

腸内細菌とその関連代謝物に介入する新規循環器疾患予防法・治療法の開発研究

山下智也

神戸大学医学部 附属病院

【研究の背景】

本研究代表者は、代謝や免疫機能に大きく影響する**腸内細菌**と循環器疾患との関連を調査する基礎・臨床研究を行っており、すでに、臨床研究にて**冠動脈疾患**患者の腸内細菌叢の特徴(*JAT* 2016)や、腸内細菌情報を用いた疾患発症予測法(*Heart Vessels* 2017)を報告している。さらに、動脈硬化予防菌 *Bacteroides vulgatus* and *dorei*を発見し、抗炎症の作用機序を証明して、腸内細菌製剤による**動脈硬化**予防法を提案し(*Circulation* 2018)、臨床応用に向けた企業との共同研究を実施している。また、**心不全**患者の腸内細菌叢の特徴や(*Circ J* 2018)、高齢者で増加している不整脈の**心房細動**と腸内細菌叢との関連も報告し(*Heart Vessels*, 2021)、**大動脈瘤**での調査を開始している。

【目 的】

本研究の目的は、動脈瘤・心不全の腸内細菌叢の臨床研究から得られたエビデンスを基に、その疾患モデルマウスを用いて、腸内細菌自体または腸内細菌関連代謝物に介入する全く新規の治療方法を開発することである。一連の「腸内細菌と循環器疾患との関連調査」の成果から得られる治療法候補について、動物実験にて有用性の評価と作用機序の解明を行い、その後の前臨床試験・臨床治験に進めることを目標とし、企業との共同研究で腸内細菌製剤の提供プラットフォームの確立も目指す。

【方 法】

- (1) (a) **動脈瘤**マウスモデルに開発中の動脈硬化予防菌 *Bacteroides vulgatus* と *dorei* 2 菌種製剤を投与して抑制効果を検証した。アポリポ蛋白 E 遺伝子欠損動脈硬化マウスに高脂肪食を 6 週間負荷し、その後追加でアンギオテンシン II (1000 ng/kg/min)を皮下埋め込みポンプで 4 週間持続投与する動脈瘤モデルを使用した。抑制できれば、その機序を解明する。
(b) 実施中の動脈瘤患者の臨床研究のエビデンスから、新しい腸内細菌製剤候補菌を選出し、動物実験で有効性を検証して、新規の動脈瘤の悪化予防菌の樹立を目指したが、臨床研究がそこまで進まなかった。そこで、上記のマウス動脈瘤モデルに抗生物質を経口投与して、腸内細菌の除菌が、動脈瘤に与える影響を検証した。
- (2) (a) **心不全**(特に有効な治療方法のない拡張障害心不全 Heart Failure with preserved Ejection Fraction; HFpEF)のマウスモデルを確立する。このモデルの確立は、この研究分野における未達成目標であり最近の論文報告の分をさらに変更し、より本来のヒト HFpEF に近い病態モデルの確立を目指す。一酸化窒素合成酵素阻害薬(L-NAME)を継続飲水投与し、NO 産生を阻害する高血圧/拡張障害心不全マウスモデルが報告された(*Nature* 2019)。我々は、この 12 週間 L-NAME 投与後にアンギオテンシン II (500 ng/kg/min)を 4 週間持続皮下投与して高血圧・心肥大を増強させ、さらに強制経口水分投与にて、肺うっ血症状が増悪する心不全マウスモデルを確立する。
(b) すでに実施した心不全と腸内細菌の臨床研究で明らかになっている治療介入候補菌種(*Bifidobacterium*などの候補菌)と菌代謝物(心不全予後規定因子の報告がある trimethylamine N-oxide ; TMAO)への介入法を、上記の HFpEF マウスモデルに実施して、心不全の治療法としての有用性を検証する。

【結 果】

- (1) (a) **動脈瘤** マウスモデルに開発中の動脈硬化予防菌 *Bacteroides vulgatus* と *dorei* 2 菌種製剤を投与したが、動脈瘤の予防効果は認められなかった。
- (b) マウスに非吸収性抗菌薬 4 剤(アンピシリン バンコマイシン ネオマイシン メトロニダゾール)を投与すると、ほとんどの腸内細菌が死滅し、無菌に近い状態を再現できる。そして、この抗生剤を 6 週間投与すると、マウス動脈瘤モデルの動脈瘤が有意に抑制されることが示された。機序までは、完全には解明できていないが、脾臓において単球系の細胞が減少することがわかり、さらなる機序の解明を目指して研究を進めている。近々、論文投稿予定。
- (2) (a) **心不全** (HFpEF) のマウスモデルを確立すべく、実験を実施したが、世界で未だ開発されていないこのモデルマウスの確立は困難であった。そこで、心不全マウスモデルとしては、冠動脈を結紮して作成する心筋梗塞モデルでの実験を進めた。
- 心不全患者のデータ解析を進め、アミノ酸代謝との関連性を見出し、その検証のために上記のマウスモデルを使用した研究を進め、ヒトのデータが中心ではあるが、論文発表した。(Uncovering the role of gut microbiota in amino acid metabolic disturbances in heart failure through metagenomic analysis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine.*)¹⁾
- (b) 心不全マウスモデルでの、腸内細菌代謝物 TMAO の血中濃度を測定すると、ヒトの心不全患者と同じように上昇することが確認できた。少なくとも、TMAO は、心不全の結果としての上昇が示され、心不全の原因かどうかの議論はできないが、結果としての上昇はある。TMAO を減らす介入方法(ある薬剤)を、心不全マウスモデルに投与したけれど、心不全の改善のデータは得られなかった。本動物実験に関連した、TMAO と腸内細菌に関する臨床論文は、報告した。(Metagenomic analysis of gut microbiota reveals its role in trimethylamine metabolism in heart failure. *Int J Cardiol.*)²⁾

【考 察】

動脈瘤に特徴的な腸内細菌叢の同定は、現在研究を進めている。動物実験にて、無菌にすると動脈瘤は改善するので、全体として腸内細菌叢は、動脈瘤を悪化させる方向に働いているようである。

心不全でも高齢者で増加が顕著な HFpEF は、有効な治療介入がほとんどなく、世界的にもそのモデルマウスの確立から研究が進められている。本研究課題内でも HFpEF モデルの確立を目指したが、仮説の通りにはいかなかった。循環器疾患の予後悪化因子としての腸内細菌代謝物 TMAO の血中濃度に注目した研究を進めたが、これも心不全モデルにおいては、治療効果は認められなかった。治療介入の意義に関しては、さらに検証が必要と考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

動脈瘤と心不全の病態における腸内細菌叢の関与と意義について、マウスモデルで検証することで、様々な情報が得られた。動脈瘤では、腸内細菌叢全体としては、病態を悪化させていることが判明し、臨床研究での予防菌ならびに増悪菌の探索を進める(現在進行中)。心不全では、増悪因子としての可能性が報告されている腸内細菌関連代謝物 TMAO の実験を進めた。動物実験での治療標的としての可能性を検証したが、有用性は示すことはできなかった。臨床研究としても展開しており、その意義を含めてさらに研究を進める必要がある。

これらの結果を元に、関連する臨床研究を実施し、動脈瘤・心不全の領域において新規エビデンスを得られる研究、もしくは新規治療法の開発研究につなげたい。

【参考・引用文献】

1. Hayashi T, Yamashita T, Takahashi T, Tabata T, Watanabe H, Gotoh Y, Shinohara M, Kami K, Tanaka H, Matsumoto K, Hayashi T, Yamada T, Hirata K. Uncovering the role of gut microbiota in amino acid metabolic disturbances in heart failure through metagenomic analysis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. In press.
2. Emoto T, Hayashi T, Tabata T, Yamashita T, Watanabe H, Takahashi T, Gotoh Y, Kami K, Yoshida N, Saito Y, Tanaka H, Matsumoto K, Hayashi T, Yamada T, Hirata K. Metagenomic analysis of gut microbiota reveals its role in trimethylamine metabolism in heart failure. *Int J Cardiol*. 2021; 338: 138-42.