腸内細菌と循環器疾患

平田 健一 山下 智也

Key words 腸内細菌, TMAO, enterotype, 冠動脈疾患, 心不全

はじめに

腸内細菌と肥満・糖尿病等の代謝性疾患や炎症性腸疾患の発症との関連性が報告され、腸内細菌叢への治療的介入も視野に入れた研究が進められている。我々は、腸管における免疫寛容誘導により、動脈硬化を予防できることを示し¹⁾、腸管に注目したことがきっかけとなり、循環器疾患と腸内細菌との関連性を調査する研究を実施した。冠動脈疾患 (coronary artery disease: CAD) に特徴的な腸内細菌叢のパターンを報告しており²⁾、将来の「腸内細菌やその生体作用に介入する循環器疾患予防法」の確立を目指した研究を進めている³⁾。腸内細菌は、宿主の代謝と免疫機能に大きな影響を及ぼし、生体の恒常性維持に重要な役割を担っている (図1)。本稿では、腸内細菌に着目した循環器疾患領域の研究を紹介し、この分野の現状及び臨床応用への展望を述べたい。

1. 腸内細菌と循環器疾患との関連

1) ヒト腸内細菌叢と臨床検査としての菌叢解析

ヒトの腸内細菌叢は、グラム陽性菌のFirmicutes門とActinobacteria門、グラム陰性菌のBacteroidetes門とProteobacteria門に属する細菌で全体の98%以上を占めている。個人でいうと、1~2歳頃までに、ある程度腸内細菌叢は固定され、その構成は遺伝的要因や環境要因によって規定されていく。個人差が大きく、食習慣等が大きな影響を与えるとされるが、それを変化させることで、菌叢の構成を劇的に変える方法は未だ確立されていない。

糞便中に含まれる優位菌によって、ヒトの腸内細菌叢を3種類のenterotypeに分類できるという報告がある⁴⁾。Bacteroidesが優位なtype I, Prevotellaが優位なtype II, Ruminococcusが優位なtype IIIに分類された。これで、健常者とある疾患患者の腸内細菌叢の差異の比較を意識できる

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

115th Scientific Meeting of the Japanese Society of Internal Medicine: Educational Lecture: 13. Gut microbiome and cardiovascular diseases. Ken-ichi Hirata and Tomoya Yamashita: Division of Cardiovascular Medicine, Department of Internal Medicine, Kobe University Graduate School of Medicine, Japan.

本講演は、平成30年4月14日 (土) 京都市・京都市勤業館 (みやこめっせ)/ロームシアター京都にて行われた。

図1 宿主要因が腸内細菌叢を決定し、
腸内細菌は宿主の恒常性維持に与関する

腸内細菌は代謝物・栄養成分の合成や吸収に影響し、胆汁酸代謝を介して脂質代謝にも大きな影響を与える。代謝と免疫を介し、宿主生体機能の維持において大きな役割を担っている。

ようになり、臨床研究が進むきっかけとなった。

腸内細菌叢の解析方法は複数あるが、臨床応用を視野に入れ、簡便性及びコストを考慮した方法としては、細菌分類に使用されてきた16Sリボソーム（r）RNA（ribonucleic acid）遺伝子を、特異的なプライマーを用いてPCR（polymerase chain reaction）で増幅して解析する方法が利用しやすい。PCR産物を次世代シーケンサーにて遺伝子配列を読んで解析する16S rRNA遺伝子ランダムシーケンス法がよく使用されている。また、PCR産物を特定の制限酵素で処理して生じたDNA断片のサイズと量を分析し、細菌の門～目レベルの解析が可能なterminal restriction fragment length polymorphism（T-RFLP）法も安価であり、使用されている。

2) 腸内細菌代謝物と心血管イベントとの関係

ホスファチジルコリン（phosphatidylcholine：PC）の腸内細菌関連コリン代謝物であるトリメチルアミンN-オキシド（trimethylamine N-oxide：TMAO）と心血管イベント発生との関連性が臨床研究において示された⁵⁾（図2）。この研究では、血液サンプルのメタボローム研究

で、TMAOの血中濃度が高いほど心血管イベントが多いことが示された。経口摂取する卵、牛肉、チーズ等に含まれるPCは、消化管内でコリンに代謝され、さらに、腸内細菌の酵素トリメチルアミン [(trimethylamine：TMA)] リアーゼにより、TMAに代謝される。TMAは腸管から吸収され、宿主の肝臓の酵素によって代謝されてTMAOとなる（図2）。動脈硬化モデルマウスにPCを経口投与すると、マウスの血中脂質濃度には影響を与えずに血中TMAO濃度が上昇し、普通食投与群に比較して動脈硬化は悪化した。さらに、同時に広域スペクトラム抗生物質を投与して腸内細菌を除菌すると、PC投与による血中TMAOの増加は抑制され、動脈硬化の悪化が抑制された。TMAOは、動脈硬化巣における脂質成分蓄積に重要な“マクロファージの泡沫化を増加させる”ことと、“末梢から肝臓へのコレステロール逆転送系を抑制する”ことにより、動脈硬化の形成を促進することが示された。さらに“血小板凝集能を亢進させる”ことにより、動脈硬化粥腫破綻の際の血栓性閉塞の可能性を上昇させることで、心血管イベント増加に与関することが示唆された⁶⁾（図2）。すなわち、腸内細菌が動脈硬化の悪化につながる代謝物の産生を介し、疾患の発症や進展に与関していることが示された。この結果は、「腸内細菌叢に対する介入が心血管イベントの予防戦略になり得る」ことを示したという意味でも、非常に意義のある研究成果である。このTMAの産生に関わる腸内細菌酵素TMAリアーゼを抑制する薬物の研究が既に進められており、新たな心血管病治療薬として期待される。

3) 冠動脈疾患になりやすい腸内細菌叢は存在するのか

我々は、循環器内科病棟に入院される虚血性心疾患患者にご協力いただき、糞便の細菌叢のタイプを解析した。冠動脈疾患、糖尿病等の生活習慣病を有するコントロール患者、そして、

図2 腸内細菌は代謝物を介して動脈硬化性疾患の悪化に関与している
ホスファチジルコリンの腸内細菌代謝物トリメチルアミンが、さらに宿主（ヒト）の肝酵素を介してトリメチルアミン N-オキシド（TMAO）に代謝される。TMAO は、動脈硬化性疾患の増悪、心血管イベントの増加に関与していることが想定されている。

健常者の糞便中に含まれる腸内細菌叢を T-RFLP法にて調査した。このデータを用いた優位菌による腸内細菌叢分類 enterotype の結果を図 3A に示す。健常者に比較し、冠動脈疾患患者に enterotype III が多いことがわかり²⁾、脳梗塞・頸動脈狭窄の患者の研究にて報告された結果と同じ傾向であった。

この T-RFLP 法による腸内細菌検査法では、腸内細菌を約 10 の門～目に分類し、それぞれの存在比率がわかり、人の糞便中の菌叢の概要を知ることができる。健常者に比較し、冠動脈疾患患者では、ラクトバシラレス (*Lactobacillales*) 目の増加、バクテロイデス (*Bacteroidetes*) 門 (*Bacteroides* + *Prevotella*) の減少が特徴的であった²⁾ (図 3B)。単純に考えると、ラクトバシルス菌群のなかに、冠動脈疾患を悪化させる菌が含まれていることになるが、もちろん、この結果だけでは因果関係までは解明できない。腸内細菌は、ある菌種が多ければ、特定の菌種が

増減するという関係も存在するため、そのことも結果の解釈を難しくしている。

2. 腸内細菌叢検査を疾患発症予測に利用できるか

1) 腸内細菌叢検査を利用した冠動脈疾患の発症予測

統計学的手法であるデータマイニング法を利用し、前述のデータを発症リスク予測に利用できるか検討した⁷⁾。菌の遺伝子配列の差による大まかな分類 OTU (operational taxonomic unit) の存在比率データを用い、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 とを効率的に分類し、決定木 (ディシジョン・ツリー) といわれるフローチャートを作成した (図 4)。このなかでも、CAD か Ctrl かの決定因子としては、バクテロイデスとラクトバシルスが最

図3 冠動脈疾患患者に特徴的な腸内細菌叢

A: 冠動脈疾患に特徴的な enterotype

ヒトの腸内細菌叢のパターンは3種類の enterotype に分類できる。冠動脈疾患患者では、enterotype III型のルミノコッカス (*Ruminococcus*) 菌が優位なタイプが多かった。

B: 冠動脈疾患に特徴的な腸内細菌叢 (文献2より改変)

冠動脈疾患患者で、ラクトバチルス (*Lactobacillales*) 目菌が増加し、バクテロイデス (*Bacteroidetes*) 門菌が減少するという特徴があった。

も強い因子であり、その次にクロストリジウムが関係することが示された。そして、別の冠動脈疾患既発症患者5名 (CAD患者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ていくと、No.2の患者がCADでありながらコントロールに分類され、このフローチャートの感受性は80%という結果であった⁷⁾。厳密には、後ろ向き研究の評価であるため、このフローチャートで未来の発症予想はできない。このような腸内細菌叢のタイプや相違を冠動脈疾患リスクの評価に使用できるのか、今後、前向き研究により明らかにしていく必要がある。

2) 腸内細菌叢検査結果は臨床でどのように利用できるか

これらの研究成果の臨床応用を考えると、現状では、全ての人に対して腸内細菌検査は不要と思われるが、例えば、生活習慣病患者に実施

し、そのなかのenterotype IIIの方、ラクトバチルス目菌の多い方、バクテロイデス門菌の少ない方は、通常よりも冠動脈疾患リスクとなる糖尿病、脂質異常症、高血圧をより厳格に指導・管理する等の現実的な対応に利用できるかもしれない。

3. 腸内細菌叢を標的にした循環器疾患治療の可能性

1) 冠動脈疾患の発症に関係する腸内細菌種の同定と治療への応用

T-RFLP法による解析によって、門レベルでの菌叢の特徴が明らかになったため、新たにエンタリーした患者群において、16S rRNA遺伝子ランダムシーケンス法を用いて、前述の研究結果の再確認とさらに詳細な腸内細菌叢 (属レベ

図4 腸内細菌叢データを利用した冠動脈疾患の発症予測 (文献7より改変)

T-RFLP 法により解析した腸内細菌叢データを、データマイニング法により決定木を作成し、それをフローチャートとして代用する方法で、疾患発症予測のシミュレーションを行った。エントリーしたのは糖尿病等の冠動脈疾患の危険因子を有するコントロール患者と、既に冠動脈疾患を発症している患者であり、冠動脈疾患発症予測の感受性が 80% という結果であった。厳密には、この方法で発症予測はできていないが、さらに検討を進める。

ル)の解析を実施した。そのなかで、コントロール患者に比較し、冠動脈疾患患者で有意に減少しているバクテロイデスの2菌種 (*Bacteroides vulgatus*と*Bacteroides dorei*)を同定し、病態との関連性を調査した。この菌株を培養し、動脈硬化マウスに経口投与すると、動脈硬化を抑制できることが判明し、複数の抗炎症作用が想定されている⁸⁾。さらに詳細な動脈硬化抑制の機序を解明中であり、微生物製剤としての可能性も検討する。

2) 心不全治療のための腸内細菌叢への介入法とは

心不全と腸内細菌との関係を調査した複数の臨床研究が既に存在する。我々も、心不全と腸内細菌及びその代謝物との関連性を調査する臨床研究を実施しており、心不全に特徴的な菌叢の変化を確認している。動脈硬化性疾患の研究と比較し、研究によって結果がかなり異なる印象があり、その意義を含めて検討する必要がある。腸内細菌自体やTMAOを含めた腸内細菌代謝物を標的にした心不全の治療法を探索中である。

3) 腸内細菌叢に介入する 循環器疾患の予防法とは

腸内細菌が疾患発症や増悪に関連するのであれば、それを変化させる治療が想定される。疾患の原因や悪化に関連する菌を抗生物質で除菌するというのは、最も納得できる方法である。しかし、胃炎や胃癌の原因となる*Helicobacter pylori*のような循環器疾患の原因となる菌は、同定されていない。疾患の予防につながる菌があれば、それを微生物製剤に使用できる。糖尿病で減少していた*Akkermansia muciniphila*は、その投与でマウスの糖代謝が改善し、動脈硬化が抑制され、生活習慣病予防菌として注目されている⁹⁾。糖尿病治療薬のメトホルミンは、この菌種を増加させる等、腸内細菌叢を変化させて生体に良い影響をもたらす可能性が報告されている¹⁰⁾。糞便移植によって、良い菌が含まれている糞便を患者に移植する方法が臨床応用され、*Clostridium difficile*感染症や潰瘍性大腸炎で実施された。効果は報告によりさまざまで、どのような糞便中の菌の有効性が高いのか、機序の解明が待たれる。先に紹介したように、TMAO等菌の代謝物に注目した研究も盛んに行われており、短鎖脂肪酸も治療標的として注目されている(図1, 2)。すなわち、菌の生体作用を担う物質を増減させることで、疾患予防につなげたいという考え方である。ある食品摂取(もしくは制限)により、疾患予防的な菌叢に変化させることができれば、医療費を抑制しながら患者へ貢献することができる。

おわりに

腸内細菌叢と疾患発症との関連性が世界的に研究されている。循環器疾患においても、腸内細菌叢との関連を調査する研究が進められており、将来は「腸内細菌叢を変化させる循環器疾患の予防法」が開発されるのではないかと考えている。この分野の研究が進展し、1日も早く、臨床において患者に貢献できるようにしたい。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：平田健一；講演料(アストラゼネカ, MSD, 興和創薬, 第一三共, 武田薬品工業, テルモ, 日本ベーリンガーインゲルハイム, 持田製薬), 研究費・助成金(アクテリオン ファーマシューティカルズ ジャパン, グラクソ・スミスクライン, シスメックス, 第一三共), 寄附金(アステラス製薬, アボット バスキュラー ジャパン, エーザイ, MSD, 大塚製薬, 小野薬品工業, 協和発酵キリン, 興和創薬, 三和化学研究所, 第一三共, 大日本住友製薬, 武田薬品工業, 田辺三菱製薬, ニプロ, 日本ベーリンガーインゲルハイム, 日本メジフィジックス, ノバルティス ファーマ, バイエル薬品, 富士フイルムRIファーマ, ボストン・サイエンティフィック ジャパン, 持田製薬), 寄附講座(シスメックス, セント・ジュード・メディカル, 日本メドトロニック), 山下智也；講演料(アストラゼネカ, MSD, 興和創薬, 第一三共, 武田薬品工業, テルモ, 日本ベーリンガーインゲルハイム, 持田製薬), 研究費・助成金(アクテリオン ファーマシューティカルズ ジャパン, グラクソ・スミスクライン, シスメックス, 第一三共), 寄附金(アステラス製薬, アボット バスキュラー ジャパン, エーザイ, MSD, 大塚製薬, 小野薬品工業, 協和発酵キリン, 興和創薬, 三和化学研究所, 第一三共, 大日本住友製薬, 武田薬品工業, 田辺三菱製薬, ニプロ, 日本ベーリンガーインゲルハイム, 日本メジフィジックス, ノバルティス ファーマ, バイエル薬品, 富士フイルムRIファーマ, ボストン・サイエンティフィック ジャパン, 持田製薬), 寄附講座(シスメックス, セント・ジュード・メディカル, 日本メドトロニック)

文献

- 1) Sasaki N, et al : Oral anti-CD3 antibody treatment induces regulatory T cells and inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Circulation* 120 : 1996–2005, 2009.
- 2) Emoto T, et al : Analysis of gut microbiota in coronary artery disease patients : A possible link between gut microbiota and coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb* 23 : 908–921, 2016.
- 3) Yamashita T, et al : Intestinal Immunity and gut microbiota as therapeutic targets for preventing atherosclerotic cardiovascular diseases. *Circ J* 79 : 1882–1890, 2015.
- 4) Arumugam M, et al : Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473 : 174–180, 2011.
- 5) Wang Z, et al : Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472 : 57–63, 2011.
- 6) Zhu W, et al : Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk. *Cell* 165 : 111–124, 2016.
- 7) Emoto T, et al : 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* 32 : 39–46, 2017.
- 8) Yoshida N, et al : *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* reduce gut microbial lipopolysaccharide production and inhibit atherosclerosis. *Circulation* (in press).
- 9) Plovier H, et al : A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* 23 : 107–113, 2017.
- 10) de la Cuesta-Zuluaga J, et al : Metformin is associated with higher relative abundance of mucin-degrading *Akkermansia muciniphila* and several short-chain fatty acid-producing microbiota in the gut. *Diabetes Care* 40 : 54–62, 2017.