

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15896

研究課題名(和文)急性心筋梗塞患者における腸内細菌叢とその代謝産物TMAOの役割の解明

研究課題名(英文)The role of microbiome and TMAO in patients with acute myocardial infarction

研究代表者

松澤 泰志 (Matsuzawa, Yasushi)

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・講師

研究者番号：90600635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：急性心筋梗塞患者の入院後初回の糞便で次世代シークエンス技術を用いて腸内細菌叢メタゲノム解析を行い腸内細菌の多様性を解析し、急性期、慢性期の血清サンプルよりTMAO測定を行った。TMAOは腸内細菌から代謝される物質である。今回の研究では慢性期の血清TMAO値が高値であると、冠動脈動脈硬化進展と関連し、その後の心血管イベント発生とも関係することが明らかになった。また、腸内細菌の多様性の高い(腸内細菌がバランスよく豊かな状態)では抗血小板薬の効果も良く、血液の血栓性が良く抑制されていた。以上より急性心筋梗塞患者においても腸内細菌叢やその代謝物質が病態や予後に影響を及ぼしていることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋梗塞、脳梗塞は主要な死因であり、死亡だけでなく患者に障害を残し、介護需要、医療需要に占める割合も大きい。動脈硬化性疾患の主要な原因として、糖尿病や高コレステロール血症、高血圧などがあるがその原因はまだ半分も解明されていない。腸内細菌叢は宿主の代謝や炎症と重要に関連することが最近わかってきており、動脈硬化性疾患の一つの重要な原因となる可能性がある。今回の我々の研究結果により、腸内細菌叢と動脈硬化性疾患の関連が明らかになってきた。動脈硬化性疾患の新たな介入ターゲットとなる可能性があり今後の更なる研究によって調査される必要がある。

研究成果の概要(英文)：Trimethylamine N-oxide (TMAO), a metabolite derived from the gut microbiota, is proatherogenic

and associated with cardiovascular events. We included STEMI patients and measured plasma TMAO levels at the onset of STEMI and 10 months later (chronic phase). The chronic-phase TMAO level was associated with coronary atherosclerosis progression and independently predicted future cardiovascular events. Furthermore, high microbiome diversity was significantly associated with low platelet-derived thrombogenicity 1h after administration of antithrombotic agents in patients with STEMI. These data suggest that the clinical importance of gut microbiome and its metabolite, TMAO, on future cardiovascular events in patients after STEMI.

研究分野：循環器内科

キーワード：動脈硬化 心筋梗塞 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

常在細菌の中で、最も重要な生体制御を行っているのが消化管の下部にあたる腸管内の常在細菌(腸内細菌)である。ヒトの腸内細菌は種類にして400種、数にして100兆個以上と言われていいる。これは、ヒトの身体を構成する60兆個の細胞数よりも多く、腸内細菌の総重量は1kgにも及ぶ。腸内細菌が集まり腸内フローラ(腸内細菌叢)を形成し、ヒトと共生しながら互いに影響を与えている。ヒト側のメリットは主に3つあり、病原菌からの感染防御、免疫機能の向上、ヒトが消化できない食物の代謝である。非常に様々な働きをする腸内細菌叢であるが、これまでの培養法ではその30%程度しか同定することができなかった。近年、腸内細菌叢の解析法として、糞便から抽出したDNAをPCRで増幅しクローンの16S ribosome RNA 遺伝子の配列を読む16S ribosome RNA 遺伝子解析法、次世代型シ - ケンス技術によるメタゲノム解析法が開発され、培養困難な菌も含めた網羅的な解析が可能となった。ほぼ全ての腸内フローラを検出できるようになり、腸内フローラが宿主の健康や全身性の疾患発症に深く関わっていることが分かってきた(図1. *Nat Med.* 2016;22:1079-1089.)。腸内細菌は、肥満、炎症性腸疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、大腸がん、肝がん、2型糖尿病、アレルギー疾患に関与する。また、循環器疾患においても腸内細菌の病態への関与や、腸管免疫修飾による動脈硬化予防の研究も最近報告されてきている。腸内細菌叢が動脈硬化に寄与する経路は多様かつ複雑である。ある種の細菌は全身性炎症を惹起し動脈硬化進行に寄与し、他のものは抗炎症・抗動脈硬化に働く。腸内細菌の一部はホスファチジルコリン代謝産物 TMAO (tri-methylamine N-oxide) の代謝に関連し、この TMAO が動脈硬化進展、心血管病を悪化させることが報告された (Wang et al. *Nature.* 472: 57-63. 2011.) (Tang et al. *NEJM.* 368: 1575-1584. 2013.)。TMAO の増加により、マクロファージのスカベンジャー受容体が増加して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" が増加することが示された。また、高い TMAO レベルは心不全患者の死亡と関連し、その予後との関連は虚血性心疾患と非虚血性心疾患患者において同程度であった (Tang et al. *JACC.* 64:1908-1914. 2014.)。さらに、腸内細菌は宿主の脂肪組織に影響を及ぼす。動物由来の飽和脂質はグラム陰性菌、エンドトキシン、ペプチドグリカンの全身循環への移行を促進する。結果として、白色脂肪組織由来の炎症を引き起こし、糖尿病発症に寄与する。ビフィズス菌や食物繊維摂取の摂取により白色脂肪の褐色化と褐色脂肪細胞の活性化が促進されることに加え、AMPK 活性化を介して肝臓や筋肉でのエネルギー消費を増加させる。AMI や急性心不全の状態では、交感神経系の活性化、心拍出量の低下から腸管の虚血が起こる。腸管における静脈うっ血と虚血の結果、腸管粘膜の機能低下・透過性亢進をきたす。腸管粘膜のバリア機構が低下し、グラム陰性菌またはリポポリサッカライドのような細菌性エンドトキシンの腸間膜リンパ節または全身循環への移行が促進され、全身の炎症を惹起する (Peschel et al. *Eur J Heart Fail.* 5:609-614. 2003.)。腸管の虚血・再灌流の際に腸内細菌の構成が急激に変化する可能性があることも示唆され (Wang et al. *Shock.* 39:96-103. 2013.)。腸管低酸素、高 CO₂、pH 変化などは腸内細菌叢の病原毒性を上げる (Alverdy et al. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 8:205-209. 2005.)。この全身性炎症が血栓塞栓症、動脈硬化進行、心筋梗塞リモデリング、心不全、腎機能に影響を与えている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、AMI 患者の入院後初回の糞便で次世代型シ - ケンス技術を用いて腸内細菌叢メタゲノム解析、急性期、慢性期に TMAO 測定を行う。心筋梗塞患者の血管内皮機能、血小板凝集能、冠動脈プラークの量と質、ステント血栓症・再狭窄、動脈硬化進展、左室リモデリング、予後に対する腸内細菌叢・TMAO の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

横浜市立大学附属市民総合医療センター心臓血管センターに急性心筋梗塞で入院した患者を対象とする。急性期の糞便検体から腸内細菌叢メタゲノム解析を行う。また、急性期と10ヶ月後の血清 TMAO を測定する。そして以下の項目と腸内細菌叢、血清 TMAO 値との関連を調査する。

<横断> (急性期入院中のデータでの検討)

- (1) 心筋梗塞後の全身性炎症(白血球分画、CRP、IL-6、TNF- α)
- (2) 血管内イメージングで評価する冠動脈プラークの質・量
- (3) 血小板凝集能検査、EndoPAT で評価する血管内皮機能
- (4) 持続血糖モニタリングを用いた血糖変動
- (5) 心筋逸脱酵素(CK)と心筋 MRI による心筋梗塞サイズ

<縦断> (1ヶ月後・10ヶ月後の血管内皮機能検査、1ヶ月後の心臓 MRI、10ヶ月後の心臓カテーテル検査・冠動脈内イメージング、3年間の予後調査)

- (1) 冠動脈内イメージングで評価する冠動脈プラーク質的・量的な変化
- (2) 血小板凝集能検査、EndoPAT で評価する血管内皮機能の変化

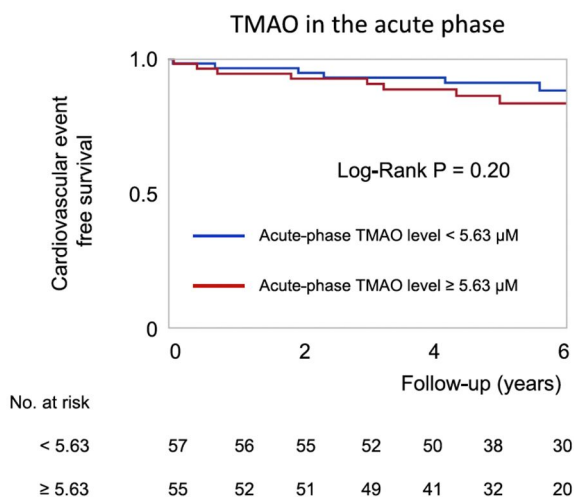
(3) 心筋 MRI と左室造影により評価する心筋リモデリング

(4) 3年間追跡調査での心血管予後

4. 研究成果

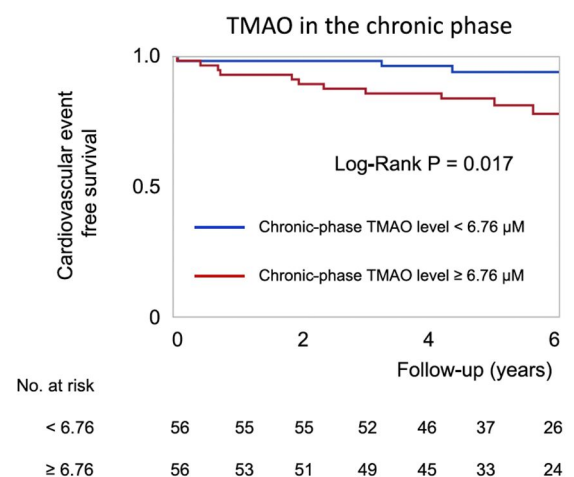
112人の急性心筋梗塞患者の急性期と10ヶ月後の慢性期の血清からTMAOを測定した。これらの患者にはガイドラインに準じて至適薬物治療、生活指導、禁煙指導を行なった。急性期と慢性期のTMAO値は中央値で5.63から6.76 μM と有意に上昇していた ($P = 0.048$)。これは現状のガイドラインに準じた治療ではTMAOを有効に低下させることができていないということの意味する。急性期から慢性期にかけて冠動脈の動脈硬化化スコアであるSYNTAX scoreが上昇した患者ではTMAO値が有意に高値であった (log chronic TMAO levels: 0.950 ± 0.364 versus 0.805 ± 0.304 , $P = 0.031$)。急性期TMAO値の中央値で患者を2群に分けてその後の心血管イベント発生を比較した(図1)。急性期TMAO値が高値であると心血管イベントが多い傾向にあったが統計的には有意ではなかった (log rank $p=0.20$)。

< 図 1 >



一方、慢性期TMAO値の中央値で患者を2群に分けてその後の心血管イベント発生を比較したところ(図2)、慢性期TMAO値が高値であると心血管イベントが有意に多く発生した (log rank $p=0.017$)。

< 図 2 >



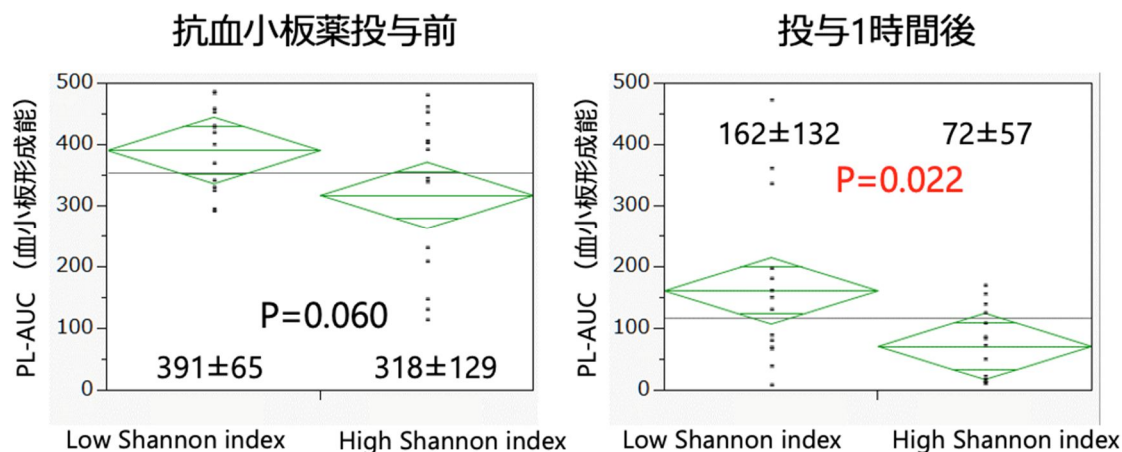
以上の結果を Scientific Report 誌に報告した (Sci Rep. 2019 Aug 12;9(1):11647. doi: 10.1038/s41598-019-48246-6.)。

上記研究の対象患者をさらに長期に追跡調査したところ、急性期のTMAO値だけでなく慢性期のTMAO値も心血管イベント発生に関与していることが明らかとなり2023年の日本循環器学会総会で発表した。

また、急性心筋梗塞患者の糞便中の16sリボソームRNAをメタゲノム解析し腸内細菌叢の分

布を調査した。腸内細菌叢の多様性を Shannon index を用いて検定した。急性心筋梗塞患者の血液の血栓性を Total Thrombus-formation Analysis System (T-TAS) を用いて測定した。急性心筋梗塞患者が来院して抗血小板薬負荷投与前の T-TAS には有意な差がなかったが、抗血小板薬負荷投与 1 時間後には有意差がみられた。Shannon index が高値群すなわち腸内細菌叢の多様性が高い患者群において T-TAS が有意に低値すなわち血栓形成性能が低いということがわかった(図 3)(第 87 回日本循環器学会学術集会 2021 年)。

< 図 3 >



過去の研究から、排便機能が低下し、便の腸管通過時間が長くなると腸内細菌叢が悪化し、腸内細菌叢の悪化もまた腸管機能を低下させることが示唆されている。そのため、腸管と循環器疾患の関係をさらに調べていくために、急性冠症候群 2000 例を対象に後ろ向きで入院中の排便回数を調査した。そうしたところ、排便回数減少はその後の長期予後不良と有意に関連することがわかった。この関係は年齢、性別、心筋梗塞の重症度、腎機能など種々の因子とは独立しており、腸管機能の循環器疾患における重要性を示唆する結果となった。この結果に関しても現在論文執筆中で投稿していく。そして、排便回数と、腸内細菌叢の分布や TMAO 値についても現在関係を調べている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 H. Nakahashi, Y. Matsuzawa, K. Hibi, N. Iwahashi, N. Maejima, K. Okada, Y. Kimura, E. Akiyama, Y. Minamoto, Y. Ogino, R. Satou, M. Kosuge, K. Tamura, K. Kimura
2. 発表標題 Impact of firmicutes to bacteroidetes ratio on the cardiovascular events in male patients with acute myocardial infarction
3. 学会等名 日本循環器学会総会2021年（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松澤泰志
2. 発表標題 Microbiota-derived Trimethylamine N-oxide (TMAO) as Residual Risk after ST-elevation Myocardial Infarction
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------