

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591114

研究課題名(和文) 腸内細菌叢を変化させて腸管免疫修飾を介する新規動脈硬化予防法の開発研究

研究課題名(英文) Development of novel therapy for prevention of atherosclerosis via modulating gut bacterial flora and intestinal immunity

研究代表者

山下 智也 (Yamashita, Tomoya)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90437468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：腸管免疫修飾物質や腸内細菌を変化させる物質の経口投与による動脈硬化への影響を動物実験にて調査し、ある種の抗生物質による動脈硬化予防効果を証明した。動物実験により腸内細菌と動脈硬化の関連を証明できたので、ヒトでの腸内細菌叢と冠動脈疾患との関連を調査した。正常者に比較して、冠動脈疾患患者の腸内細菌叢では、ラクトバシルス菌群(Lactobacillales)が増加し、バクテロイデス菌群(Bacteroidetes = Prevotella属+Bacteroides属)が減少していた。さらに、詳細な分析にて腸内細菌へ介入する動脈硬化予防法を追求する。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of oral treatment of materials that affect the intestinal immunity or change the gut bacterial flora using the atherosclerosis animal models. Antibiotics against gram-negative bacteria (Neomycin) treatment reduced the atherosclerotic lesion formation in mice, whereas antibiotics against gram-positive bacteria (Vancomycin) treatment had no effect. Now the mechanisms of the experimental results are under investigation. Based on the animal experiments, we examined the association between the incidence of coronary artery diseases (CAD) and the gut bacterial flora types. Compared with normal healthy control person, the content of order Lactobacillales was significantly increased and that of phylum Bacteroidetes was decreased in CAD patients. Further analyses should be needed to attain the therapeutic intervention to gut bacterial flora for prevention of atherosclerotic CAD.

研究分野：動脈硬化

キーワード：動脈硬化 腸内細菌 腸管免疫 制御性T細胞 免疫寛容性樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は慢性の炎症性疾患であるとされているが、臨床医学の現場では直接炎症に介入する動脈硬化性疾患の予防法や治療法は存在せず、その開発が期待されている。我々は、動脈硬化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、将来の臨床応用を目指している。

最近の免疫研究の中で、免疫抑制機能を持つ制御性 T 細胞(regulatory T cell; Treg)が注目され、主に免疫疾患での研究が進んだ。我々も、動脈硬化の免疫研究を進める中で、同細胞に注目して、抗体医薬で腸管における Treg の誘導を介する新規動脈硬化予防法を報告した(Sasaki N, et al. *Circulation* 2009;120:1996-2005)。その研究の中で、世界で初めて動脈硬化巣内の Treg の増加と動脈硬化抑制との関連を報告し、さらに腸管で誘導される免疫寛容性樹状細胞(tolerogenic dendritic cell; tDC)が動脈硬化抑制的に働くことを発見した。そして、活性化ビタミン D₃ の経口投与で腸管にて Treg と tDC を誘導し、動脈硬化が予防できることを報告するに至った(Takeda M, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:2495-2503)。これらの研究成果により“**腸管から動脈硬化を予防する**”という独創的な治療法の新概念(*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:2317-2319)を提唱した。

一方で、肥満を始めとする生活習慣病研究の中で、腸内細菌叢の属種の差異がその疾患の発症に強く関連すると報告され、非常に注目される分野となっている(*Nature.* 2011;474:327-36)。また、腸内細菌と腸管免疫の関連では、ある種の細菌の多少と免疫細胞の分化、すなわち腸管免疫の反応性との強い関連(*Cell.* 2009;139:485-98. *Science.* 2011;331:337-41)が報告され、この分野の研究も盛んになっている。動脈硬化の領域においては、腸内細菌の代謝産物とその悪化に関連するという報告(*Nature.* 2011;472:57-63)はあるが、腸管免疫との関連を含めて、病態の進行とある種の腸内細菌叢との関連を解析したような研究報告はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腸管からの免疫制御による抗動脈硬化免疫療法を開発し、その機序を解明して、将来臨床応用することである。特に本研究課題では、常在腸内細菌叢の種類と腸管免疫反応との関連を明らかにし、プロバイオティクス投与などにより腸内細菌を変化させることで、腸管免疫を修飾し、動脈硬化が予防できるかどうかを明らかにする。

さらに、ヒトにおける動脈硬化性疾患発症に関連する可能性のある腸内細菌叢を明らかにする。

3. 研究の方法

腸管免疫修飾による動脈硬化予防法の開発研究をさらに発展させ、「腸内細菌叢の属種の差異によって動脈硬化巣の進展や予防に与える影響が異なる」という仮説を持ち、その検証を行う。腸内細菌の属種解析を行い、どのような属種の多少と動脈硬化との関連があるのかを解析し、治療介入のターゲットとしての可能性を探る。さらに、経口投与物質での動脈硬化への治療的介入法の確立をめざし、プロバイオティクスを使用した、腸内細菌叢の変化を惹起させ、腸管免疫修飾を介する抗動脈硬化療法が可能かを動物実験により検証する。さらに、倫理委員会での検討の後に、臨床研究に進め、各種循環器疾患における腸内細菌の特徴を調査する研究を行う。

○6 週齢のアポリポ蛋白 E 遺伝子欠損(apoE-KO)マウスに、我々が既に報告している腸管免疫修飾による抗動脈硬化治療法(抗 CD3 抗体、活性化ビタミン D₃、エイコサペント酸)と同様に、経口投与による動脈硬化治療候補(レチノイン酸など様々な腸管免疫修飾候補物質やプロバイオティクス)を開始して、10 週間継続する。16 週齢で大動脈起始部と大動脈全体の動脈硬化巣面積を評価し、コントロール群と比較して動脈硬化抑制作用の有無を評価する。

動脈硬化巣内の免疫細胞の比率の変化と形状の変化を組織学的解析(免疫染色など)によって明らかにする。マクロファージ(MOMA2 抗体)、T リンパ球(抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体)、Treg(抗 FoxP3 抗体)、DC(抗 CD11c 抗体)を使用して局所の解析を行い、脾臓やリンパ節、さらに腸管免疫組織などの全身の免疫組織との比率の対比なども行う。

○腸内フローラの変化は T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)解析という、マウスの糞便中の細菌 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網羅的に同定する方法にて、治療介入物質投与の前後で解析する。そして、上記のマウスへの治療介入により、腸内細菌叢の属種がどのように変化するのかを調査する。

○腸管免疫修飾については、フローサイトメトリー(FACS)による腸間膜リンパ節、パイエル板や脾臓での CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞(Treg)の比率、CD11c⁺CD103⁺または免疫寛容性樹状細胞 CD11c⁺CD80⁺CD86⁺(tDC)細胞の比率の測定を行う。

○抗 CD11c 抗体でソーティングした DC を用いて、細胞の機能解析実験を行う。同時に CD11c 陽性細胞から mRNA を抽出し、real time RT-PCR 法にて IL-12 や IL-10 などの遺伝子発現の解析を行う。

○T 細胞(ヘルパー T 細胞, CD8⁺T 細胞, NKT 細胞など)の関与やその細胞からのサイトカイ

ン・ケモカイン産生の変化を FACS(細胞内サイトカイン染色)にて行う。

○6 週齢の apoE-KO マウスにプロバイオティクス(Lactobacillus or Bifidobacterium)の投与を開始して、10 週間継続する。16 週齢で大動脈起始部と大動脈全体の動脈硬化巣面積を評価し、コントロール群と比較して動脈硬化抑制作用の有無を評価する。腸内フローラの変化・腸管免疫修飾の評価も、前記と同様の方法で行う。

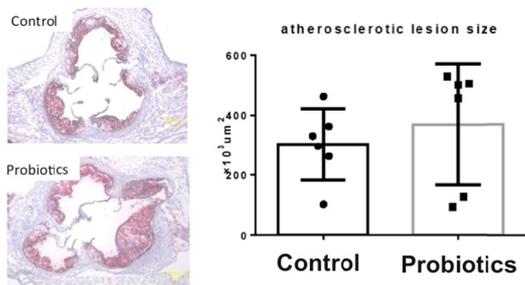
臨床応用への取り組み

○倫理委員会にて承認を受けて、動脈硬化性疾患患者の糞便サンプルを用いて、T-RFLP 法にて腸内細菌の調査を行う。近年、ヒトの腸内細菌叢の分類に関する新しい報告(Nature. 2011;473:174-180.)もあり、いくつかのタイプ別分類が可能となってきた。動脈硬化がどのようなタイプで起き易いのか、起き難いのかの検討を行う。

4. 研究成果

種々の腸管免疫修飾候補物質・腸内細菌叢を変化させる物質など(薬剤、食品含有物質、プロバイオティクス、抗生物質など)を動脈硬化モデル apoE-KO マウスに 10 週間経口投与し、動脈硬化巣の面積を評価し、投与物質の動脈硬化抑制効果を判定した。腸管で免疫寛容性樹状細胞(tDC)や制御性 T 細胞(Treg)などの免疫抑制系細胞の誘導が報告されているレチノイン酸、クルクミン(ウコン成分)、コーヒー含有物質の投与では、apoE-KO マウスに予想できる細胞は誘導されず、抗動脈硬化作用も認められなかった。

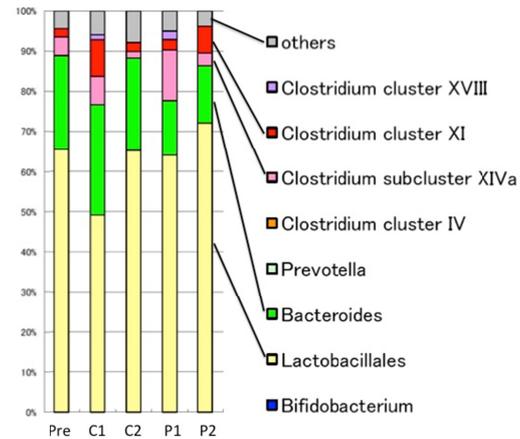
プロバイオティクス(乳酸菌)を apoE-KO マウスに 10 週間経口投与し、動脈硬化巣の面積を評価した。これまでに免疫への影響が報告された十数種類の菌を、餌含有もしくは強制経口投与によってマウスに与えた。代表的なデータを示すが、乳酸菌 P 投与によっては、動脈硬化巣の面積には有意な影響を与えなかった(Control $3.03 \pm 0.49 \times 10^6 \mu\text{m}^2$, P $3.69 \pm 0.82 \times 10^6 \mu\text{m}^2$; 下図)。



フローサイトメトリーによって、脾臓、腸間膜リンパ節の Foxp3 陽性の Treg、CD11c 陽性細胞の中の CD80 と CD86 陰性の tDC の存在比率について検討したが、乳酸菌 P 投与によって、これらの細胞比率に優位に影響を与えなかった。

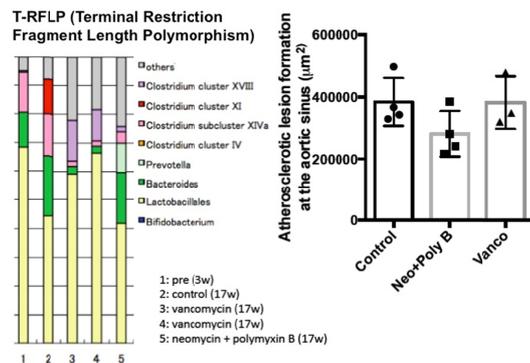
プロバイオティクス(乳酸菌 P)投与の腸内

細菌叢への影響を調査するために、T-RFLP 法にて、糞便中に含まれる菌を評価した(下図)。この結果では、含有菌のおおまかな門~目レベルの分類がわかるが、乳酸菌 P 投与によっては、少し Bacteroidetes 門の菌が減少する経口があるが、有意な変化は起こさなかった。



本研究期に実験を行ったすべてのプロバイオティクスに関して、一部マウスで免疫機能に影響を及ぼすものはあるが、少なくとも動脈硬化抑制作用を示すものはなかった。

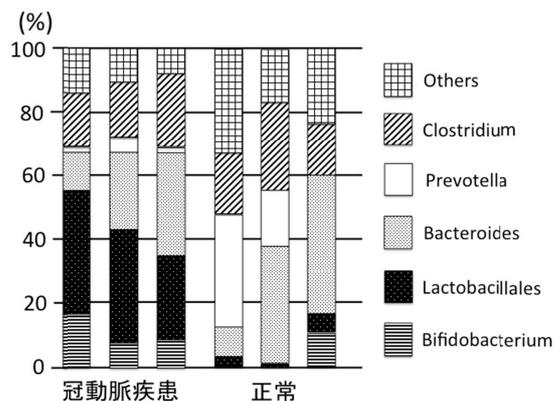
抗生物質投与による腸内細菌への介入と、動脈硬化への影響を検討した結果を示す。Vancomycin または Neomycin+Polymyxin B によって、糞便中の腸内細菌数は、約 50%に減少した。存在する菌への影響としては、グラム陽性菌に抗菌効果のある Vancomycin では、腸内細菌の中で比較的優位な Bacteroides 属が減少し、相対的に Firmicutes(Clostridium や Lactobacillales を含む)が増加した(下図の左)。一方、グラム陰性菌に抗菌効果の



ある Neomycin+Polymyxin B の投与では、Prevotella が増加して、Clostridium が減少した。両者の抗生物質投与で予想できる反応とは反対の反応が起こっているという印象を持ち、腸内常在菌への影響は、病原菌に抗菌薬治療を行うイメージでは予想できない可能性を示唆する結果であった。動脈硬化形成の抑制作用についての検討では、Vancomycin には動脈硬化抑制作用は認められず、Neomycin+Polymyxin B の投与では有意に抑制することが示された(上図の右)。

倫理委員会にて承認を受けて、冠動脈疾患患者と正常人の腸内細菌の差異についての調査(臨床研究)を行った。腸内細菌の評価は、マウスでも使用した T-RFLP 法を用いて行い、おおまかな菌群の変化について解析した。

正常者に比較して、冠動脈疾患患者の糞便に含まれる腸内細菌では、ラクトバシルス



(*Lactobacillus*) 菌群 [黒い棒グラフの部分] が増加し、バクテロイデテス (*Bacteroidetes*) 菌群 [*Bacteroides* 属; 灰色棒グラフの部分 + *Prevotella* 属; 白色棒グラフの部分] が減少しているという結果が得られた(上図)。

この成果は、冠動脈疾患患者に特徴的な菌の増減に言及した初めての報告であり、さらに詳細な腸内細菌の属種に迫る研究に進め、治療への応用を目指していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

1 Yodoi K, Yamashita T, Sasaki N, Kasahara K, Emoto T, Matsumoto T, Kita T, Sasaki Y, Mizoguchi T, Sparwasser T, Hirata K. Foxp3+ Regulatory T Cells Play a Protective Role in Angiotensin II-Induced Aortic Aneurysm Formation in Mice. *Hypertension*. 2015; 65: 889-95.

2 Sasaki N, Yamashita T, Kasahara K, Takeda M, Hirata K. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells as critical immune modulators in atherogenesis. *Curr Pharm Des*. 2015;21(9):1107-17.

3 Emoto T, Sasaki N, Yamashita T, Kasahara K, Yodoi K, Sasaki Y, Matsumoto T, Mizoguchi T, Hirata K. Regulatory/effector T-cell ratio is reduced in coronary artery disease. *Circ J*. 2014; 78: 2935-41.

4 江本拓央・山下智也・平田健一、短鎖脂肪酸と生活習慣病、内分泌・糖尿病・代謝内科、査読なし、39、3014、415-421.

5 山下智也、腸内細菌と動脈硬化、*Therapeutic Research*、査読なし、35、2014、789-791.

6 山下智也・笠原和之・佐々木直人・平田健一、腸から動脈硬化は予防できるのか、医学のあゆみ、査読なし、251、2014、100-106.

7 笠原和之・山下智也・佐々木直人・平田健一、腸内細菌と動脈硬化、*生物の科学*、査読なし、68、2014、358-362.

8 山下智也・平田健一、腸内細菌と動脈硬化腸から動脈硬化は予防できるのか?、*肥満研究*、査読なし、20、2014、7-12.

9 山下智也・平田健一、腸血管連関とその臨床的意義、*細胞工学*、査読なし、33、2014、529-534.

10 笠原和之・山下智也・佐々木直人・平田健一、プラーク形成・破裂と制御性T細胞、*The Lipid*、査読なし、25、2014、122-128.

11 笠原和之・山下智也・佐々木直人・平田健一、腸内フローラへの介入と腸管免疫修飾による動脈硬化予防、*腸内細菌学雑誌*、査読なし、28、2014、1-5.

12 Kasahara K, Sasaki N, Yamashita T, Kita T, Yodoi K, Sasaki Y, Takeda M, Hirata K. CD3 Antibody and IL-2 Complex Combination Therapy Inhibits Atherosclerosis by Augmenting a Regulatory Immune Response. *J Am Heart Assoc*. 2014; 3: e000719.

13 Kita T, Yamashita T, Sasaki N, Kasahara K, Sasaki Y, Yodoi K, Takeda M, Nakajima K, Hirata K. Regression of Atherosclerosis with Anti-CD3 Antibody via Augmenting a Regulatory T Cell Response in Mice. *Cardiovasc Res*. 2014; 102: 107-17.

14 山下智也・平田健一、腸内細菌と動脈硬化腸管免疫修飾による動脈硬化予防、*医学のあゆみ*、査読なし、245、2013、189-190.

15 山下智也・佐々木直人・平田健一、腸管心血管病予防の新たな治療ターゲットになる、*循環器専門医*、査読なし、21、2013、291-296.

16 Takeda M, Yamashita T, Sasaki N, Hirata-K. Dendritic cells in atherogenesis: Possible novel targets for prevention of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2012; 19: 953-961.

17 Sasaki N, Yamashita T, Takeda M, Hirata K. Regulatory T cells in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb*. 2012; 19: 503-515.

[学会発表](計 19 件)

1 山下智也・平田健一、腸内細菌叢への介

入と腸管免疫修飾による動脈硬化予防、日本肥満学会、2014.10.25、宮崎シーガイア（宮崎県）

2 山下智也・佐々木直人・平田健一、腸内細菌と動脈硬化、日本動脈硬化学会、2014.7.11、京王プラザホテル（東京都）

3 山下智也・平田健一、腸内フローラへの介入と腸管免疫修飾による動脈硬化予防、日本循環制御医学会（招待講演）、2014.6.12、九州大学医学部（福岡）

4 山下智也・平田健一、腸から動脈硬化を予防する、日本老年医学会学術集会（招待講演）、2014.6.13、福岡国際会議場（福岡）

5 Emoto T, Sasaki N, Yamashita T, et al., Regulatory T cells and CD4+CD28null T cells in coronary artery disease., 日本動脈硬化学会総会、2014.7.10、京王プラザホテル（東京）

6 Yamashita T, Sasaki N, Hirata K., Novel therapeutic strategies for preventing Atherosclerosis via modulating intestine immunity and intervention to gut microbeta., 腸内細菌学会（招待講演）、2013.6.14、北里大学（東京）

7 山下智也、腸管免疫修飾による動脈硬化予防法の開発研究、日本抗加齢医学会総会（招待講演）、2013.6.28、パシフィコ横浜（神奈川）

8 Yamashita T, Hirata-K., Gut bacteria and their flora type as newly proposed risk factors in cardiovascular and metabolic diseases., Annual Meeting of Korean Society of Obesity(招待講演)、2013.10.5、ソウル（韓国）

9 Sasaki N, Yamashita T, et al., Activation of skin dendritic cells controls atherogenesis in mice., Scientific Session of American Heart Association, 2013.11.19、ダラス（米国）

10 Yodoi K, Sasaki N, Yamashita T, et al., In vivo expansion of regulatory T cells attenuates aortic aneurysm formation in angiotensin II-infused apolipoprotein E-deficient mice., Scientific Session of American Heart Association, 2013.11.20、ダラス（米国）

11 Kasahara K, Sasaki N, Yamashita T, et al., A novel combination therapy with anti-CD3 antibody and IL-2 complexes against atherosclerosis targeting effector T cells and regulatory T cells., Scientific Session of American Heart Association, 2013.11.20、ダラス（米国）

12 山下智也、腸と皮膚からの免疫調節による新規動脈硬化予防法の開発研究、日本食品免疫学会シンポジウム（招待講演）、2012.6.21、東京大学（東京都）

13 山下智也・佐々木直人・平田健一、腸管免疫修飾による新規動脈硬化予防法の開発、日本動脈硬化学会、2012.7.21、シーホーク

ホテル福岡（福岡県）

14 Sasaki N, Yamashita T, et al., Activation of regulatory T cells by ultraviolet irradiation controls atherogenesis in mice., Scientific Session of American Heart Association, 2012.11.12、ロサンゼルス（米国）

16 山下智也・佐々木直人・平田健一、Intestine and skin could be novel therapeutic targets for preventing cardiovascular diseases., 日本循環器学会学術集会、2013.3.16、パシフィコ横浜（神奈川県）

17 Kasahara K, Yamashita T, et al., A novel combination therapy with anti-CD3 antibody and IL-2 complexes against atherosclerosis targeting effector T cells and regulatory T cells., 日本循環器学会学術集会、2013.3.16、パシフィコ横浜（神奈川県）

18 Kasahara K, Yamashita T, et al., A novel mouse model to deplete regulatory T cells uncovers their role in atherogenesis under hypercholesterolemia., 日本循環器学会学術集会、2013.3.17、パシフィコ横浜（神奈川県）

19 Yodoi K, Sasaki N, Yamashita T, et al., In vivo expansion of regulatory T cells attenuates aortic aneurysm formation in angiotensin II-infused apolipoprotein E-deficient mice. 日本循環器学会学術集会、2013.3.17、パシフィコ横浜（神奈川県）

〔図書〕(計1件)

山下智也, 平田謙一. 中外医学社 Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌, 229 (211-216).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/im1/doctor/activity/basic/acti-02.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 智也 (YAMASHITA, Tomoya)
神戸大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：90437468

(2) 研究分担者

佐々木 直人 (SASAKI, Naoto)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00514746

(3) 連携研究者

()

研究者番号：