



シリーズ 腸内細菌叢 8

腸内細菌と動脈硬化性疾患

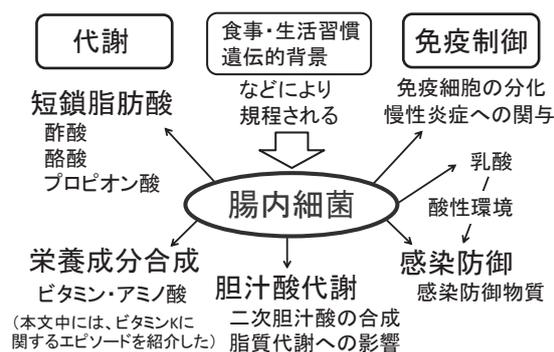
Gut microbiome and atherosclerotic cardiovascular disease

やま した とも や ひら た けん いち
 山下 智也* : 平田 健一**
 Tomoya YAMASHITA Ken-ichi HIRATA

I. 腸内細菌叢の宿主生体機能への影響

消化器である腸管は、人体で最大の免疫臓器でもあり、侵入する病原性微生物に対しては排除する免疫反応を誘導する一方で、食物抗原や共生する腸内細菌に対しては過剰な免疫反応を起こさないように免疫寛容を維持する必要がある。そして、そこに生息する腸内細菌は、宿主の生体機能に様々な影響を与え、特に免疫機能と代謝への影響が注目されている。

腸内細菌は、宿主の食事を含む生活習慣と遺伝的背景によって決定されると考えられている。そして、生体内の様々な栄養成分の産生・胆汁酸の代謝とそれに関連する脂溶性物質の代謝吸収・感染防御・免疫制御などに関係し、宿主生体機能の恒常性の維持に常に関係している(図1)。特に腸内細菌の産生す



腸内細菌は宿主の生体恒常性維持に重要な役割を担っている

図1 腸内細菌叢の生体内での役割

食事・生活習慣・遺伝的背景などにより、個人の腸内細菌叢は決まると考えられている。宿主の代謝と免疫に関して、大きな役割を担っていると考えられ、生体恒常性の維持に重要な役割を担っている。

る短鎖脂肪酸(酢酸・酪酸・プロピオン酸など)の生体作用、すなわち代謝のみならず免疫細胞の分化への作用などが注目されており、その治療応用も含めて研究が進められている。医療の中で、腸内細菌叢の存在を意識するエピソードは複数ある。弁膜症の術後・心房細動・静脈血栓症などで抗凝固薬ワルファリンを内服している患者が、尿路感染症などで数日間の抗生物質を追加内服した際に、ワルファリンの効きが良くなり過ぎて、効果指標のPT-INRが過剰に延長し、出血を心配するくらいになることがある。これは、抗生物質投与でビタミンKを産生する腸内細菌が激減し、ビタミンK依存性の凝固因子の産生を阻害する薬物作用が、より強力に発揮されてしまう結果だが、ビタミンKを含有する納豆を摂取してワルファリンの効果が減弱するのと反対の現象である。さらに、ワルファリンの効果に個人差があるのも、個人の保有する常在細菌叢の差異、すなわち腸内細菌の持つビタミンK産生酵素量の差異が関連するものと思われるが、最近では菌種の多少を議論するよりも腸内細菌の持つ機能遺伝子の量を調査することの方が、ある代謝や生体機能への影響を評価することにつながり、より重要であると考える研究者が増えているようである。

II. 腸内細菌代謝物による動脈硬化の増悪

臨床研究で、コリンやL-カルニチンの腸内細菌代謝産物であるTMAO(trimethylamine N-oxide)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ている(図2)^{1,2)}。動脈硬化マウスにコリンを投与するとTMAOの血中濃度が上昇し、動脈硬化が悪化することも報告された¹⁾。コリンとL-

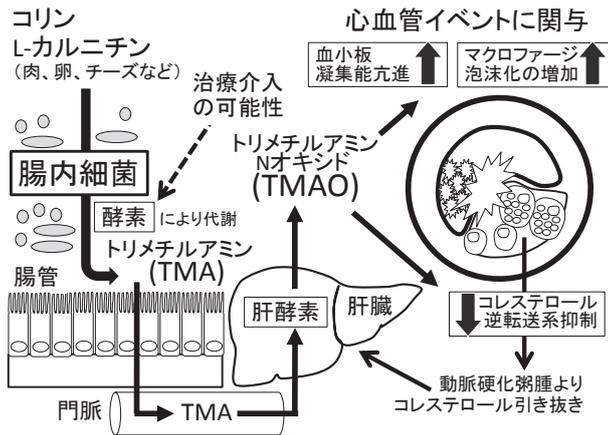


図2 腸内細菌代謝物により動脈硬化は悪化する

食事に含まれるコリンやL-カルニチンの腸内細菌による代謝産物 TMAO の血中濃度が高いヒトに心血管イベントの発生が多いことが示された。この一連の研究成果によって、腸内細菌は少なくとも代謝を介して、動脈硬化に悪影響を与える機序が存在することが示された。
(文献 1, 2) を元で作成

カルニチンは、卵・チーズ・牛肉などに含まれており、消化管内で腸内細菌の酵素によって代謝されて TMA (trimethylamine) となる。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 TMAO となる。コリン投与の動脈硬化マウスに、追加で広域スペクトラム抗生物質を投与して腸内細菌をほとんど無くしてしまうと、コリン投与による血中 TMAO の増加は抑制されて、動脈硬化の悪化がキャンセルされた。TMAO の作用機序として、動脈硬化巣での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”、“コレステロールの逆転送系が抑制される”ことが示され、さらに心血管イベント発生時の血管血栓閉塞に重要な“血小板凝集作用の促進”に関連することが証明された^{2,3)}。すなわち、腸内細菌が代謝物を介して動脈硬化悪化や心血管イベント増加に関与することが初めて示された。そしてこの結果は、「腸内細菌叢に対しての治療介入が、動脈硬化性疾患の予防戦略になりうる」ことを示したという意味でも、大変意義のある研究成果である。すでにこの TMA の産生に関わる腸内細菌の持つ酵素を抑制する治療も想定され、臨床応用を視野にいたれた研究が行われているようである⁴⁾。

Ⅲ. 腸内細菌叢をどのように知り、分類することができるのか？

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 (図 3)。個人でいうと、幼児期以降にある程度固定され、短期的な抗生物質投与で一時的には変化しても、その後元に戻ると報告されている。おそらく遺伝的要因、環境要因により規定され、個人差は大きく、食事の習慣等は腸内細菌叢の構成に影響があるようだが、それを変化させることで菌叢の構成を劇的に変えることは困難なようである (図 1)。

各個人の腸内細菌叢を検査する…と言えば、ほとんどの医療従事者は便培養を思い浮かべるかもしれないが、腸内細菌のかなりの菌は培養困難菌である。培養法は、ある菌の存在の有無の判定には有効であるが、腸内細菌全体の網羅的解析は不可能である。腸内細菌叢の解析は、分子生物学的・遺伝子工学的解析技術の発展と DNA シーケンサーの進歩により、腸内細菌叢遺伝子を解析することで可能になった。比較的簡単にコストも考慮して医学臨床応用を視野に入れた方法としては、細菌の 16S リボゾーム (r) RNA 遺伝子の特異的なプライマーを用いて増幅して解析を行う方法が利用し易い。今後明らかにされるであろう様々な研究成果を、診断や治療として実際の患者さんに適応する際には、その個人の腸内細菌(叢)を検査する必要がある、まずは臨床検査として比較的安価な腸内細菌検査法の確立が必要である。日本でも、腸内細菌に関連するベンチャー企業が数多く設立され、中には 2 万円程度で、個人の糞便中の腸内細菌の検査をするサービスを提供する企業も現れている。保険診療としての実現性は不明ではあるが、理論的には可能な段階になっている。

ヒトの腸内細菌叢を優位菌により 3 種類のエンテロタイプ (Enterotype) に分類できるという報告がある⁵⁾。Bacteroides が優位なタイプ I、Prevotella が優位なタイプ II、Ruminococcus が優位なタイプ III に分類された (図 3)。その後の報告では、必ずしもこれで全てが分類できるわけではなさそうであるが、このような分類ができることで、疾患との関連を調査する研究がやりやすくなったのは事実であり、様々な疾患と腸内細菌叢との関係が明らかになりつつある。脳梗塞・頸動脈狭窄の患者での研究が行われ、タイプ III に頸動脈硬化が多い傾向があることが示された (図 3)⁵⁾。われわれは、循環器内科病

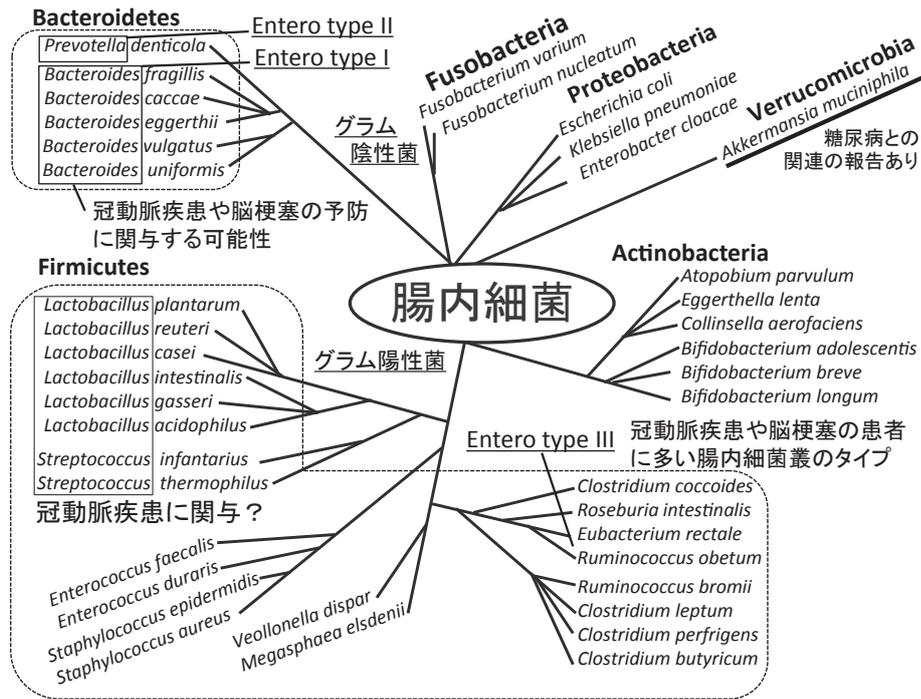


図3 代表的なヒト腸内細菌と疾患発症との関係

ヒト腸内細菌叢の分類表を示す。優位菌によりエンテロタイプ (Enterotype) I~IIIが分類され、疾患との関係が調査しやすくなった。動脈硬化性疾患と糖尿病と、腸内細菌叢との関連を示したが、今後はさらに多くの疾患においてその発症との関連が報告されていくであろう。

棟に入院される虚血性心疾患患者にご協力いただき、糞便の細菌叢を T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism; T-RFLP) 法という簡易法にて解析した。冠動脈疾患患者と、糖尿病や高血圧などの生活習慣病を持つコントロール患者、そして健康な正常人の糞便中に含まれる腸内細菌叢を網羅的に解析した。そのデータを用いて、われわれが分類基準を設定して求めた Enterotype を図4Aに示す。健康者や生活習慣病を持つコントロール患者と比較して、冠動脈疾患患者に Enterotype IIIが多いことがわかり⁶⁾、脳梗塞患者と同様の結果であることがわかった。

この T-RFLP という腸内細菌簡易検査法では、腸内細菌を約 10 種類の門~目に分類して、それぞれの存在比率が分かり、人の糞便中に含まれる菌のおおまかなフロータイプの概要を知ることができる。正常人や生活習慣病コントロール患者と比較して、冠動脈疾患患者ではラクトバシラレス (*Lactobacillales*) 目の増加と、バクテロイデテス (*Bacteroidetes*) 目の減少 (*Bacteroidetes* 門 = *Bacteroides* + *Prevotella* の減少) が存在することがわかった⁶⁾ (図4B)。単純に考えると *Lactobacillales* 目菌の中に、冠動脈疾

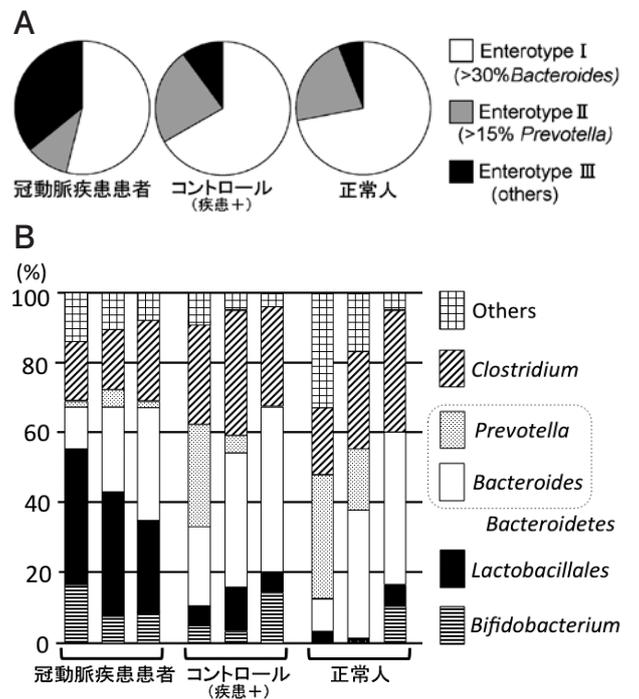


図4 冠動脈疾患患者における腸内細菌叢の特徴

T-RFLP 法により解析した、冠動脈疾患患者群・生活習慣病患者コントロール群・正常健康者群の3群における腸内細菌叢の違いを示す。A. エンテロタイプの相違 B. 代表例をそれぞれ3名ずつ示す。冠動脈疾患患者群にて *Lactobacillales* 目菌が増え、*Bacteroidetes* 門菌が減っている特徴が認められた。(文献6より改変)

患を悪化させる菌が含まれている可能性が想定されるが、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、特定のある菌種が少なくなるという関係も存在するようなので、そのことも結果の解釈を難しくしている。またその後の、腸内細菌メタゲノム解析の結果でも、ほぼ同様の結果が得られており⁷⁾、やはり動脈硬化に関係する腸内細菌叢というのはありそうな印象をもっている。

IV. 腸内細菌叢を調査して、 疾患の発症予測ができるか？

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というバイオインフォマティクス的手法を利用して、生活習慣病コントロール (Ctrl; control) 患者と冠動脈疾患 (CAD; coronary artery disease) 発症患者とを分類して、発症リスク予測に利用できるか検討した⁸⁾。菌のもう少し詳細な分類 OUT (oper-

ational taxonomic unit) の存在比率と疾患の有無により決定木というフローチャートを作成した (図 5)。この中でも、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チルス OTU が、最も強い因子であり、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、新たな冠動脈疾患患者 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の陽性的中率を求めると、No.2の方が CAD でありながら Ctrl の方に分類され、このフローチャートの陽性的中率 (感受性) は 80% という結果であった⁸⁾。

このような腸内細菌叢のタイプや相違が、冠動脈疾患リスクの評価に使用できるのか、さらに将来の治療の標的になりうるのかは、今後の基礎研究と臨床研究により明らかにしていく必要がある。上記の研究成果の臨床応用を考えると、すべての人でこのような検査は不要であると考えているが、例えば生活習慣病患者に腸内細菌叢検査を行い、その中のエンテロタイプⅢの方・ラクトバチルス目菌の多い方・

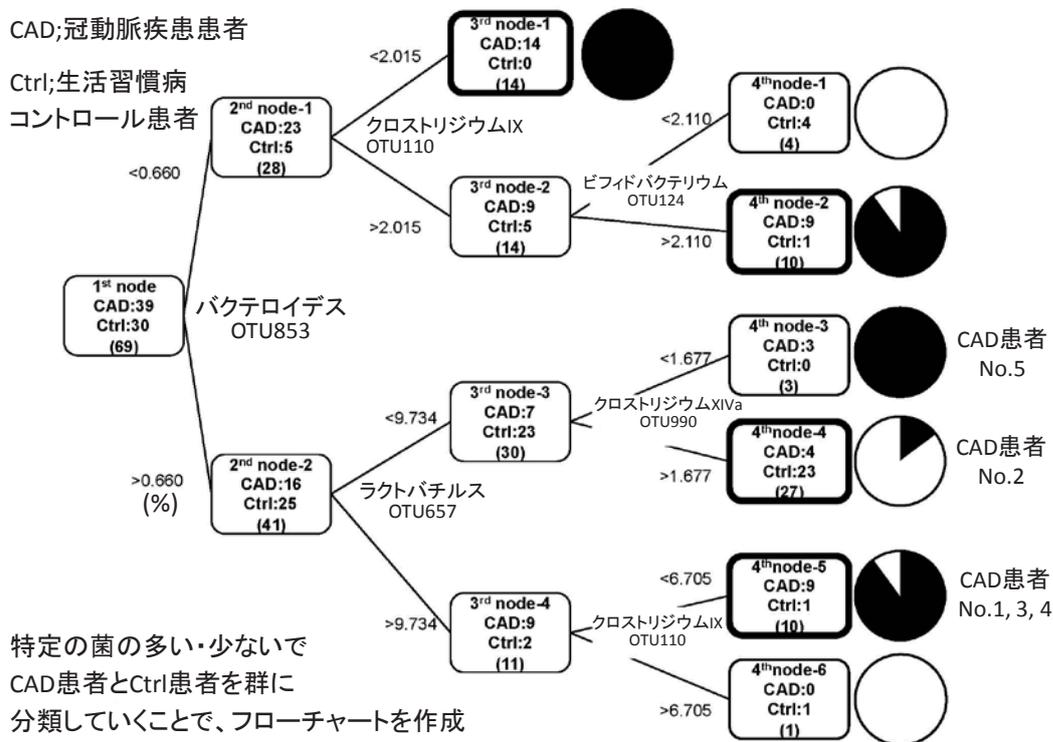


図 5 腸内細菌叢の存在比率により疾患の発症予測が可能か

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。CAD 患者 No.2 がハズレとなり、陽性的中率 (感受性) は 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。

(文献 8 より改変)

バクテロイデス門菌の少ない患者は、通常よりも冠動脈疾患リスクとなる糖尿病・脂質異常症・高血圧の管理をより厳格に行う…などの現実的な対応に利用できるのかもしれない。さらに詳細な属種レベルの解析やそのデータを利用した疾患発症リスク評価法の開発も行っており、次に紹介する研究成果につながっていく。

V. 腸内細菌微生物製剤の開発に向けて

より詳細に冠動脈疾患発症に寄与する腸内細菌を絞り込むため、30名の冠動脈疾患患者と30名の生活習慣病コントロール患者において、腸内細菌属～種レベルの解析が可能な16SリボソームRNA領域のランダムシーケンス法による解析を行った⁹⁾。その結果、冠動脈疾患患者では、*Bacteroides*属の割合が低下しており、特に、存在割合が多い、*Bacteroides vulgatus*と*Bacteroides dorei*の2菌種の存在割合はコントロールと比較して冠動脈疾患患者で有意に低下していることがわかった⁹⁾。そこで、この*Bacteroides* 2菌種には動脈硬化の予防効果があるのではないかという仮説をたて、動脈硬化モデルマウスに投与する実験を実施した。生菌を週5日、10週間に渡り経口で投与すると、様々な抗炎症作用を示し、動脈硬化を有意に抑制できることがわかった⁹⁾。ちなみに、死菌の投与では効果はない。抗炎症機序としては、グラム陰性菌の菌体毒素であるリポポリサッカライドの糞便中ならびに血液中の濃度が、*Bacteroides* 2菌種の投与によって有意に低下することがわかり、その詳細なメカニズムに関しては、現在も調査中である。そして、この菌を腸内細菌製剤として開発するための取り組みを行っており、腸内細菌を変化させる動脈硬化予防法の開発に繋げていきたい。

その他に報告されている有用菌としては、腸管上皮を覆うムチンの産生や分解に関連し、糖尿病患者で減少すると報告された*Akkermansia muciniphila*がある(図3)。この菌を経口でマウスに投与すると、インスリン抵抗性が改善し、動脈硬化が抑制されることが報告されており、生活習慣病予防菌として注目されている。

VI. 腸内細菌叢の将来展望

世界的に腸内細菌叢と疾患発症との関連調査が盛んに実施されており、疾患の治療標的としても腸内細菌が注目されている。今後、このようなタイプの腸内細菌叢の人や、この菌が多いとある疾患になり易い(なり難い)というような報告が出てくることが予想できる。動脈硬化性疾患の研究領域でも研究が進展しており、近い将来に「腸内細菌叢を変化させる動脈硬化性疾患の予防法」も開発されていくであろう。この分野の研究が進展し、一日も早く臨床において患者に貢献したい。

文 献

- 1) Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al: Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011; **472**: 57-63.
- 2) Tang WH, Wang Z, Levison BS, et al: Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2013; **368**: 1575-1584.
- 3) Zhu W, Gregory JC, Org E, et al: Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell*. 2016; **165**: 111-124.
- 4) Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, et al: Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell* 2015; **163**: 1585-1595.
- 5) Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; **473**: 174-180.
- 6) Emoto T, Yamashita T, Sasaki N, et al: Analysis of Gut Microbiota in Coronary Artery Disease Patients: a Possible Link between Gut Microbiota and Coronary Artery Disease. *J Atheroscler Thromb* 2016; **23**: 908-921.
- 7) Karlsson FH, Fak F, Nookaew I, et al: Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun*. 2012; **3**: 124.
- 8) Emoto T, Yamashita T, Kobayashi 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* 2017; **32**: 39-46.
- 9) Yoshida N, Emoto T, Yamashita T, et al: *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* reduce gut microbial lipopolysaccharide production and inhibit atherosclerosis. *Circulation* 2017; **138**: 2486-2498.