく。

抗生物質を用いた無菌類似マウスの動脈硬化の解析

（結果）SPF(specific pathogen free)環境のマウスに、抗生物質を投与して腸内フローラを強制的に変えることが、動脈硬化にどのような影響を及ぼすのかを調査した。抗生物質の4剤(AVNM; ampicillin, vancomycin, neomycin, and metronidazole)の組み合わせで、Germ free マウスと同様に、血清コレステロール値が著明に上昇することと、

GFと同様に、動脈硬化巣は減少する傾向が認められることが分かっていた。その機序は、上記のGFマウスとほぼ同様の機序であることが分かってきた。さらに抗生物質neomycin単独投与で、動脈硬化を減少させることができるという実験結果も得た。しかし、抗生物質での腸内細菌の変化は、抗生物質の種類による抗菌スペクトルから予想される結果とは全く異なり、予想困難であった。さらにメタボローム解析を用いて代謝への影響も検討したが、いまのところ動脈硬化抑制に関連する機序の解明には至っていない。

腸内細菌叢への介入治療法の開発のために、腸内細菌の制御がどのように動脈硬化の形成に影響し、抑制に関与できるのかの機序の解明をめざした基礎研究は継続していく。

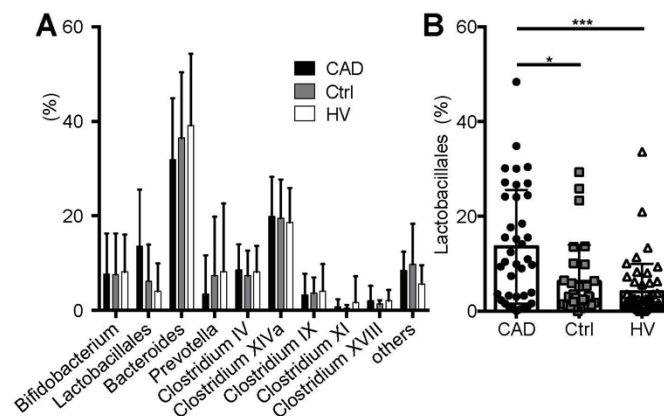
マウス動物実験でスクリーニングされた抗動脈硬化腸管免疫修飾療法の候補物質のより詳細な作用機序の解明

継続して、腸管免疫修飾作用と抗動脈硬化作用をもつプロバイオティクスなど食品や物質の特定のためのスクリーニングを実施した。

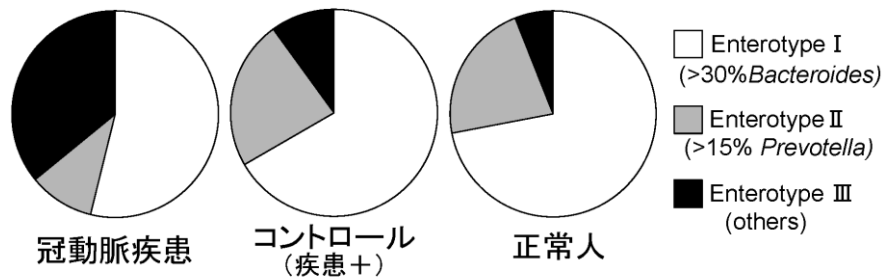
(結果) 免疫機能や代謝に影響があると報告されている数多くのプロバイオティクスを動脈硬化モデルマウスに投与し、動脈硬化抑制作用の有無を調査し、ただ一つだけの菌株で動脈硬化の抑制作用を示すことを見つけ出した。その機序としては、樹状細胞の機能修飾により、T細胞の増殖抑制に作用することが重要であるようである。

ヒトにおける冠動脈疾患(循環器疾患)の発症と免疫機能と腸内細菌叢との関連の解析。

初期の研究で、右図のように冠動脈疾患患者では、Lactobacillus目菌が、糖尿病や脂質異常症を持っているが冠動脈疾患を発症されていないコントロール患者・生活習慣病をお持ちでない正常人に比較して有意に増加していることが分かった。継続して、このT-RFLP法の成果をさらに詳細に分析することと、菌としてさらに詳細な科・属・種の情報を調査する研究を進めた。



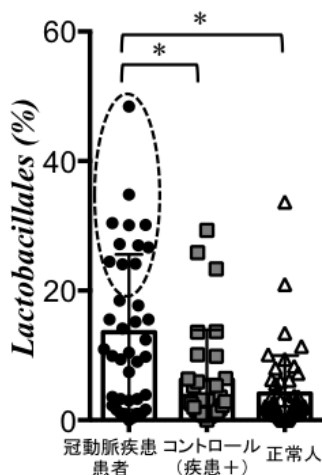
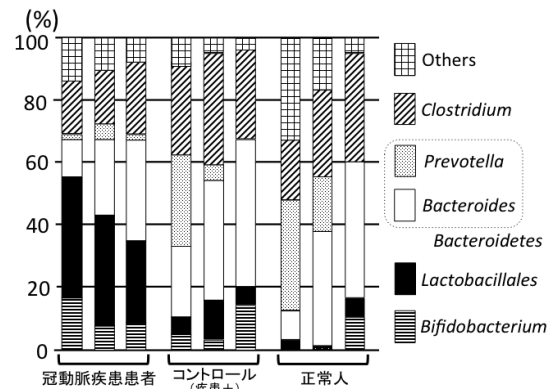
(結果) T-RFLP 法の成果の詳細な分析により、以下の結果が得られている。2011年の Nature の報告によって、ヒトの腸内細菌叢は3つの型(Enterotype)に分類できることが報告された。この結果に準じて、我々



腸内細菌叢の優位菌の差異により3つに分類するEnterotypeが報告された。冠動脈疾患患者群でコントロール患者群と正常人に比較して、Enterotype IIIの比率が多いことが分かった。

のもつデータにて同分類を行うと、以下のような結果となった。冠動脈疾患患者に明らかに黒の部分、すなわち Enterotype III 型(*Rumonococcus* 菌が多い腸内細菌叢のタイプ)が多いことが分かった。この成果を臨床で応用できれば、腸内細菌叢を調査(検査)することで、冠動脈疾患になりやすい人がある程度特定して、疾患予防を重点的に行う必要のある人とそうでない人を識別することに利用できる可能性がある。

右図に示すように、冠動脈疾患患者に比較して、コントロールでも正常人でも、Bacteroidetes 門 (*Prevotella* + *Bacteroides*) の菌が多い傾向が認められる。肥満においても Bacteroidetes 門が多い方が、肥満になり難いことが分かっているので、冠動脈疾患でも同様の傾向があることが判明し、Bacteroidetes 門菌は、生活習慣病の予防に関連している可能性が示唆された。この



コントロール群に比較して、冠動脈疾患患者群では、*Lactobacillales* 菌が有意に増加していた。* $P < 0.05$ さらに20%以上の患者(点線円内)は、すべて多枝病変(重症)であった。

Bacteroidetes 門の菌の中のいずれかの菌属もしくは菌種が、疾患予防的に作用している可能性があり、その菌を同定する実験を行う必要があります。継続して腸内細菌の16SrRNA 遺伝子解析を進めて、詳細な属や種の情報を得る取り組みを行っている。

臨床データの解析を詳細に行うと、*Lactobacillales* 目の菌が全体の20%以上を占める程度にかなり多く存在する方(左図の点線で描いた丸の中の人)は、冠動脈疾患多枝病変の患者であり、冠動脈バイパス手術や複数回の内科的な PCI 治療を受けていることが判明した。*Lactobacillales* 目菌が冠動脈疾患の発症のみならず、その悪化にも影響をおよぼしている可能性を示唆する結果であると考えている。

これらのデータの解析により、より疾患に関連する菌のおおまかな門～目が判明し、より詳細な菌の属～種の分析が必要となってきたので、さらに詳しい菌叢解析を 16S rDNA ランダムシーケンス法にて行う方針として研究を進めた。全ての細菌には、約 1500 塩基からなる 16S リボソーム(r)RNA をコードする遺伝子が存在し、その中の 9 ヶ所の細菌の種類によって多様化した可変部分があり、その遺伝子が細菌の分類に利用される。糞便から抽出した細菌遺伝子 DNA を鋳型にして、16S rDNA を増幅させるユニバーサルプライマーを用いて PCR を行い、細菌 16S rDNA を網羅的に増幅させた。その遺伝子配列を次世代シーケンサーを用いて DNA シーケンスによって特定した。得られた遺伝子配列は類似したものがグループ化され、データベースに対してのホモロジー解析を行うことで、約 200 種類に分類された菌の属種のレベルの細菌組成が特定できる(T-RFLP 法では上記のように 9 種類の門や属の情報しか得られない)。この方法の分析技術に関しては、バイオインフォマティクスの技術が必要となるので、研究支援を受けて行った。

(結果) T-RFLP 法の研究で、冠動脈疾患患者で有意に *Lactobacillales* 目の菌が増加していることが分かっていたが、その中のどの菌科(菌を含めた生物は門・綱・目・科・属・種の順に分類が細かくされる)が多いのかを調査して、*Lactobacillales* 目の中の *Streptococcaceae* 科と *Lactobacillaceae* 科の菌が著明に多いという結果が得られた。

(未発表データにて、図では示していない)。さらに詳細な属・種の解析を行っており、より特異的に冠動脈疾患患者で増加している菌を同定する作業を継続して行っていく。

同様に、*Bacteroidetes* 門菌の中の、*Bacteroidaceae* 科の菌が増加していることが分かっている。この中の特定菌種の関連がわかると、その菌種が動脈硬化抑制菌であるのかどうかの調査を、動物実験で行う予定である。

学会報告 (本研究に関連するもののみ)

山下智也、平田健一. 腸から動脈硬化を予防する. 第 56 回日本老年医学会学術集会 2014 年 6 月福岡

山下智也、平田健一. 腸内フローラへの介入と腸管免疫修飾による動脈硬化予防. 第 35 回日本循環制御医学会総会 2014 年 7 月福岡

山下智也、佐々木直人、平田健一. 腸内細菌と動脈硬化. 第 46 回日本動脈硬化学会総会 2014 年 7 月東京

江本拓央、佐々木直人、山下智也、笠原和之、淀井景子、佐々木義浩、松本卓也、溝口泰司、林友鴻、平田健一. Regulatory T cells and CD4+CD28null T cells in coronary artery disease. 第 46 回日本動脈硬化学会総会 2014 年 7 月東京

江本拓央、佐々木直人、山下智也、笠原和之、淀井景子、佐々木義浩、松本卓也、溝口泰司、林友鴻、平田健一. Gut microbiota modulates coronary atherogenesis. 第46回日本動脈硬化学会総会 2014年7月東京

山下智也、平田健一. 腸内細菌叢への介入と腸管免疫修飾による動脈硬化予防. 第35回日本肥満学会. 2014年10月宮崎

Tomoya Yamashita, Naoto Sasaki, Ken-ichi Hirata. Intestinal immunity and gut microbiota as therapeutic targets for preventing atherosclerotic cardiovascular diseases. 第79回日本循環器学会総会 2015年4月大阪.

江本拓央、山下智也、佐々木直人、笠原和之、淀井景子、松本卓也、溝口泰司、林友鴻、平田健一. A Characteristic Change of Gut Microbiota in Coronary Artery Disease. 第19回腸内細菌学会 2015年6月東京

江本拓央、山下智也、佐々木直人、笠原和之、淀井景子、松本卓也、溝口泰司、林友鴻、宗杏奈、廣田勇士、小川渉、平田健一. Coronary artery disease was associated with a change in the composition of gut microbiota. 第47回日本動脈硬化学会総会 2015年7月仙台

Tomoya Yamashita, Ken-ichi Hirata. A possible link of gut microbiota alteration in atherosclerotic cardiovascular diseases. 4th International Congress on Lipid Metabolism & Atherosclerosis. 2015年9月韓国ソウル.

山下智也、平田健一. 腸から動脈硬化を予防する ～腸内細菌と動脈硬化との関係～ 第23回日本血管生物医学会学術集会 2015年12月神戸.

Takuo Emoto, Tomoya Yamashita, Naoto Sasaki, Taiji Mizoguchi, Tomoyuki Hayashi, Ken-ichi Hirata. Gut microbiota could be a predictor of the risk of coronary atherosclerosis. 第80回日本循環器学会総会 2016年3月仙台.

Tomoya Yamashita, Ken-ichi Hirata. Gut microbiota could be a diagnostic marker or a therapeutic target of coronary artery disease. 第80回日本循環器学会総会 2016年3月仙台.

平田健一. 腸管免疫と腸内細菌叢への治療介入を行う新規動脈硬化予防法の開発研究. 第80回日本循環器学会総会 2016年3月仙台. (本研究助成の報告会)

論文・著書（本研究に関連するもののみ）

Emoto T, Yamashita T, Kobayashi T, Sasaki N, Hirota Y, Hayashi T, So A, Kasahara K, Yodoi K, Matsumoto T, Mizoguchi T, Ogawa W, Hirata K. Characterization of gut microbiota profiles in coronary artery disease patients using data mining analysis of terminal restriction fragment length polymorphism: gut microbiota could be a diagnostic marker of coronary artery disease. *Heart and Vessels*. 2016 in press

Emoto T, Yamashita T, Sasaki N, Hirota Y, Hayashi T, So A, Kasahara K, Yodoi K, Matsumoto T, Mizoguchi T, Ogawa W, Hirata K. Analysis of gut microbiota in coronary artery disease patients - A possible link between gut microbiota and coronary artery disease - *J Atheroscler Thromb*. 2016 in press.

Yamashita T, Sasaki N, Kasahara K, Hirata K. Anti-inflammatory and immune-modulatory therapies for preventing atherosclerotic cardiovascular disease. *J Cardiol*. 2015; 66: 1-8.

Yamashita T, Kasahara K, Emoto T, Matsumoto T, Mizoguchi T, Kitano N, Sasaki N, Hirata K. Intestinal Immunity and Gut Microbiota as Therapeutic Targets for Preventing Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *Circ J*. 2015; 79: 1882-90.

Emoto T, Sasaki N, Yamashita T, Kasahara K, Yodoi K, Sasaki Y, Matsumoto T, Mizoguchi T, Hirata K. Regulatory/effector T-cell ratio is reduced in coronary artery disease. *Circ J*. 2014; 78: 2935-41.

Kasahara K, Sasaki N, Yamashita T, Kita T, Yodoi K, Sasaki Y, Takeda M, Hirata K. CD3 Antibody and IL-2 Complex Combination Therapy Inhibits Atherosclerosis by Augmenting a Regulatory Immune Response. *J Am Heart Assoc*. 2014; 3: e000719.

Kita T, Yamashita T, Sasaki N, Kasahara K, Sasaki Y, Yodoi K, Takeda M, Nakajima K, Hirata K. Regression of Atherosclerosis with Anti-CD3 Antibody via Augmenting a Regulatory T Cell Response in Mice. *Cardiovasc Res*. 2014; 102: 107-17.

山下智也, 笠原和之, 佐々木直人, 平田健一. 腸内フローラへの介入と腸管免疫修飾による動脈硬化予防. *腸内細菌学雑誌*, 2014, 28, 1-5.

山下智也, 笠原和之, 佐々木直人, 平田健一. 動脈硬化と腸内細菌 腸から動脈硬化性疾患は予防できるのか? *実験医学*. 2014, 32, 773-779.

山下智也, 笠原和之, 佐々木直人, 平田健一. 腸内フローラと疾病とのかかわり 動脈硬化. 臨床と微生物. 2014, 2, 157-163.

山下智也, 平田健一. 腸血管連関とその臨床的意義. 細胞工学. 2014, 33, 529-534.

山下智也, 平田健一. 腸内細菌と動脈硬化 腸から動脈硬化は予防できるのか? 肥満研究. 2014, 20, 7-12.

山下智也, 笠原和之, 佐々木直人, 平田健一. 腸内細菌と心血管病. 循環器内科. 2014, 75, 610-617.

笠原和之, 山下智也, 佐々木直人, 平田健一. 腸内細菌と動脈硬化 腸内細菌は新たな心血管病の治療標的となり得るか. 遺伝:生物の科学, 2014, 68, 358-362.

山下智也, 笠原和之, 佐々木直人, 平田健一. 腸内細菌と心血管病 腸から動脈硬化は予防できるのか. 医学のあゆみ. 2014, 251, 100-106.

山下智也. 腸内細菌と代謝障害 腸内細菌と動脈硬化. Therapeutic Research. 2014, 35, 789-799.

江本拓央, 山下智也, 平田健一. 腸内細菌と循環器疾患. 臨床化学. 2015, 44, 282-289.

山下智也, 佐々木直人, 平田健一. 心血管病の治療標的としての腸管免疫と腸内細菌. 循環器専門医. 2015, 23, 189-195.

山下智也, 平田健一. 腸内フローラが見せる新たな世界と疾患メカニズム 腸内細菌と動脈硬化. 血管医学. 2015, 16, 237-242.

山下智也, 平田健一. 腸内細菌と動脈硬化. 成人病と生活習慣病. 2015, 45, 1523-1529.

江本拓央, 山下智也, 平田健一. 動脈硬化と腸内細菌. 呼吸と循環. 2015, 63, 1209-1215.

山下智也, 平田健一. 腸内細菌と肥満. Current Therapy. 2016, 34, 33-38.

山下智也, 平田健一. 腸内最近と動脈硬化. 診断と治療. 2016, 104, 171-174.

2016年 4月 22日

研究代表者

平田健一