

冠動脈疾患発症に関連する腸内細菌叢の調査研究とその成果の臨床応用

山下智也

神戸大学医学部附属病院 循環器内科

【研究の背景】

我々は、動脈硬化性疾患の予防や治療のために炎症免疫反応を制御するという戦略が、期待される次世代の予防法になると考え、抗動脈硬化免疫療法の開発基礎研究を続けている。その中で“腸管からの免疫修飾によって動脈硬化を予防する”という独創的な治療概念を確立した。さらに、腸管免疫に深く関与する腸内細菌に注目した研究を開始し、それが本研究課題につながっている。

近年の臨床研究によって腸内細菌叢のタイプが肥満や糖尿病の発症に影響を及ぼすことが示され、疾患の新規治療標的となる可能性があり、精力的に研究が進められている。我々の研究グループは、腸内細菌叢と冠動脈疾患(狭心症・心筋梗塞)との関連を調査し、診断や発症予測に使用できる可能性を検討している。

【目 的】

本研究の目的は、動脈硬化性疾患の中の冠動脈疾患の発症や増悪に関連する腸内細菌を特定することであり、その成果を基に、冠動脈疾患発症リスクを評価する腸内細菌検査法や腸内細菌に介入する新規動脈硬化性疾患予防法の開発を目指すことである。

【方 法】

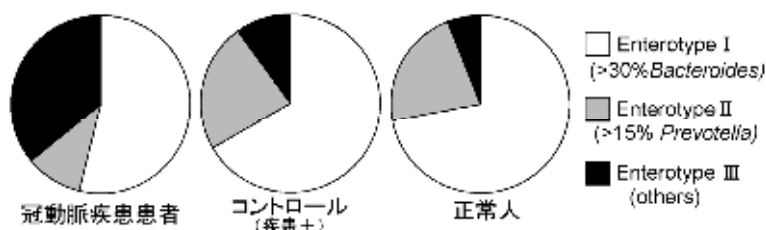
冠動脈疾患を発症した患者、冠動脈疾患リスク因子となる生活習慣病(糖尿病・脂質異常症・高血圧)を持つが冠動脈疾患がないコントロールの患者、そして正常人から糞便を提供いただき、その糞便中の腸内細菌 DNA を抽出し、PCR を応用した T-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism) 法にて解析した。T-RFLP 法は、糞便中の細菌の 16S rRNA を蛍光色素でラベルしたプライマーを用いて PCR にて増幅し、得られたアンプリコンをある種の制限酵素で切断した DNA 断片を解析する。ある長さで出現する DNA 断片の組み合わせによって菌の属種を同定できて、その蛍光色素の強さによってその菌の量を定量できる方法である。この方法で、各人の腸内細菌属種の存在比率と量を特定することで、おおまかな大腸の腸内細菌叢の網羅的解析が可能である。

また、この方法で求められたデータを、これまでの文献から得られる分類方法などにあてはめて、臨床で使用できる腸内細菌叢検査からの疾患発症予測法などにつなげられるかの検討を行った。

さらに、腸内細菌叢に対しての介入治療の可能性を示す目的で、動脈硬化マウスモデルであるアポリポ蛋白 E 遺伝子欠損マウスにいくつかの非吸収抗生物質を経口投与して動脈硬化形成に与える影響を評価する基礎的動物実験を行った。

【結 果】

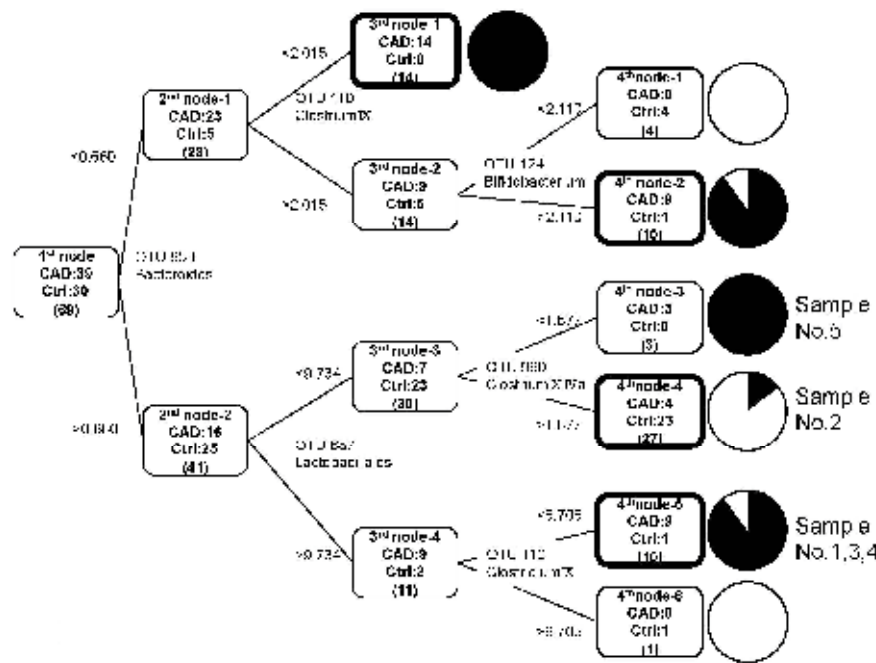
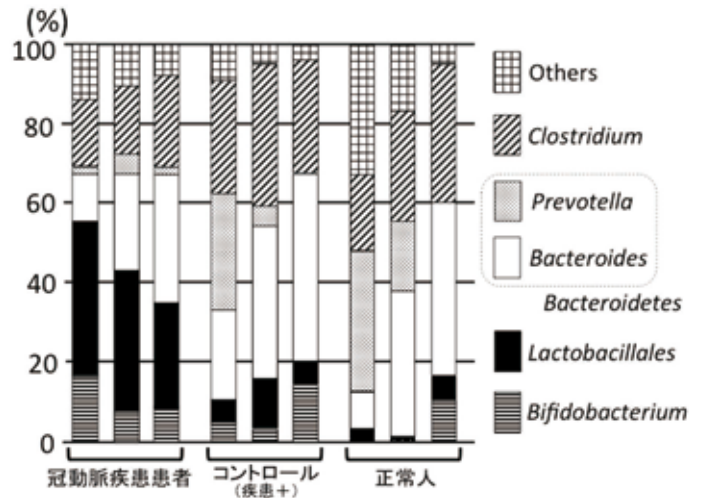
ヒトの腸内細菌叢を優位菌によって3つの菌叢のタイプに分類する“Enterotype” (*Nature*, 2011;473:174-180.) が報告されており、type I、II、



IIIはそれぞれ *Bacteroides* 菌優位、*Prevotella* 菌優位、*Ruminococcus* 菌優位とされている。我々は、その後の研究成果も考慮しながら T-RFLP 解析結果から Enterotype を決定する方法を考案し、Enterotype I (>30% *Bacteroides*)、Enterotype II (>15% *Prevotella*)、Enterotype III は Others と分類した (前ページ図)。 *Bacteroides* が多い Enterotype I (円グラフ白色部分) は正常人とコントロール群に多く、冠動脈疾患患者は、Enterotype III=Others (円グラフ黒色部分) の比率がかなり高いことが分かった。

右図のように数種類の細菌群に分類する解析結果では、正常人や生活習慣病に罹患しているが冠動脈疾患のないコントロール患者群に比較して、冠動脈疾患患者の腸内細菌叢では、*Lactobacillales* 菌群 (黒色部分) が有意に増加し、*Bacteroidetes* 菌群 (*Prevotella* 属; 灰色部分+*Bacteroides* 属; 白色部分) が減少していることが分かった。(*J Atheroscler Thromb.* 2016; 23: 908-21.)

これらのデータを、統計学的手法であるデータマイニング法を利用して、生活習慣病コントロール患者 (Ctrl) と



冠動脈疾患発症患者 (CAD) とに分類して、発症リスク予想ができるかを検討した。菌のもう少し詳細な分類 OUT (operational taxonomic unit) の存在比率と疾患の有無によって Decision tree という一種のフローチャート図 (左図) を作成した。この中でも、CAD か Ctrl かの決定因子としては、*Bacteroides* と *Lactobacillales* の OTU が、最も強い因子であり、その次に *Clostridium* が関係することが示された。そして、別の冠動脈疾患患者 5 名 (Sample No. 1~5) で、腸内細菌叢から冠動脈疾患発症予測的中率を求めると、Sample No. 2 の方が CAD でありながら Ctrl に分類され、陽性的中率は 80% という結果であった

(*HeartVessels.* 2017; 32: 39-46.)

さらに、腸内細菌叢に対しての介入治療を検討するために、動脈硬化モデルマウスに抗生物質を投与する実験を追加して行った。グラム陽性菌に除菌効果のあるバンコマイシンでは、抗生物質非投与群と動脈硬化形成に差は認められなかったが、グラム陰性菌に除菌効果のあるネオマイシンでは、有意に動脈硬化形成の面積を減少させた (unpublished data)。抗生物質投与が腸内細菌へ与える影響も検討したが、本実験の中では一定の傾向は認められなかった。

【考察】

我々は、冠動脈疾患に関連する腸内細菌を調査する臨床研究を実施し、冠動脈疾患発症患者に特徴的な腸内細菌叢のパターンを同定し、コントロール群に比較して *Lactobacillales* 目菌が増加しており、*Bacteroides* 属菌が減少していることを発見した。これらの研究成果からだけでは、因果関係を示すことは困難であるが、増加菌 *Lactobacillales* 目菌を除菌する疾患予防法の可能性や、反対に冠動脈疾患患者で減少し、コントロール群に多く存在する *Bacteroides* 属菌に関しては、動脈硬化予防のための微生物製剤として有効である可能性があり、腸内細菌に介入する疾患予防法の開発研究を目指し

た検討を進めている。

これらの研究成果を、臨床診断の一助として利用することを想定した検討と研究も進めた。現状の循環器診療の中で、あらゆる検査を行っても急性心筋梗塞をはじめとする心血管イベントの発症予測は困難という現実があり、将来の発症予測につながる検査法が切望されている。人の腸内細菌叢を 3 つに分類できる Enterotype について、III 型 (*Ruminococcus* が優位菌である群) に、冠動脈疾患患者が多く存在し、発症予測に使用できる可能性がある。T-RFLP 法のデータを利用した、データマイニング法の解析から得られたフローチャートでは、その陽性的中率は 80%であった。これらの研究は、あくまで横断的観察研究であり、検査としての有用性の判断には、前向き研究による検証が必要である。

動物実験によって、腸内細菌叢を変化させると、動脈硬化を抑制できる可能性を示唆する結果が得られた。まだ、preliminary な研究結果であり、腸内細菌叢への影響も含めて検討しながら治療応用につなげていきたい。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

近年、ベンチャー企業などから腸内細菌検査キットが発売されるようになり、約2万円程度の費用で自らの腸内細菌叢を知ることができる時代になっており、上記の成果はそういう中で利用価値があるかもしれない。近い将来に、腸内細菌叢の検査を疾患発症のリスク評価に使用できるように研究を進め、臨床検査法として実現したい。

さらに詳細な調査を進めており、冠動脈疾患に特徴的な腸内細菌種を特定し、除菌療法や微生物製剤としての臨床応用も目指したい。

【参考・引用文献】

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, 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; 23: 908-21.

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 Vessels*. In press.