

「腸内細菌に介入する新規動脈硬化予防法の開発研究」

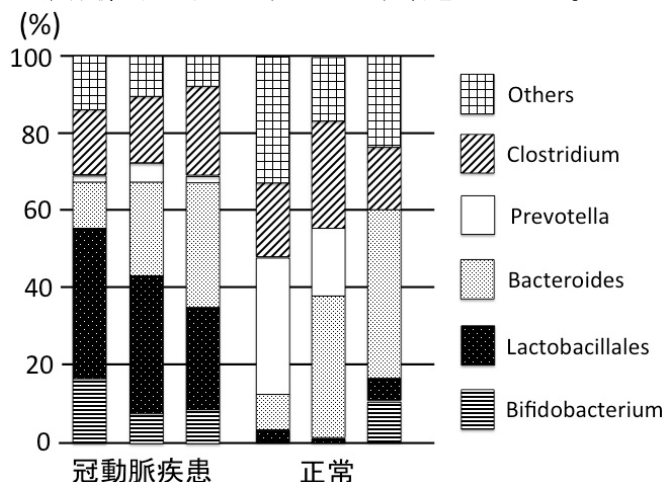
神戸大学医学部附属病院 循環器内科 山下 智也

1 研究の背景と目的

日本での心筋梗塞や脳梗塞を代表とする動脈硬化性疾患は癌について死亡原因の第2位である。高齢化に伴い動脈硬化重症患者数は増加し、医療費の高騰化にも大いに関係している。しかし、生活習慣病など危険因子のコントロールでは心血管イベントを必ずしも抑制できず、新規予防法の開発が期待されている。申請者は動脈硬化の抗炎症免疫療法の確立を目指した基礎研究をこれまで継続して行っており、その中で“**腸管免疫修飾により動脈硬化が予防できる**”という独創的な動脈硬化の新規予防法の概念を提唱している。

近年、臨床研究によって**腸内細菌叢**のタイプが肥満の発症に影響を及ぼすことが示され、その治療として腸内細菌への介入が模索されている。動脈硬化においても、腸内細菌が代謝する産物を介して動脈硬化の悪化に関与するという報告があるが、関連する菌の分類や特定は行われていない。以上の研究背景より、腸管免疫機能に強く影響する腸内細菌叢が、動脈硬化性疾患の発症や悪化に関与し、また治療標的にもなりうるという着想に至った。

我々の行ってきた preliminary な研究により、狭心症や心筋梗塞を含む冠動脈疾患患者の糞便を供与いただき、その中に含まれる腸内細菌の DNA を抽出して、T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)解析[糞便中の細菌 DNA を PCR にて増幅し、制限酵素で切断したフラグメントサイズの組み合わせと定量解析にて菌群の種類と存在量を、主な腸内細菌について門や属レベルで解析する方法]にて調査した。右のデータのごとく、冠動脈疾患患者で、Lactobacillales 目の菌が増加していることが判明した。



本研究の目的は、**動脈硬化性疾患の発症や悪化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、**腸内細菌に介入する新規の動脈硬化性疾患の予防法の確立**を目指す。

2 研究方法・研究内容

細菌の特定には、昔は特異的な培地を用いて培養することで分類し同定する作業が必要であったが、最近では分子生物学の発展により、細菌遺伝子を用いた分類法と同時に存在量の解析までができるようになってきている。特に、腸内細菌に関しては、ほとんどが嫌気性菌であり、分離培養が困難または不可能な菌が 70%以上と言われており、細菌遺伝子を用いた解析が必須である。上記の preliminary データでも示したように、これまでのデータベースを利用することで、人の糞便に存在する菌 (=大腸を中心に存在するいわゆる腸内細菌) の特定ができる。

実際の研究方法：以前に T-RFLP 法で得られた研究成果のより詳細な解析を行った。冠動脈疾患患者・糖尿病や脂質異常症をお持ちであ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コントロールの 3 群の解析を詳細に行い、さ

らに新たな腸内細菌と疾患との関連性を調査した。患者の臨床的データとの関連を解析することで、冠動脈疾患のみならず、肥満・糖尿病・高血圧・脂質異常症などの病態と関連する可能性のある菌の属種の情報も得られる可能性があるため、解析を進めた。

新たに、冠動脈疾患患者と 30 人と糖尿病・脂質異常症（冠動脈疾患なし）30 人に糞便を供与いただき、一定の方法にて糞便から腸内細菌の DNA を抽出した。そして、以下の腸内細菌叢分析を進めた。

16S rDNA ランダムシーケンス法による腸内細菌分析；全ての細菌には、約 1500 塩基からなる 16S リボソーム(r)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。抽出遺伝子 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る。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する。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

本研究内での糞便中の腸内細菌叢(フロー)解析の進め方

T-RFLP法

おおまかな菌群(門)と疾患との関連データが得られる(既に終了)

16S rDNAランダムシーケンス法

約200の菌の属種と疾患との関連データが得られる

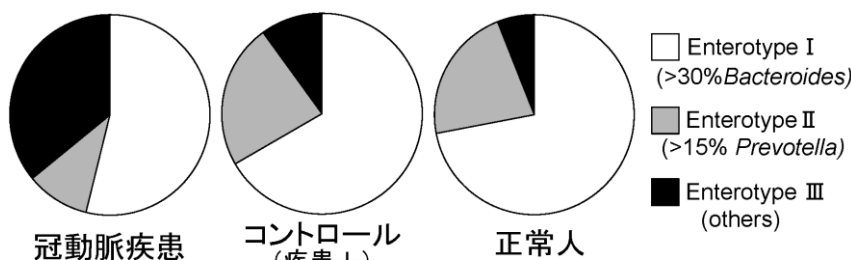
細菌DNAメタゲノム解析

約1000の菌種と疾患との関連データが得られ、代謝関連遺伝子の情報も得られる

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、共同研究者(山田拓司 東京工業大学大学院生命理工学研究科)の支援を受けて行っている。

冠動脈疾患患者で増加していた *Lactobacillus* 菌群の中でのどの属種が、冠動脈疾患の発症に関与しているのか、さらに詳細な菌種に関わる情報まで解析している。今回の研究期間内では、左記のメタゲノム解析までは進められていない。

3 研究成果



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。

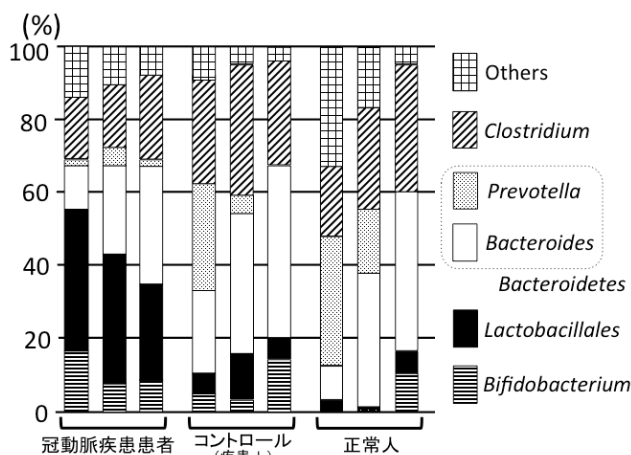
左記の図は、2011年に報告された、人の腸内細菌叢を3つの型(Enterotype)に分類できるとする報告に準じて、我々の研究成果をそれに当てはめたものである。冠動脈疾患患者・糖尿病や脂質異常症をお

持ちであ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の3群の解析を行うと、冠動脈疾患患者に明らかに黒の部分、すなわち Enterotype III 型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のある程度特定して、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。

2006年のNatureの報告の中に、腸内細菌叢の中でグラム陽性菌の代表格である Firmicutes 門の菌が多く、グラム陰性菌の代表格である Bacteroidetes 門の菌が少ない人

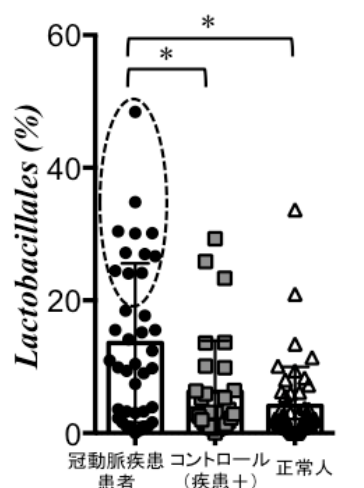
が、肥満になりやすいという報告があった。我々の調査の中で、日本人で調べても同じ傾向があることが分かった。

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。上記の肥満においても Bacteroidetes 門が多い方が、肥満になり難いことが分かっているため、冠動脈疾患でも同様の傾向があることが判明した。この 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、その菌を同定する作業が必要であると考えている。



新たに行った 16S rDNA ランダムシーケンス法による研究成果の一部を紹介する。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ている (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る。

さらに、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 (右の図の点線で描いた丸の中の人) は、冠動脈疾患は 3 本ある冠動脈の中の 2 本以上に有意狭窄を認める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 PCI (カテーテルによるステント治療) 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。



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(点線内)は、すべて多枝病変(重症)であった。

当初の研究計画では、上記のような菌を特定できれば、その培養菌株を樹立して、疾患予防に使用できるかなど治療介入への応用にまで研究を進展させたいと考えていたが、1年の期間内には、ここまでの成果となっている。

4 生活や産業への貢献および波及効果

盛んとなってきている“腸内細菌と疾患発症との関連調査”を循環器臨床研究の中で進めた。その成果に基づき基礎研究の手法を用いて、“新規の臨床応用可能な腸内細菌に介入する動脈硬化予防法”を開発することを目指して、研究を進めている。ヒト腸内細菌に関する研究であり、その生体作用の機序の解明や治療効果の検証を動物実験にて行うことで、そのまま臨床応用できる検査法や治療法が創出できて、研究成果を比較的早急に臨床に還元できることを目標にしているが、未だこの分野の研究が方法を含めて発展途上であると

いう現実もある。

冠動脈疾患を代表とする動脈硬化性疾患は、その基盤に生活習慣病が存在し、その予防や治療に医療費のかかなりの部分を使用されているという事実があり、本研究の先には、医療費の増大に依存しない生活習慣病の予防法の開発という大きな課題を設定している。これまでの医学研究は、人命を尊重し、疾患の罹患率を減少させたり、予後を改善するための研究が主体となっていたが、その成果は新薬の開発や新しい治療法の開発につながり、前記の目標は達成できるが、最終的に医療費の高騰という結果を招き、日本の保険制度の崩壊・安心して医療を受けられる体制の崩壊につながっているとも解釈できる。研究成果が産業・経済の発展に貢献することは、確かに社会貢献につながる一面もあるが、これからの基礎研究を含む医学研究（特に医療を提供する医師がすすめる研究）は、その成果が医療費を増大させず、現状の医療制度をできる限り守ることを意識したような研究になっていくべきと考えており、本研究成果の先には、それに貢献できる可能性があると感じている。

最後になりましたが、本研究にご支援賜りました公益財団法人ひょうご科学技術財団に深く感謝申し上げます。

参考文献； 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.