

令和元年5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09433

研究課題名(和文)メタゲノム解析を用いた心不全における腸内細菌叢の評価

研究課題名(英文)Evaluation of the intestinal microbiota of patients with heart failure using metagenomic sequencing

研究代表者

塚本 泰正 (Tsukamoto, Yasumasa)

大阪大学・医学部附属病院・特任助教(常勤)

研究者番号：80747072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：非虚血性心不全患者および対照被験者の糞便検体を採取し、メタゲノム解析を行って得られた塩基配列から腸内細菌を分類して腸内細菌叢の組成を評価した。心不全患者群、健常者対照群の両群においてFirmicutes門とBacteroidetes門が大多数を占め、属ではBacteroides属が最多であった。心不全患者群ではStreptococcus属、Veillonella属が健常対照群に比して有意に多く、対してSMB53属は減少していた。腸内細菌叢の種の多様性を検討したところ、個体間での種の多様性を示す多様性について両群間で差異がみられた。腸内細菌の代謝経路についても両群間で多様性に差異を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、非虚血性心不全患者では健常者と比して腸内細菌叢に差異を生じていたことが明らかになった。今後これらの結果から、腸内細菌叢や栄養状態の変化と心不全の病態との関連についての知見がさらに深まっていくとともに、将来的にプロバイオティクスや抗菌薬治療による腸内細菌叢への介入が心不全治療の新たな標的として発展していくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Non-ischemic heart failure (HF) patients and healthy controls were assessed by 16S rRNA analysis of bacterial DNA extracted from stool samples. After processing of sequencing data, bacteria were taxonomically classified, diversity indices were used to examine microbial ecology, and relative abundances of genera were compared between groups. Furthermore, we predicted gene carriage for bacterial metabolic pathways. The most abundant genus in both groups was Bacteroides. diversity metrics revealed a separation of the groups across components of variation. Streptococcus and Veillonella were enriched in the common core microbiota of patients, while SMB53 was depleted. Metabolic pathways variation showed differences between groups. In conclusion, non-ischemic HF patients exhibited multidimensional differences in intestinal microbial communities compared with healthy subjects.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 腸内細菌叢 メタゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)高齢者に高い罹患率を示し、予後不良である心不全については医学的重要性に加え、医療負担や医療経済も含めた社会的な重要性も年々増大している。近年の薬物療法・非薬物療法の進歩により予後改善の傾向はみられているものの十分とはいえず、発症の病態解明や新規治療法の開発は重要である。心不全の発症に腎臓や血管などの心臓外要素や炎症などが関与していることは研究代表者らの報告を含め数多くの研究で示唆されており、その病態解明は新たな治療標的の開発に大きく寄与するものと考えられる。

(2)腸内細菌は栄養吸収や免疫形成において重要な役割を果たしていることが知られている。近年様々な疾病と腸内細菌叢の組成および機能変化との関連が注目されているが、心不全患者においても、腸管の循環障害およびそれに伴う細菌叢の変化が病態と関連することが示唆されている。従来、腸内細菌の中には培養困難である種も多く、細菌叢の組成を詳細に検出することは困難と考えられてきたが、近年、糞便中のメタゲノム解析とよばれる手法を用いることで細菌を培養することなく DNA 解析から検出することが可能となった。

2. 研究の目的

過去に心疾患と腸内細菌との関連を示唆する報告はあるものの、培養困難な細菌を含む細菌叢の組成を正確に評価し病態との関連について検討した報告はこれまでにない。そこで、本研究においては心不全患者の糞便中のメタゲノム解析を行うことでその病態と腸内細菌叢との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)対象

2015年10月から2017年4月の期間に大阪大学医学部附属病院に心不全の精査加療目的にて入院した272症例のうち、18歳以上70歳未満の左室収縮機能の低下した(左室駆出率<50%)、かつその原因が虚血性心疾患でない28症例を心不全患者群の対象とした。心不全を呈していない入院患者(非心不全対照群;18症例)および健常者ボランティア(19人)を対照群とした。全被験者に対して研究に関するインフォームドコンセントを行い、同意を得た。

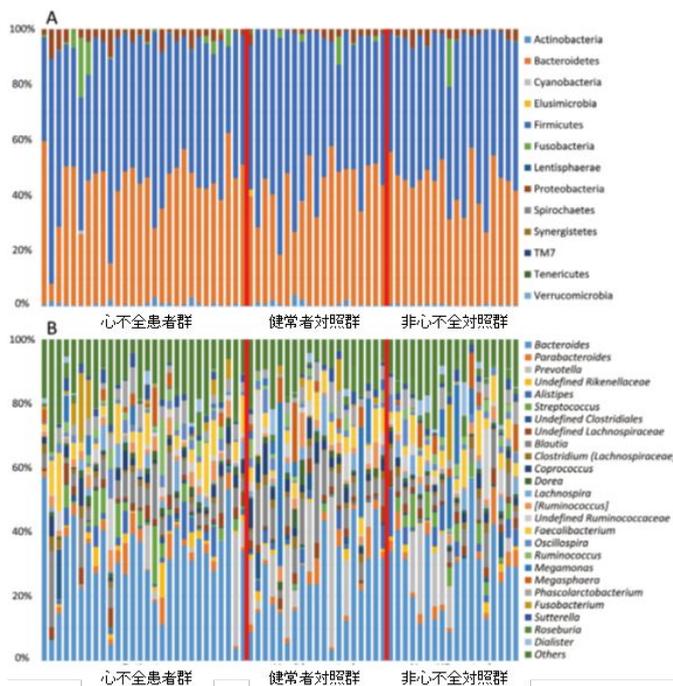
(2)糞便採取および腸内細菌の評価

対象となる被験者より雑菌の混入のないように糞便を採取し、即座に液体窒素で凍結し保存した。採取した糞便検体よりDNAを抽出し、16S rRNAメタゲノム解析を行った。得られた塩基配列のデータから細菌の分類学に基づき腸内細菌を分類・評価した。また、PICRUSt(phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states)に基づいて細菌の代謝経路を評価した。

得られた腸内細菌叢の組成について、心不全患者群と対照群で比較検討を行った。

4. 研究成果

(1)心不全患者群・対照群における腸内細菌叢組成



我々は心不全患者群、健常者対照群および非心不全対照群の糞便より13門、21綱、27目、56科、134属の腸内細菌を検出した。心不全患者群、健常者対照群の両群においてFirmicutes門(図1Aグラフ青色部)とBacteroidetes門(図1A橙色が腸内細菌叢の大多数を占め、Proteobacteria(図1A茶色)がこれに続いていた。属レベルでは、心不全患者群(30.5%)、健常者対照群(24.2%)の両群でBacteroides属(図1B水色)が最多を占めていた。これらの結果は過去に米国から報告された健常人腸内細菌叢の組成と同様であった。

図1. 心不全患者・対照者における腸内細菌叢組成

(A)門レベルで分類した腸内細菌組成

(B)属レベルで分類した腸内細菌組成(各個体の上位20属)

(2)心不全患者群と健常者対照群の腸内細菌の比較

心不全患者群から検出された腸内細菌は119属であり、そのうち31の属は心不全患者のみで検出された。一方で健常者群からは103属が検出され、うち15属は健常者群のみから検出された(図2左、表1)。それぞれの群の50%以上の被験者に共通する属に限定すると40属が検出され、うち34属が両群に共通してみられた(図2右)。このうち *Streptococcus* 属と *Veillonella* 属は心不全患者群腸内細菌叢に有意に多く認め、対して *SMB53* 属は減少していた(図3)。

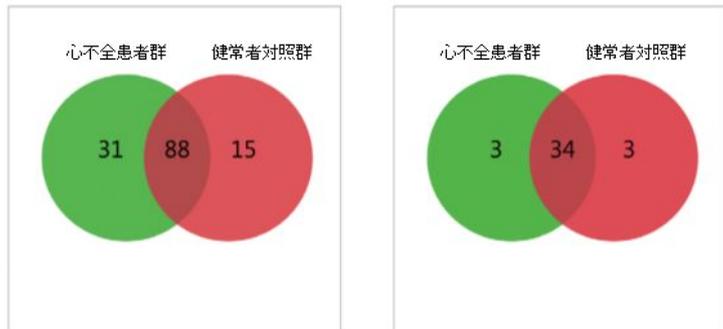


図2. 心不全患者・健常者における腸内細菌叢組成の比較

(左)検出された全ての腸内細菌の属

(右)主要な(それぞれの群の50%以上の被験者に共通する)属

表1. 心不全群のみ、もしくは健常者群のみで認めた腸内細菌

心不全患者のみで検出された属	健常者のみで検出された属
<i>Akkermansia</i>	<i>Allobaculum</i>
<i>Alloscardovia</i>	<i>Brachyspira</i>
<i>Burkholderiales</i> ; other; other	<i>CF231</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i> ; other
<i>Christensenella</i>	<i>Paraeggerthella</i>
<i>Cloacibacillus</i>	<i>Peptococcus</i>
<i>Clostridiaceae</i> ; other	<i>Porphyromonadaceae</i> ; other
<i>Clostridium</i> (Family Ruminococcaceae)	Undefined genus in <i>Elusimicrobiaceae</i>
<i>Cronobacter</i>	Undefined genus in <i>ML615J-28</i>
<i>Enterococcus</i>	Undefined genus in <i>Prevotellaceae</i>
<i>Finegoldia</i>	Undefined genus in <i>Synergistaceae</i>
<i>Fusobacteriaceae</i> ; other	Undefined genus in <i>Victivallaceae</i>
<i>Fusobacteriales</i> ; other; other	Undefined genus in [<i>Paraprevotellaceae</i>]
<i>Granulicatella</i>	<i>WAL_1855D</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>rc4-4</i>
<i>Peptoniphilus</i>	
<i>Peptostreptococcaceae</i> ; other	
<i>Pyramidobacter</i>	
<i>Rikenellaceae</i> ; other	
<i>Staphylococcus</i>	
<i>Synergistes</i>	
[<i>Tissierellaceae</i>]; g_1-68	
[<i>Tissierellaceae</i>]; g_ph2	
Undefined genus in <i>Enterobacteriaceae</i>	
Undefined genus in <i>Gemellaceae</i>	
Undefined genus in <i>Streptococcaceae</i>	
Undefined genus in <i>Streptophyta</i>	
Undefined genus in <i>Veillonellaceae</i>	
<i>Varibaculum</i>	
<i>Veillonellaceae</i> ; other	
<i>Weissella</i>	

腸内細菌叢の種の多様性について検討したところ、個体内での多様性を表す多様性は心不全患者群と健常者対照群で差を認めなかったが、個体間での種の多様性を表す多様性については両群間で異なっていた(図4)。

腸内細菌の代謝経路について検討したところ、心不全患者群と健常者対照群の間に腸内細菌叢の代謝経路の多様性に差異を認めた(図5)。

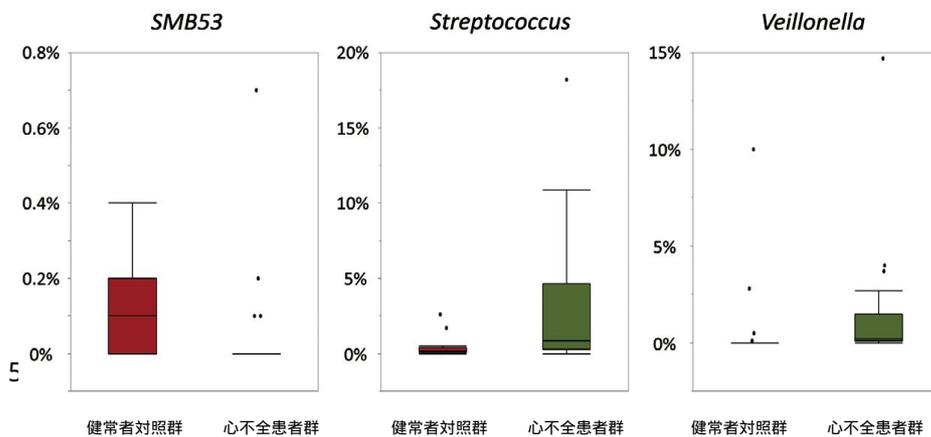


図 3.心不全患者群・健常対照者群間で分布が大きく異なっていた腸内細菌属

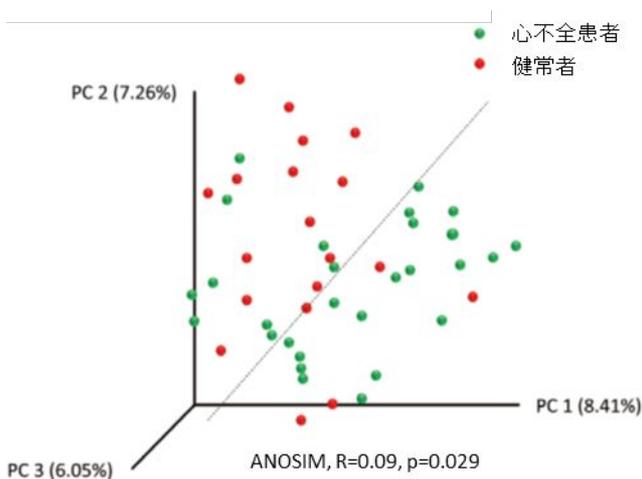


図 4. 心不全患者、健常者での腸内細菌 多様性

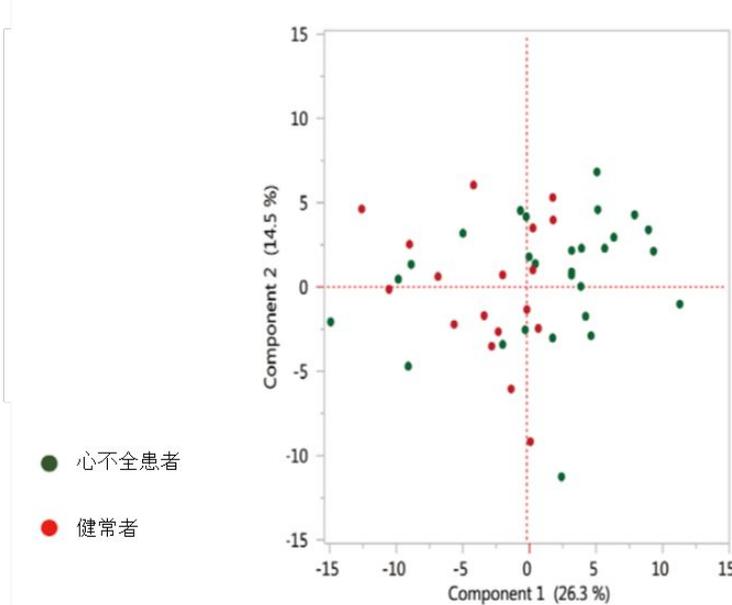


図 5. 心不全患者、健常者における腸内細菌叢代謝経路の多様性

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Katsimichas T, Ohtani T, Motooka D, Tsukamoto Y, Kioka H, Nakamoto K, Konishi S, Chimura M, Sengoku K, Miyawaki H, Sakaguchi T, Okumura R, Theofilis K, Iida T, Takeda K, Nakamura S, Sakata Y Non-Ischemic Heart Failure With Reduced Ejection Fraction Is Associated With Altered Intestinal Microbiota. *Circ J.* 2018 May 25;82(6):1640-1650. 査読あり

Chimura M, Ohtani T, Tsukamoto Y, Kioka H, Katsimichas T, Onishi T, Nakamoto K, Konishi S, Sengoku K, Miyawaki H, Hikoso S, Yamaguchi O, Sakata Y. Ratio of pulmonary artery diameter to ascending aortic diameter and severity of heart failure. J Heart Lung Transplant. 2018 Nov;37(11):1341-1350. 査読あり

Taniguchi T, Ohtani T, Kioka H, Tsukamoto Y, Onishi T, Nakamoto K, Katsimichas T, Sengoku K, Chimura M, Hashimoto H, Yamaguchi O, Sawa Y, Sakata Y. Liver Stiffness Reflecting Right-Sided Filling Pressure Can Predict Adverse Outcomes in Patients With Heart Failure. JACC Cardiovasc Imaging. 2018 Jan 12. pii: S1936-878X(17)31139-7. 査読あり

Saito Y, Ohtani T, Kioka H, Onishi T, Tsukamoto Y, Nakamoto K, Taniguchi T, Nakatani S, Hirayama A, Sakata Y. Clinical Significance of Pulmonary Arterial Capacitance Calculated by Echocardiography in Patients With Advanced Heart Failure. Circ J. 2017 Nov 24;81(12):1871-1878. 査読あり

〔学会発表〕(計 4件)

Katsimichas T, Ohtani T, Tsukamoto Y, Kioka H, Sakaguchi T, Nakamoto K, Konishi S, Chimura M, Sengoku K, Miyawaki H, Sakata Y. Heart failure is associated with an altered intestinal microbiome The 82nd annual scientific meeting of the Japanese Circulation Society, 大阪 2018年3月23日

大谷 朋仁 心不全における心腸肝連関、第66回日本心臓病学会学術集会総会、大阪 2018年9月8日

塚本泰正、大谷朋仁、他 当院ACHD症例における肝硬度と中心静脈圧の検討 第19回日本成人先天性心疾患学会総会・学術集会 三重 2017年1月14日

塚本 泰正、大谷 朋仁、他 Usefulness of Liver Stiffness Measurements for Evaluation of Central Venous Pressure in Adult Congenital Heart Disease 第82回日本循環器学会学術集会 大阪 2018年3月24日

〔図書〕(計 1件)

平田健一, 山下智也, 大谷朋仁、阿部高明、腸内細菌やその生体機能に介入する循環器疾患治療、CARDIAC PRACTICE 2019 29 4 303-309

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学

<http://www.cardiology.med.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大谷 朋仁

ローマ字氏名：Tomohito Ohtani

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：講師

研究者番号(8桁)：30623897

(2)研究協力者

研究協力者氏名：テミス カチミハス、中本 敬、中村 憲史、谷口 達典、飯田 哲也、中村 昇太

ローマ字氏名：Themistoklis Katsimichas, Kei Nakamoto, Kenji Nakamura, Tatsunori Taniguchi, Tetsuya Iida, Shota Nakamura

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。