

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23944

研究課題名(和文) 腸内細菌叢由来LPSと循環器疾患における慢性炎症との関連解明研究

研究課題名(英文) Impact of gut microbial LPS on cardiovascular diseases

研究代表者

吉田 尚史(Yoshida, Naofumi)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：00846321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は腸内細菌叢の異常が循環器疾患発症にどのように寄与しているのかについて、腸内細菌由来のリポ多糖に着目して検討を行った。結果、リポ多糖の構造は腸内細菌種により異なる事、その構造の差異がTLR4を介した炎症惹起能を規定する事、そして循環器疾患患者の腸内細菌では非循環器疾患患者の腸内細菌に比して炎症惹起能が高いリポ多糖を持つ腸内細菌が多い事、これにより循環器疾患患者の腸内細菌由来リポ多糖値(=糞便リポ多糖値)は非循環器疾患患者より高値である事、を明らかとした。さらに炎症惹起能が高いリポ多糖を動脈硬化モデルマウスに腹腔内投与すると、動脈硬化が加速される事も明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで我々は、循環器疾患患者における特徴的な腸内細菌叢を明らかとしてきた。しかしこの腸内細菌叢の偏倚が、どのように循環器疾患の発症、進展に寄与しているのかについては未解明の部分が残されていた。本研究成果により、循環器疾患患者の腸内細菌由来の炎症惹起能の高いリポ多糖が、循環器疾患の発症、進展に関与している事が示唆された。この事から腸内細菌と循環器疾患を繋ぐ機序の一端が解明され、今後腸内細菌由来リポ多糖に着目した、新たな循環器疾患の予防、治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Cardiovascular disease (CVD) is considered as an inflammatory disease. Thus, we aim to understand the novel inflammatory origin of CVD, and explore therapeutic approaches to directly regulate the source of inflammation. We previously reported that gut microbiota dysbiosis is related to coronary artery disease and heart failure. As gut bacterial lipopolysaccharide (LPS) acts as an important intermediary between the gut microbiota and immune cell activation, we hypothesized that it could have a pivotal role as an inflammatory origin in the development of CVD. We elucidated that each bacterial species has a distinct LPS structure, which are associated with differing immunogenicity. CVD patients have high immunogenicity LPS and fecal LPS levels in patients with CVD is higher than that of non-CVD patients. The atherosclerosis-prone mice injected LPS show worsening atherosclerosis. These results indicate that gut microbial LPS serve as a novel therapeutic approach to prevent CVD.

研究分野：循環器内科学

キーワード：循環器疾患 腸内細菌 リポ多糖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトは 500~1000 種類に及び腸内細菌と共生している。近年、腸内細菌叢の偏倚が様々な疾患発症に寄与する事が報告されており、循環器疾患においても新たな危険因子となる事が報告されているが、その詳細な機序については不明な点も多い。我々は以前に、冠動脈疾患患者では、冠動脈疾患の危険因子を持つが疾患を発症していないコントロール患者と比して、*Bacteroides dorei* と *Bacteroides vulgatus* の存在割合が減少している事を報告した(Yoshida N et al., Circulation. 138(22); 2486-2498: 2018.)。しかし、2 菌の減少と循環器疾患の因果関係は不明であった。循環器疾患の多くは慢性炎症により進展していく事から、我々は菌体毒素『リポ多糖(lipopolysaccharide, LPS)』に着目し、2 菌のリポ多糖が慢性炎症と循環器疾患に与える影響を検討した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腸内細菌由来の LPS は循環器疾患発症に寄与しているのか、を解明する事である。そのために、*B. dorei* と *B. vulgatus* の LPS を単離すると共に、陽性コントロールとして大腸菌の LPS も用いて *in vitro*、*in vivo* の研究を行った。また患者糞便を用いた臨床研究も行った。

3. 研究の方法

(1) LPS の構造と炎症惹起能の解析

B. dorei と *B. vulgatus* の LPS の単離はホットフェノール水抽出法により行った。抽出した LPS を電気泳動後、銀染色を行い、純度の高い LPS が抽出されている事を確認した。大腸菌の LPS は Sigma-Aldrich 社から購入した。LPS の構成成分のうち、TLR4 リガンドである lipid A を精製するため、LPS に対して酢酸を用いた加水分解を行い、精製された lipid の構造解析を、LC-MS/MS で解析した。また炎症惹起能は、RAW マクロファージ細胞を LPS で刺激後の上清サイトカイン濃度や、野生型マウスに LPS を投与する敗血症モデルの致死率で検討を行った。

(2) 循環器疾患患者における糞便 LPS 活性値の解析と *Bacteroides* 属菌の割合との関連解析

神戸大学医学部附属病院に入院された循環器疾患患者から糞便を採取した。腸内細菌叢の解析は 16S rRNA 解析により行った。糞便 LPS 活性値は Limulus Amebocyte Lysate アッセイにより測定した。

(3) 動脈硬化モデルマウスに、*Bacteroides* 属菌や大腸菌の LPS を投与する実験

動脈硬化モデルマウス (*ApoE*^{-/-}マウス) に *Bacteroides* 属菌と大腸菌の LPS を週 1 回 6 週間腹腔内投与し、大動脈基部の動脈硬化面積を評価した。また動脈硬化巣の蛍光免疫染色を行い、どのような炎症細胞が動脈硬化巣に認められるかの検討を行った。

4. 研究成果

(1) LPS の構造と炎症惹起能の解析

LC-MS/MS での lipid A 構造解析の結果、大腸菌の lipid A は、質量 1700g/mol を超える、6 本のアシル基を持つ事が分かった (図 1)。一方、*B. dorei* と *B. vulgatus* の lipid A は、質量 1700g/mol を超えない、4 本ないし、5 本のアシル基を有する lipid A である事が分かった (図 1)。

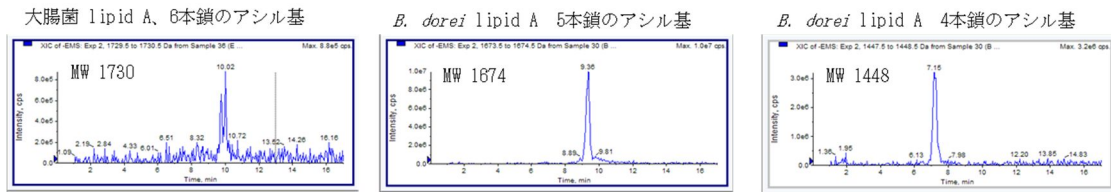


図1 lipid Aの構造解析

RAW マクロファージ細胞を各 LPS で刺激し、上清の TNF-

を定量した結果、大腸菌 LPS で刺激した RAW 細胞からは LPS 濃度依存的に TNF- 産生量が増加した。しかし、*B. dorei* 並びに *B. vulgatus* で刺激した RAW 細胞からは、濃度依存的な TNF- 産生は見られず、TNF- 産生量も大腸菌 LPS で刺激した RAW 細胞と比して有意な減少を認めた。また 10 週齢の野生型マウスに大腸菌 LPS を腹腔内投与すると、濃度依存的な敗血症死を認めたが、*B. dorei* 並びに *B. vulgatus* の LPS を腹腔内投与したマウスは敗血症を起こさなかった (図 2)。LPS が作用する TLR4 をノックアウトしたマウスに大腸菌 LPS を投与すると、敗血症を起こさない事から、従来の報告通り LPS は TLR4 を介した免疫刺激作用がある事を再確認した。

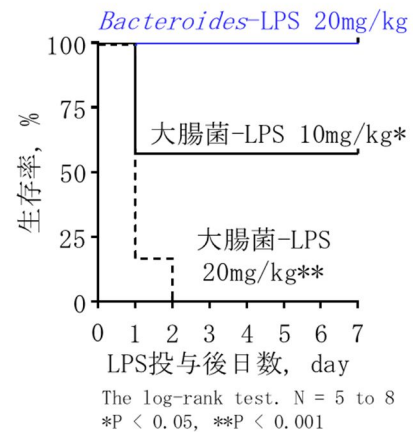


図2 敗血症モデルにおける検討

(2) 循環器疾患患者における糞便 LPS 活性値の解析と *Bacteroides* 属菌の割合との関連解析

さらに腸内細菌由来 LPS と循環器疾患との関連を調査するため、神戸大学医学部附属病院循環器内科に入院された患者 92 名の腸内細菌叢解析と糞便 LPS 活性値の測定を行った。その結果、腸内細菌叢において *Bacteroides* 属菌の割合が多いほど、糞便 LPS 活性値が低下する事が分かった ($r=-0.292$, $P<0.01$)。また、ランダムフォレストにより糞便 LPS 活性値に最も関連のある菌を検索した結果、*Bacteroides* 属菌が糞便 LPS 活性値の低下に最も寄与する菌である事が分かった。これらの事から、*B. dorei*、*B. vulgatus* などの *Bacteroides* 属菌は、糞便 LPS 活性値を低下させる事が分かった。*B. dorei* と *B. vulgatus* の LPS を Limulus Amebocyte Lysate アッセイにて評価した結果、大腸菌の LPS に比し、有意に低い LPS 活性値を示した事から、糞便中に LPS 活性値の低い *Bacteroides* 属菌が増加すると糞便 LPS 活性値も低下する事が明らかとなった。

(3) 動脈硬化モデルマウスに、*Bacteroides* 属菌や大腸菌の LPS を投与する実験

腸内細菌由来の LPS の一部は血中に漏出する事が知られている。そこで *Bacteroides* 属菌の LPS が血中に漏出した際に、動脈硬化形成を促進させるのかについて、検討を行った。陽性コントロールとして大腸菌の LPS を動脈硬化モデルマウスに投与すると、vehicle を投与した control マウスと比して、有意な動脈硬化巣の増大を認めた (図 3)。しかし、*Bacteroides* の LPS (*B.*

dorei + *B. vulgatus* の LPS) を投与しても、コントロールに比し動脈硬化巣の増大を認めなかった (図 3) 。動脈硬化巣の組織学的検討を行った結果、大腸菌 LPS を投与したマウスの動脈硬化巣では、マクロファージや好中球の著明な集積を認めた。このことから、炎症惹起能の高い大腸菌 LPS が血中に存在すると、マクロファージや好中球などの免疫系を介した動脈硬化形成が促進される事が分かった。この事は、血中 LPS 値が高い症例は将来の心血管イベントが多い疫学研究結果と一致し、その機序を説明し得る結果と考えられた。

以上、LPS の構造は菌種によって異なり、その構造の差異が炎症惹起能を規定する事が分かった。*Bacteroides* 属菌の lipid A のアシル基は 4~5 本であり、大腸菌などの 6 本のアシル基本を持つ LPS と比し炎症惹起能が低く、Limulus Amebocyte Lysate アッセイでも LPS 活性が低い事が分かった。最も重要な事は、*Bacteroides* 属菌の LPS は動脈硬化形成に寄与せず、炎症惹起能が高い大腸菌などの LPS が動脈硬化形成を促進している事が分かった。これまで一括りにされていた LPS であるが、LPS がどの菌に由来するかにより、循環器疾患の発症や進展を大きく左右する事が明らかとなった。この事は、これまでの LPS による慢性炎症の概念を大きく覆す研究となり、本研究により循環器疾患を含む慢性炎症性疾患における炎症の起点としての腸内細菌叢由来 LPS の概念が確立された。

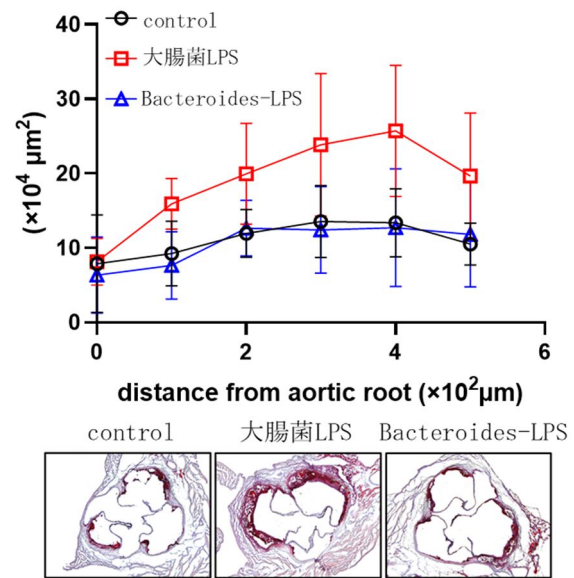


図3 各LPS投与後の大動脈洞の動脈硬化面積

本研究を要約すると、腸内細菌が産生する炎症惹起能の高い 6 本鎖のアシル基を持つリポ多糖が、循環器疾患の発症、進展に関与している事が示唆された。*B. dorei* や *B. vulgatus* が産生するアシル基が 4 ないし 5 本のリポ多糖は炎症惹起能が低く、2 菌は循環器疾患に対して保護的に働く事が明らかとなった。本研究により、腸内細菌と循環器疾患を繋ぐ新たなメカニズムの一端が解明されたため、2 菌を腸管内で増加させるような将来の疾患発症予防・治療法の開発研究へ繋げたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshida Naofumi, Kitahama Seiichi, Yamashita Tomoya, Hirono Yasuko, Tabata Tokiko, Saito Yoshihiro, Shinohara Ryohei, Nakashima Hitomi, Emoto Takuo, Hirota Yushi, Takahashi Tetsuya, Ogawa Wataru, Hirata Ken ichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Metabolic alterations in plasma after laparoscopic sleeve gastrectomy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 123 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13328	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 Yamashita Tomoya, Yoshida Naofumi, Emoto Takuo, Hirata Ken-ichi	4. 巻 28
2. 論文標題 Unraveling the Effects of Trimethylamine N-Oxide on Stroke: "The lower, the better?"	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 314 ~ 316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.ED142	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 Tabata Tokiko, Yamashita Tomoya, Hosomi Koji, Park Jonguk, Hayashi Tomohiro, Yoshida Naofumi, Saito Yoshihiro, Fukuzawa Koji, Konishi Kana, Murakami Haruka, Kawashima Hitoshi, Mizuguchi Kenji, Miyachi Motohiko, Kunisawa Jun, Hirata Ken-ichi	4. 巻 36
2. 論文標題 Gut microbial composition in patients with atrial fibrillation: effects of diet and drugs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 105 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-020-01669-y	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 Suehiro Hideya, Kiuchi Kunihiro, Fukuzawa Koji, Yoshida Naofumi, Takami Mitsuru, Watanabe Yoshiaki, Izawa Yu, Akita Tomomi, Takemoto Makoto, Sakai Jun, Nakamura Toshihiro, Yatomi Atsuke, Takahara Hiroyuki, Sonoda Yusuke, Nakasone Kazutaka, Yamamoto Kyoko, Yamashita Tomoya, Hirata Ken ichi	4. 巻 32
2. 論文標題 Circulating intermediate monocytes and atrial structural remodeling associated with atrial fibrillation recurrence after catheter ablation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiovascular Electrophysiology	6. 最初と最後の頁 1035 ~ 1043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jce.14929	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 Yoshida Naofumi, Yamashita Tomoya, Kishino Shigenobu, Watanabe Hikaru, Sasaki Kengo, Sasaki Daisuke, Tabata Tokiko, Sugiyama Yuta, Kitamura Nahoko, Saito Yoshihiro, Emoto Takuo, Hayashi Tomohiro, Takahashi Tomoya, Shinohara Masakazu, Osawa Ro, Kondo Akihiko, Yamada Takuji, Ogawa Jun, Hirata Ken-ichi	4. 巻 10
2. 論文標題 A possible beneficial effect of Bacteroides on faecal lipopolysaccharide activity and cardiovascular diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-69983-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Naofumi, Saito Yoshihiro, Tsujimoto Yasushi, Taito Shunsuke, Banno Masahiro, Kataoka Yuki, Yamashita Tomoya, Hirata Ken-ichi	4. 巻 8
2. 論文標題 The impact of antibiotics on the metabolic status of obese adults without bacterial infection: a systematic review and meta-analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 1059 ~ 1059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/atm-20-1007a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomoya Yamashita, Naofumi Yoshida, Takuo Emoto, Yoshihiro Saito, and Ken-ichi Hirata	4. 巻 -
2. 論文標題 Two Gut Microbiota-Derived Toxins Are Closely Associated with Cardiovascular Diseases: A Review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins13050297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Naofumi Yoshida, Tomoya Yamashita, Tokiko Tabata, Yoshihiro Saito, Takuo Emoto, Tomohiro Hayashi, Masakazu Shinohara, Kenichi Hirata
2. 発表標題 Bacteroides Decrease Human Fecal Lipopolysaccharide Levels
3. 学会等名 第84回日本循環器学会YIA
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 吉田尚史、山下智也、平田健一	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 4
3. 書名 循環器ジャーナル	

1. 著者名 吉田尚史、山下智也、平田健一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 6
3. 書名 医学の歩み	

〔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
---------	---------