

令和 3 年 10 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08285

研究課題名(和文) 抗生物質による腸内細菌変化を介した脂質酸化依存的心不全突然死の新規抑制機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel mechanism of prevention of lipid peroxidation dependent cardio sudden death by antibiotic induced changes of intestinal bacteria

研究代表者

今井 浩孝 (Imai, Hirotaka)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：50255361

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)：心臓特異的GPx4欠損マウスはビタミンE添加食では生存できるが、餌のビタミンE量を低下すると、心筋細胞に脂質酸化依存的な細胞死が誘導され心突然死を引き起こす。我々は、この脂質酸化依存的な心突然死を抑制する化合物として抗生物質セフォペラゾン(CPZ)を見出した。抗生物質CPZは直接脂質酸化を抑制しないことから、その抑制メカニズムを解析した。抗生物質CPZは飲水投与では効果を示すが、腹腔投与では効果を示さない。また抗生物質CPZは無菌マウスでは効果を示さなかった。次世代シーケンサーおよび菌移植実験から抗生物質CPZにより耐性を示した腸内細菌が心不全突然死を抑制していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、脂質酸化依存性における心不全を抑制できるCPZ耐性腸内細菌が存在することを初めて明らかにした。また抗生物質CPZにより生き残った腸内細菌が機能を発揮したことから抗生物質の新たな可能性を示したともいえる。本研究成果は腸内細菌が心臓機能を正に制御できること、新しい腸心連関が存在することを示したことになり学術的意義は極めて大きい。将来的に心臓機能を増強できるプロバイオティクスやプレバイオティクスの開発や心臓突然死の予防薬の開発に繋がる研究成果である。

研究成果の概要(英文)：The heart-specific GPx4 knockout mouse can survive by the vitamin E supplementation diet, but lipid peroxidation-dependent novel cell death is induced in cardiomyocytes by decrease of vitamin E in heart after change to low vitamin E containing diet, resulting in cardio sudden death. We found antibiotic cefoperazone(CPZ) as the non-antioxidant compound which can suppress this lipid peroxidation-dependent heart failure by drinking, but not intraperitoneal injection. Administration of antibiotic CPZ could not rescue lipid peroxidation dependent cardio sudden death in germ free mice. Next generation sequencer and bacteria transplantation experiment revealed that antibiotic CPZ resistant intestinal bacteria could suppress lipid peroxidation dependent cardio sudden death in heart-specific GPx4 knockout mouse.

研究分野：脂質生化学、衛生薬学、栄養学

キーワード：抗生物質 腸内細菌 心不全 脂質酸化依存的新規細胞死 ビタミンE 無菌マウス ノトバイオート

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心臓突然死(心不全)は発症から24時間以内に致死となる疾患で、血管系の動脈硬化が原因以外では、心筋細胞死が主要因となる特発性心筋症が報告されているが、その原因は明らかになっておらず、動物モデルもなかったことから治療薬の開発も進んでいない。

リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx4)は生体膜に生じたリン脂質ヒドロペルオキシドをグルタチオン依存的に還元する酵素であり、GPx4の欠損は様々な細胞に脂質酸化依存的な細胞死を誘導することを見出している。心臓特異的GPx4欠損マウスは、発生過程の17.5日に心筋細胞に脂質酸化がおこり、心筋細胞死を伴い致死となる。しかし、母親にビタミンE添加食を与えると、この脂質酸化依存的な心不全が抑制され、正常に生育できる。一方、ビタミンE添加食でレスキューできた心臓特異的GPx4欠損マウスは、通常食にもどすと約15日で、心臓に脂質酸化がおこり心臓突然死を引き起こす(図1)。このように我々は餌のビタミンE量により心不全を制御できる世界ではじめての心臓突然死モデルを作成することに成功した。我々はこの心臓でのビタミンE低下による脂質酸化依存的な心不全モデルを用いて、心臓突然死を予防できる食材や医薬品のスクリーニングをおこなってきた。その結果、偶然にも抗生物質セフォペラゾン(CPZ)の飲水投与により致死が50日以上も抑制できること、腹腔投与では抑制できないことを見出した。さらに興味深いことに、抗生物質CPZはタモキシフェン誘導型GPx4欠損MEF細胞における、タモキシフェン添加による脂質酸化を介したGPx4欠損細胞死を全く抑制できなかった。このことは、抗生物質CPZが直接脂質酸化を抑制することができないことを示しており、抗生物質CPZは心臓特異的GPx4欠損マウスのビタミンE低下による脂質酸化依存的な心筋細胞死を直接抑制しているのではなく、別のメカニズムの関与、特に飲水投与では効果を示すが、腹腔投与では効果がなかったことから、腸内細菌の関与が示唆された。

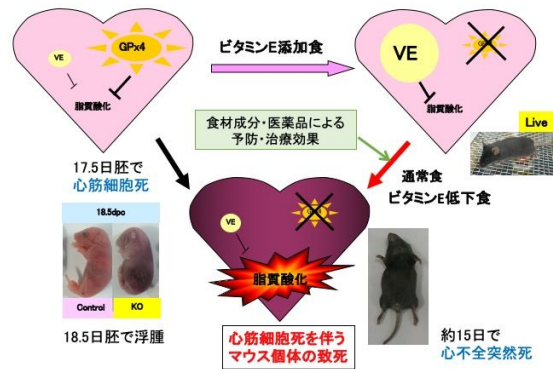


図1 心臓での脂質酸化の亢進は心筋細胞死を伴う突然死を引き起こす

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗生物質CPZの飲水投与がどのようなメカニズムで、ビタミンE低下による心臓特異的GPx4欠損マウスの脂質酸化依存的な心臓突然死を抑制しているのかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

心臓特異的GPx4欠損マウスは、ミオシンクレアチニンキナーゼをプロモーターにもつCreリコンビナーゼをホモに持つGPx4ヘテロCreヘテロマウス(Cre+/+:GPx4+/-)とGPx4ノックアウトマウスの致死をLoxP-GPx4-TG遺伝子でレスキューしたマウス、TG KOマウス(LoxP-GPx4-TG+/+:GPx4-/-)を交配して作成した。この組み合わせでは、心臓特異的GPx4欠損マウス(Cre+/-:LoxP-GPx4-TG+/-:GPx4-/-)と内在性のGPx4ゲノム遺伝子を1本持つコントロールマウス(Cre+/-:LoxP-GPx4-TG+/-:GPx4-/-)が生まれる。母親にはビタミンE添加食を与えて、心臓特異的GPx4欠損マウスを産ませた。離乳時期の3~4週齢で通常食、あるいはビタミンE低下食にかえて、生存日数を調べた。心臓特異的GPx4欠損マウスは約15日ぐらいで心臓突然死を起こす。心臓特異的GPx4ヘテロマウスは致死とはならない。抗生物質は通常は飲水投与でおこなった。腹腔に投与した場合もある。腸内細菌の関与を明らかにするために、心臓特異的GPx4欠損マウスの無菌マウスを作成した。また擬似無菌マウスとして、離乳時期の3週齢から2週間、4種類の抗生物質を飲水投与をおこない、腸内細菌を殺し擬似無菌マウスを作成した。擬似無菌状態になった後、ビタミンE添加食からビタミンE低下食にかえて、その際抗生物質CPZの致死抑制効果があるかどうかを飲水投与により検討した。さらに、抗生物質投与後の糞を回収し、ゲノムを単離し、次世代シーケンサーにより腸内細菌叢の変化を解析した。また同定した腸内細菌をプレート法を用いて単離し、プレート法およびPCR法により腸内細菌の定量もおこなった。また単離した腸内細菌をゾンデで擬似無菌マウスにしたあと、毎週ゾンデにより直接経口投与し、腸内細菌の移植を行い、ビタミンE低下による致死の延長効果がみられるのかについて解析した。他の菌が腸内に定着しないように、抗生物質CPZも同時に飲水投与も行なった。抗生物質CPZに耐性を示す腸内細菌は、抗生物質CPZ飲水投与条件下でも腸内で定着できることを確認した。

4. 研究成果

- (1) 抗生物質によるビタミンE低下による心臓特異的GPx4欠損マウスの致死の抑制効果
まずどのような抗生物質が心臓特異的GPx4欠損マウスにおけるビタミンE低下による心

不全を抑制できるのかを解析した。抗生物質 CPZ は約 50 日以上致死を抑制できることをまず見出した。グラム陽性腸内細菌に特異的に作用する抗生物質バンコマイシンも致死の延長効果があること、グラム陰性腸内細菌に特異的に作用する抗生物質ポリミキシン-B は致死の延長効果が全くないことが明らかとなった。また抗生物質 CPZ は濃度依存性があることも明らかとなった。

一方、興味深いことに抗生物質 CPZ は飲水投与する場合は、50 日以上致死の延長効果がみられたが、腹腔投与では全く効果を示さなかった（図 2）。抗生物質 A は腸内での吸収が極めて悪いことが知られていることから、抗生物質 CPZ の効果は腸内細菌叢の変化に関与していることが明らかとなった。

また抗生物質 CPZ は、脂質酸化を抑制できる抗酸化活性は報告されていない。実際にタモキシフェン誘導型 GPx 4 欠損 MEF 細胞では、抗酸化活性をもつビタミン E やフェロスタチン-1 (Fer-1) はタモキシフェン添加による脂質酸化依存的細胞死を抑制できるが、抗生物質 CPZ の添加では全く細胞死の抑制はできなかった。このことから、GPx 4 欠損による細胞死は直接脂質酸化を抑制して心不全を抑制しているのではないと考えられた。しかし、ビタミン E 低下による心不全モデルマウスにおいて抗生物質 CPZ の飲水投与は、心臓に蓄積するリン脂質ヒドロ

ペルオキシド (PCOOH) の生成が顕著に抑制されていることが明らかとなった。このことから抗生物質 CPZ は、直接脂質酸化を抑制するのではなく、腸内細菌叢の変化を介して、なんらかのメカニズムで間接的に心臓に生成する脂質酸化を抑制して致死を抑制しているものと考えられた。

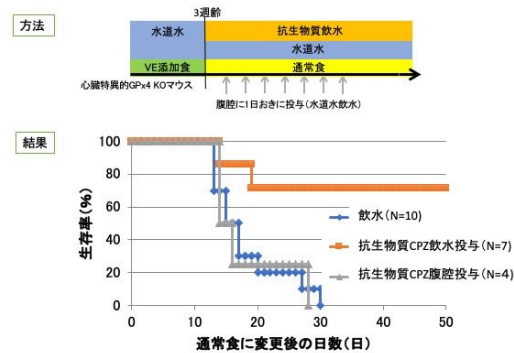


図2 抗生物質CPZの飲水および腹腔内投与による心突然死の抑制効果

(2) 抗生物質 CPZ による脂質酸化依存的な心不全抑制メカニズムにおける腸内細菌の関与

通常、抗生物質は細菌の増殖を抑制することにより、細菌の毒性による病態を抑制するのが一般的である。脂質酸化依存的な心不全による突然死モデルにおいて、悪い菌が腸内にいて、その悪玉菌を殺すから心不全を抑制するのか、または抗生物質投与により死んだ菌ではなく、生き残った腸内細菌に心臓の脂質酸化依存的な細胞死を抑制できる機能をもつ腸内細菌が存在するのかを明らかにするために、腸内細菌をうまくつき持たない心臓特異的 GPx 4 欠損マウスの無菌マウスを作成し、このマウスがえさのビタミン E 量を低下した時に、心不全による致死が誘導されるのかを解析した。もし心不全を引き起こす悪い腸内細菌がいるのであれば、無菌マウスはビタミン E がさがっても致死はおきなくなるはずであるが、致死は確かに誘導された。一方、無菌マウスではビタミン E 低下における心突然死を抗生物質 CPZ 飲水投与では全く抑制できなかった。同様に 3 週齢になった心臓特異的 GPx 4 欠損マウスに 4 種類の抗生物質を 2 週間飲水投与をおこない、擬似的な無菌マウスを作成し、この処理を行ったあとでも、ビタミン E 低下をさせると心不全突然死が誘導された。またこの時、抗生物質 CPZ を同時に飲水投与しても全く心不全突然死の抑制効果は見られなかった（図 3）。以上の結果は、抗生物質 CPZ の飲水投与による心不全

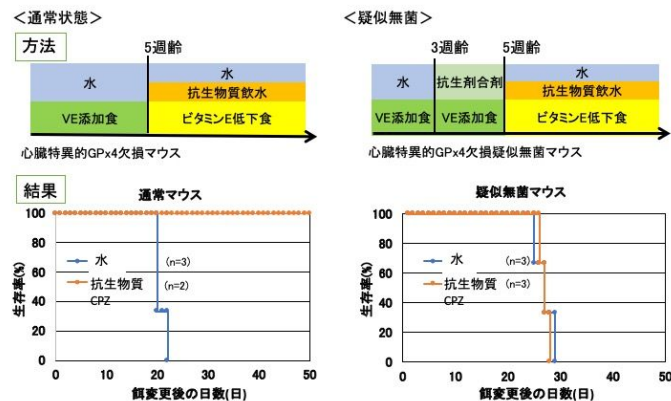


図3 疑似無菌マウスにおける抗生物質CPZ飲水投与による心突然死抑制効果

の抑制には、抗生物質 CPZ 耐性の生き残った腸内細菌が必要であることが示唆された。そこで次に、次世代シーケンサーの解析により抗生物質 CPZ 飲水投与による腸内細菌叢の変化について解析を行った。その結果、大変興味深いことに抗生物質 CPZ の飲水投与により、腸内細菌はほぼ種類の CPZ 耐性腸内細菌属に変化していることが明らかとなった。実際に腸内におけるこの CPZ 耐性腸内細菌の量的変化について、プレート法および PCR 法により解析を行った。その結果、通常食での飼育では CPZ 耐性腸内細菌はほとんど存在しておらず、抗生物質 CPZ を飲水投与することにより、他の腸内細菌がいなくなると腸内で増加することが確かめられた。また疑似無菌マウスにおいて、抗生物質 4 剤合剤の投与により一度疑似無菌状態にした後に、抗生物質 CPZ を飲水投与しても全く、CPZ 耐性腸内細菌は増加しなかった。このことから、この CPZ

耐性腸内細菌の腸内での増加がビタミン E 低下による心不全の抑制に必要であることが示唆された。

(3) 抗生物質 CPZ 耐性腸内細菌の単離と菌移植による脂質酸化依存的心不全の抑制効果

抗生物質 4 剤合剤前処理による擬似無菌心臓特異的 GPx 4 欠損マウスでは、ビタミン E 低下食に変えた際による脂質酸化依存的心不全による突然死を CPZ 飲水投与しても抑制することができず、またこの時 CPZ 耐性腸内細菌は増加しない。そこで、この抗生物質 4 剤合剤前処理による擬似無菌マウスに対して、抗生物質 CPZ 処理で CPZ 耐性腸内細菌属に変化した糞あるいは、単離した CPZ 耐性腸内細菌をゾンデで、毎週経口投与することにより、ビタミン E 低下食に変えた際にひきおこされる脂質酸化依存的心不全による突然死を抑制できるのかについて解析した(図4)。その結果、抗生物質 CPZ を投与した CPZ 耐性腸内細菌を含む糞移植および、CPZ 耐性腸内細菌をプレート法により単離した腸内細菌を直接移植したところ、脂質酸化依存的心不全による突然死の抑制効果が見られることを明らかにできた。また抗生物質 CPZ を処理し CPZ 耐性腸内細菌に変化した糞の移植、あるいは単離した CPZ 耐性腸内細菌の菌移植において、脂質酸化依存的心不全を抑制できたマウスでは腸内での CPZ 耐性腸内細菌の定着が観察された。

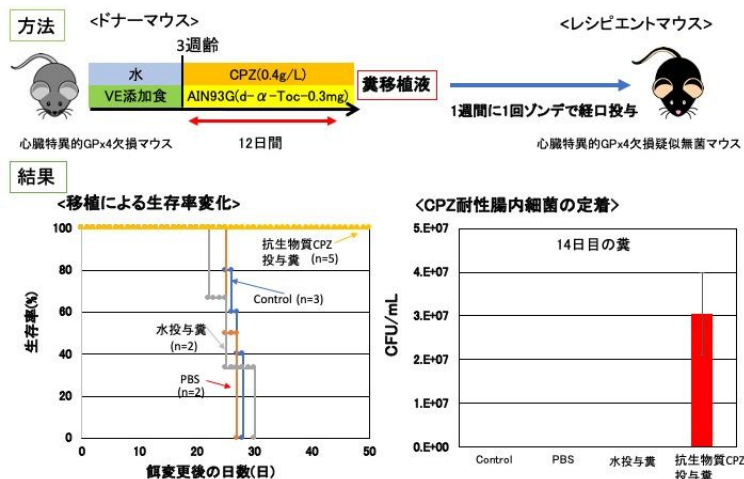


図4 抗生物質CPZ飲水投与のマウスの糞を擬似無菌マウスに移植すると心筋突然死を抑制できる

5. まとめと考察

本研究により、脂質酸化依存的な細胞死を伴う心不全に対して、抗生物質 CPZ は、直接抗酸化活性を示すのではなく、腸内において腸内細菌叢を変化させることにより、常在菌であった CPZ 耐性腸内細菌の増加をひきおこし、CPZ 耐性腸内細菌の増加を介して、脂質酸化依存的な心不全を抑制していることをはじめて明らかにできた(図5)。このことは、CPZ 耐性腸内細菌が心臓の脂質酸化の抑制を介して心臓機能の維持に寄与できること、腸と心臓に機能連関があることを初めて明らかにしたことになり学術的意義は大きい。CPZ 耐性腸内細菌がどのようにして心筋細胞での脂質酸化を抑制しているのかについては今後の検討課題である。また抗生物質 CPZ は、本来の細菌の増殖阻害による直接的な効能により心不全を抑制しているのではなく、抗生物質 CPZ により腸内細菌叢変化を介して生き残った CPZ 耐性腸内細菌が良い機能を発揮するというこれまでの抗生物質の効能とは全く異なる効果により、脂質酸化依存的な心不全を抑制していることを見出した。本研究の1番の成果は、心臓機能を正に制御できるはじめての CPZ 耐性腸内細菌の同定である、今後、この CPZ 耐性腸内細菌のプロバイオティクスとしての利用やプレバイオティクスの開発、またこれらの CPZ 耐性腸内細菌が産生する心臓での脂質酸化抑制に關与する化合物の同定により、新たな心不全予防薬や治療薬および食材の開発が期待され、社会的意義もきわめて大きいと考えられる。

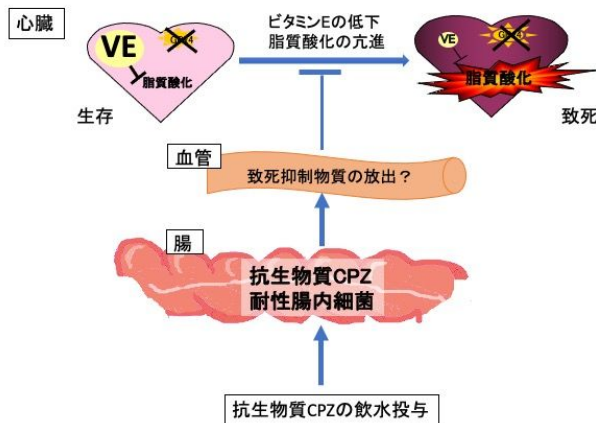


図5 本研究のまとめ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 今井浩孝	4. 巻 36
2. 論文標題 酸化リン脂質クオリティ制御の破綻による疾患と抗がん剤治療	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1701,1711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 今井浩孝	4. 巻 43
2. 論文標題 脂質酸化依存的新規細胞死フェトトーシスとリボキシトーシス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 基礎老化研究 Biomedical Gerontology	6. 最初と最後の頁 21,29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 今井浩孝	4. 巻 36
2. 論文標題 生体膜リン脂質のレドックス制御によるフェロトーシス制御	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 94,102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 今井浩孝	4. 巻 269
2. 論文標題 酸化リン脂質クオリティ制御の破綻による疾患とそのメカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学の歩み	6. 最初と最後の頁 1166,1174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 熊谷直哉, 幸村知子, 西山啓太, 岡田信彦, 今井浩孝
2. 発表標題 抗生剤飲水による心臓特異的GPx4欠損マウスの致死抑制機構の解析
3. 学会等名 第31回北里大学バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊谷直哉, 幸村知子, 一ノ瀬菜、今井浩孝
2. 発表標題 抗生物質飲水投与による心臓突然死の抑制機構の解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井浩孝
2. 発表標題 脂質酸化依存的心不全を制御する腸内細菌に関する研究
3. 学会等名 第7回あしなが予防医学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊谷直哉, 幸村知子, 一ノ瀬菜、今井浩孝
2. 発表標題 抗生物質セフォペラゾン飲水投与による心不全突然死抑制メカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井浩孝
2. 発表標題 酸化脂質還元酵素PHGPxノックアウトマウスを用いたビタミンE研究
3. 学会等名 日本ビタミン学会第69回大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今井浩孝
2. 発表標題 GPx4とビタミンEにより制御される新規細胞死と疾患に関する研究
3. 学会等名 衛生薬学・環境トキシコロジー フォーラム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今井浩孝
2. 発表標題 腸内細菌叢変化を介した脂質酸化依存的心不全の抑制メカニズムの解析
3. 学会等名 第6回あしなが予防医学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井浩孝
2. 発表標題 黒酢成分による脂質酸化依存的心筋突然死の予防効果の解析
3. 学会等名 第13回北里大学農医連携シンポジウムH29年度私立大学研究ブランディング事業キックオフシンポジウム農医連携研究拠点の創出 食を介した腸内環境制御による健康社会構築（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊谷直哉、幸村知子、一ノ瀬菜、今井浩孝
2. 発表標題 ビタミンE低下による脂質酸化依存的心臓突然死の抗生剤投与による抑制機構の解析
3. 学会等名 日本ビタミン学会第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 幸村知子、熊谷 直哉、一ノ瀬菜、今井浩孝
2. 発表標題 脂質酸化を起因とする心不全突然死の抗生剤投与による抑制メカニズムの解析
3. 学会等名 第72回 日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊谷直哉、幸村知子、一ノ瀬菜、今井浩孝
2. 発表標題 抗生剤セフォペラゾン耐性腸内細菌が脂質酸化依存的な心不全突然死を抑制する
3. 学会等名 フォーラム2019 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊谷直哉、幸村知子、一ノ瀬菜、今井浩孝
2. 発表標題 抗生剤セフォペラゾンが脂質酸化依存的な心不全突然死を抑制する
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 幸村知子、熊谷 直哉、今井 浩孝
2. 発表標題 抗生物質セフォペラゾンの飲水投与による心不全突然死抑制メカニズムの解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊谷直哉、幸村知子、一ノ瀬菜、伊藤光咲、今井浩孝
2. 発表標題 VE低下による心突然死の抗生剤飲水投与による抑制機構の解析
3. 学会等名 第31回ビタミンE研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井浩孝、幸村知子、山元正博、山元文晴
2. 発表標題 茶麹による男性不妊症改善効果と腸内細菌を介した心不全抑制効果
3. 学会等名 第8回あしなが予防医学研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 リン脂質ヒドロペルオキシド依存性細胞死が関連する疾患の予防又は治療剤	発明者 今井浩孝	権利者 北里研究所・三菱ケミカルフーズ株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-022826	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------