

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08534

研究課題名(和文) 腸内細菌叢の変容が肺高血圧症の病態に關与する機序の解明と臨床応用のシーズ探索

研究課題名(英文) Assessment of relationship between gut dysbiosis and pathogenesis of pulmonary hypertension

研究代表者

田邊 信宏 (Nobuhiro, Tanabe)

千葉大学・大学院医学研究院・特任教授

研究者番号：40292700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では肺高血圧症の病態と腸内細菌叢異常の間の關連を明らかにした。第一に、肺高血圧症モデル動物における腸内細菌叢解析を通し、肺高血圧症における腸内細菌叢異常の存在を示した。さらに、抗菌薬を用いた腸内細菌叢削除が病態発生を抑制しうることから、腸内細菌叢異常と肺高血圧症の病態発生に因果關係が存在することを示した。慢性血栓塞栓性肺高血圧症(CTEPH)患者を対象とした検討では、同疾患における腸内細菌叢異常の存在とともに、腸内細菌由来のエンドトキシンと炎症性サイトカインの公知の間の關連を示し、腸内細菌叢異常がCTEPHの病態発生に必要な炎症性機序に關与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は腸内細菌叢異常が肺高血圧症を持つヒト、ラットと種を越えて共通して存在することを明らかにし、腸内細菌叢異常と肺高血圧症の間に普遍的な關係が存在しうること示したことにある。さらに、本研究では肺高血圧症で腸内細菌叢異常が単に併存しているのではなく、両者の間に因果關係が存在することを明らかにした。このことは、腸内細菌叢異常の是正が、肺高血圧症の病態進展抑制につながることを意味している。

肺高血圧症は未だ根治が困難とされているが、本プロジェクトを通し、腸内細菌叢異常をターゲットにした全く新しい肺高血圧症の予防・治療法の開発の可能性を提供することができた。

研究成果の概要(英文)：The impact of gut dysbiosis on the development of pulmonary hypertension was investigated in this project. In a study of a pulmonary hypertension animal model, we found that modifying altered gut microbiota using antibiotics could suppress the development of pulmonary vascular remodeling and pulmonary arterial hypertension, suggesting the causal role of gut dysbiosis for pulmonary hypertension. In a clinical study analyzing the gut microbiota of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH), the presence of gut dysbiosis in CTEPH patients has also cleared. In CTEPH patients, the serum levels of endotoxin derived from gut microbiome and inflammatory cytokines are higher. And the endotoxin and cytokines were correlated with each other. This result suggests that gut dysbiosis might be associated with the translocation of toxic agents to the systemic circulation and might induce inflammation leading to the pathogenesis of CTEPH.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：腸内細菌叢 肺高血圧症 慢性血栓塞栓性肺高血圧症 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

特発性・遺伝性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH/HPAH) および慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (CTEPH) はいずれも肺動脈圧が異常に上昇し、進行期には右心不全により致死的転機をたどる厚生労働省指定難病である。IPAH/HPAH は骨形成タンパク質 (BMP) 受容体 (BMPR) などの遺伝子的異常を背景とし、細胞増殖抑制に働く BMP シグナルと細胞増殖促進に働くトランスフォーミング増殖因子 (TGF) シグナルシステムの不均衡が病態の中心とされる。一方、その病態進展には炎症機序が関与すると考えられている (Eur Respir J 53;1801887, 2019)。VEGF 受容体拮抗薬 (SU5416) と低酸素曝露 (Hypoxia) を組み合わせた肺高血圧 Su/Hx ラットを使用した研究では制御性 T 細胞の機能異常が血管損傷に対する異常な血管炎症を招き、肺高血圧症の進展をきたす可能性が示されている (Circ Res 109;867, 2011)。CTEPH は急性肺血栓塞栓症で発生した肺血栓が不溶化し肺動脈を狭窄・閉塞し肺高血圧症をきたすとされるが、炎症性腸疾患は CTEPH の発症と重症化のリスクを高めるとされる (Eur Respir J 41:462, 2013)。IPAH/HPAH と CTEPH では病態の背景の相違が存在するものの、炎症機序が病態進展に関与する点が共通している。しかし、その炎症の源がどこに存在するのかなど、その詳細は明らかになっていない。

ヒトの腸内には 100 兆個にもわたる腸内細菌が存在している。腸内細菌は宿主側との相互作用を通して共生関係にあり、ヒトの健康維持にも重要な役割を果たしている。腸内細菌叢による免疫系との相互作用が注目されている。腸内細菌は酪酸の産生や直接作用により、制御性 T 細胞の成熟に重要な役割を果たすことが知られている (Nat Chem Biol. 10(6):416, 2014)。また腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸は腸上皮細胞の主要なエネルギー源であり、腸管バリア機能の維持に関わっている。翻せば、腸内細菌叢およびその機能の異常は、ヒトの健康維持の破綻・疾患発生と関わることを意味する。実際に、腸内細菌叢異常が糖尿病、高血圧、動脈硬化、肥満など炎症が介在する様々な疾患の発生と関連することが近年多数報告されている。

以上のことから、肺高血圧症においても発症・病態進展に腸内細菌叢異常が存在し、病態進展メカニズムに何らかの関与しているのではないかと仮説を立てるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は腸内細菌叢異常 Dysbiosis が肺高血圧症の発症と進展に影響を与える機序の解明である。さらに肺高血圧症の予防と治療など臨床応用の可能性を探る。具体的に以下の解明すべき新たな Research question を明らかにすることを目的とした。

- (i) 腸内細菌叢異常が肺高血圧症で存在する普遍性の確認
- (ii) 腸内細菌叢異常が肺高血圧症を増悪ないし改善させる機序
- (iii) 腸内細菌叢異常の是正と臨床応用の可能性の検証

## 3. 研究の方法

### (1) 肺高血圧症ラットにおける腸内細菌叢の解析

5 週齢 SD ラットに VEGF 受容体阻害薬 SU5416 20mg の皮下注射、及び 3 週間の 10% O<sub>2</sub> による低酸素曝露を加えることで、肺高血圧症ラット (Su/Hx) を作成する。3 週目に糞便サンプルを採取し、右心カテーテル検査を行い、右室収縮期圧 (RVSP) の測定など血行動態の評価を行った。右心カテーテル検査後ラットは sacrifice し、肺や心臓組織を採取し、肺高血圧症に伴う肺や心臓のリモデリングの有無についての病理学的検討を行った。

糞便サンプルより DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 解析による腸内細菌叢解析を行い、得られた taxonomy データをバイオインフォマティクスの手法により解析した。

## (2) 抗菌薬投与による腸内細菌叢の修飾(削除)が肺高血圧症に与える影響について

肺高血圧症の病態に対して腸内細菌叢異常が原因としての関係が存在するかを検討するため、上記の方法で肺高血圧症ラットを作成し、VEGF 阻害薬の投与および低酸素曝露開始とともに抗菌薬投与を行い、腸内細菌叢の修飾(削除)を促した。3週目で右心カテーテル検査による血行動態評価、肺組織の病理学的評価を行った。さらに、糞便採取もを行い、16S rRNA 解析による腸内細菌叢解析を行った。

## (3) 慢性血栓性肺高血圧症患者における腸内細菌叢解析

ヒトでの肺高血圧症と腸内細菌叢異常の関連を探索するため、千葉大学医学部附属病院における倫理審査委員会の承認を得た上で、CTEPH 患者を対象とした臨床研究を行った。千葉大学医学部附属病院呼吸器内科でCTEPHと診断された患者11名を対象とし、診断のための検査入院時に便サンプルの採取を行った。採取された便サンプルは即座に凍結され、共同研究先である医薬基盤・健康・栄養研究所ワクチンマテリアルプロジェクトにて16S rRNA 解析による腸内細菌叢解析を行った。医薬基盤・健康・栄養研究所では数千人分に渡る健康人の腸内細菌叢データが蓄積されている。CTEPH 患者群と年齢、性別、BMI をマッチした22名分の健康人データを抽出し、疾患群との細菌叢組成の比較を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 肺高血圧症ラットにおける腸内細菌叢異常の存在の証明

肺高血圧症ラットと対照群のラットの腸内細菌叢の比較解析を行った所、主座標分析の結果から両者が異なる腸内細菌叢組成を取ることが明らかとなった(図 1A)。肺高血圧症ラットでは健康と比較して異常な構成の腸内細菌叢を持つことを明らかにした。また、腸内細菌叢の属レベルの解析では、肺高血圧症ラットでは抗炎症に働く Akkermansia, Bacteroides などの菌の減少が認められた(図 1B)。以上より肺高血圧症を呈したラットでは腸内細菌叢異常を持ち、その異常と関連した炎症性機序、肺高血圧症の病態形成に関与している可能性が示唆された。

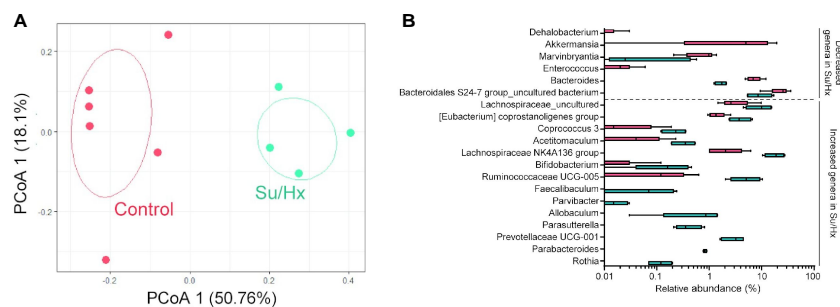


図1. 肺高血圧症ラットにおける腸内細菌叢異常の存在

### (2) 腸内細菌叢異常と肺高血圧症の病態発生における因果関係

肺高血圧症ラット(Su/Hx)に対して、抗菌薬投与を行った場合(Su/Hx + 抗菌薬)、腸内細菌叢組成が完全に変化することを確認した(図 2A)。さらに抗菌薬投与が、肺血管の肥厚および内腔の閉塞をきたす肺血管リモデリングの発生を抑制することで、肺動脈圧(右室収縮期圧:RVSP)の上昇を抑制しうることを明らかにした。以上の結果は、腸内細菌叢の組成を変化させることと肺高血圧症の病態の間に因果関係が存在することを示すとともに、腸内細菌叢が肺高血圧症の新たな治療・予防のターゲットとなる可能性を提示する知見であると考えられる。

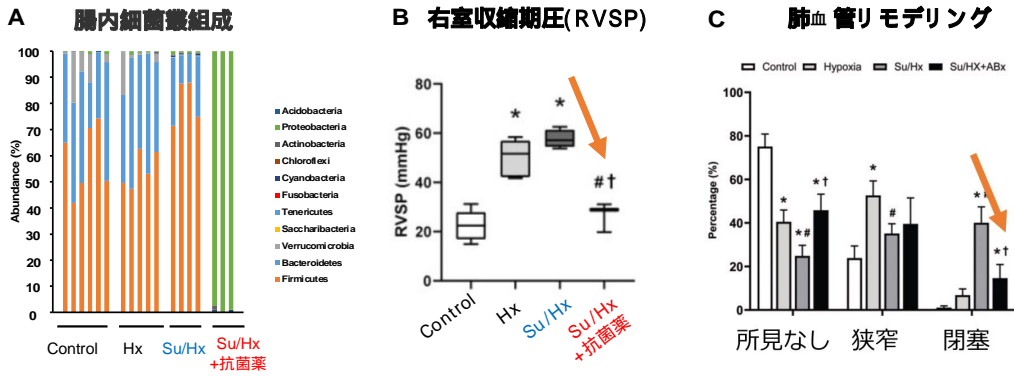


図2. Su/Hxラットに対する抗生薬による細菌叢修飾と血行動態、肺血管リモデリングへの影響

**(3) 慢性血栓性肺高血圧症がもつ腸内細菌叢異常と病態との関連**

CTEPH 患者がもつ腸内細菌叢の解析を行った所、主座標分析の結果から CTEPH 患者群は健常人とは異なる腸内細菌叢組成を持つことが明らかになった (MANOVA,  $p < 0.05$ , 図 3A)。さらに、健常人では多様性に富む細菌叢を持つ一方で、CTEPH 患者群では多様性の低下が認められた。以上より、CTEPH 患者では健常人と異なる異常な腸内細菌叢組成を取ることを明らかにした (図 3B, C)。

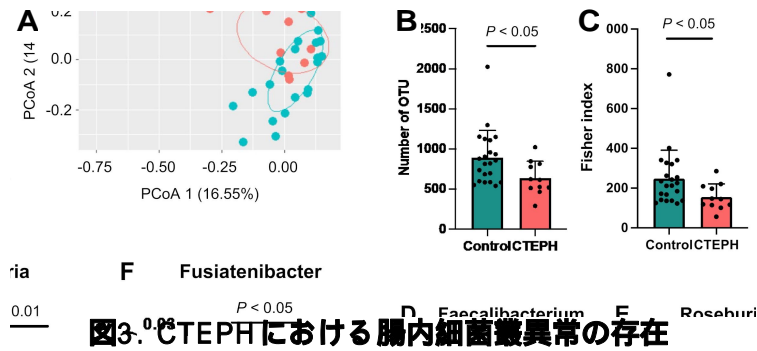


図3. CTEPHにおける腸内細菌叢異常の存在

腸上皮細胞によるバリア機能は、有毒物質である腸内細菌由来のエンドトキシンが腸管内腔から血中へ移行することを防いでいる。一方、腸内環境の悪化により腸上皮細胞のバリア機能が破綻すると、腸管透過性の亢進によりエンドトキシンが腸管から血中へ移行しうる。本研究では血漿エンドトキシン値の測定を行った所、対照群と比較し CTEPH 群では血漿エンドトキシン値が高値を示すことが明らかとなった (図 2A)。さらに、CTEPH 群では高値を示すエンドトキシンは TNF- $\alpha$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインと正の相関を示すことが明らかとなった。CTEPH で高値を示す炎症性サイトカインが、エンドトキシンと関連を示すことが示唆された (図 4B, C)。

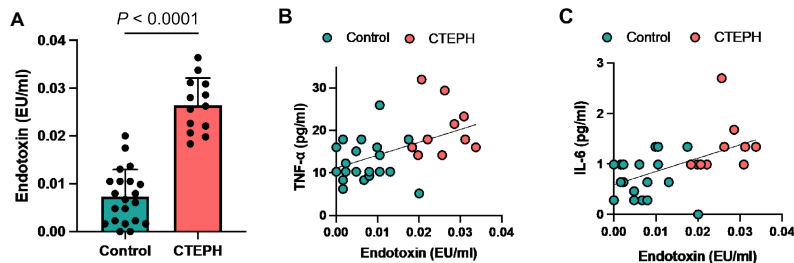


図4. CTEPHにおける血漿エンドトキシンと炎症性サイトカイン

腸管バリア機能の維持に重要な役割を果たしている物質が、腸管上皮に最も重要なエネルギーである酪酸である。酪酸は腸内細菌による食物繊維の発酵より産生され、その不足は腸管バリア機能の破綻へとつながる。CTEPH 患者群では Faecalibacterium、Roseburia、Fusicatenibacter などの酪酸産生菌の減少が認められ、菌の存在比と血漿エンドトキシン値との有意な負の相関を認めた (図 5)。すなわち、酪酸産生菌の減少が腸管バリアの破綻と関連し、腸管由来の有毒

物質であるエンドトキシンが血中に移行しているものと考えられた。

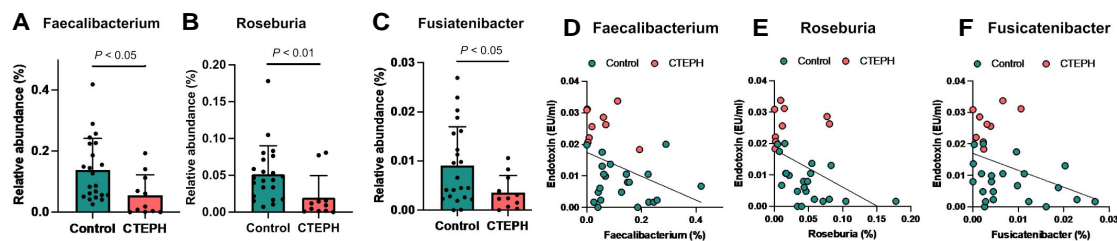


図5. CTEPHにおける酪酸産生菌の減少とエンドトキシンとの関係

以上より、CTEPH患者における腸内細菌叢異常の存在を初めて示した。さらに、CTEPHの病態発生に深く関与する関与すると考えられる炎症性機序が腸内細菌叢異常に起因するという、病態理解に新しい視点を提供することができた。

本プロジェクトの成果の第一の意義は腸内細菌叢異常が肺高血圧症を持つヒト、ラットと種を越えて共通して存在することを明らかにし、腸内細菌叢異常と肺高血圧症の間に普遍的な関係が存在していることを示したことにある。第二に、本研究では肺高血圧症で腸内細菌叢異常が単に併存しているのではなく、両者の間に因果関係が存在することを明らかにしたことにある。このことは、腸内細菌叢異常の是正が、肺高血圧症の病態進展抑制につながる可能性を示していると考えられる。

肺高血圧症は未だ根治が困難とされているが、本プロジェクトを通し、腸内細菌叢異常をターゲットにした全く新しい肺高血圧症の予防・治療法の開発の可能性を提供することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikubo Yumiko, Sanada Takayuki Jujo, Hosomi Koji, Park Jonguk, Naito Akira, Shoji Hiroki, Misawa Tomoko, Suda Rika, Sekine Ayumi, Sugiura Toshihiko, Shigeta Ayako, Nanri Hinako, Sakao Seiichiro, Tanabe Nobuhiro, Mizuguchi Kenji, Kunisawa Jun, Suzuki Takuji, Tatsumi Koichiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Altered gut microbiota and its association with inflammation in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a single-center observational study in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Pulmonary Medicine	6. 最初と最後の頁 138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12890-022-01932-0	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 Takayuki J. Sanada, Koji Hosomi, Hiroki Shoji, Jonguk Park, Akira Naito, Yumiko Ikubo, Asako Yanagisawa, Takayuki Kobayashi, Hideki Miwa, Rika Suda, Seiichiro Sakao, Kenji Mizuguchi, Jun Kunisawa, Nobuhiro Tanabe, Koichiro Tatsumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Gut microbiota modification suppresses the development of pulmonary arterial hypertension in an SU5416/hypoxia rat model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pulmonary Circulation	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2045894020929147	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6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 重城喬行
2. 発表標題 慢性血栓性肺高血圧症における腸内細菌叢異常と病態に与える意義
3. 学会等名 第7回 日本肺高血圧・肺循環学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 重城喬行
2. 発表標題 肺高血圧症における腸内細菌叢
3. 学会等名 第7回 日本肺高血圧・肺循環学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayuki Jujo
2. 発表標題 Gut microbiota in pulmonary hypertension
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takayuki Jujo Sanada, Yumiko Ikubo, Koji Hosomi, Akira Naito, Hiroki Shoji, Jonguk Park, Rika Suda, Ayumi Sekine, Ayako Shigeta, Seiichiro Sakao, Nobuhiro Tanabe, Kenji Mizuguchi, Jun Kunisawa, Koichiro Tatsumi
2. 発表標題 Altered gut microbiota in chronic thromboembolic pulmonary hypertension
3. 学会等名 ERS International Congress 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重城喬行
2. 発表標題 肺高血圧症は腸内細菌と関係する？：肺と腸のクロストーク
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井窪由美子
2. 発表標題 CTEPH患者における腸内細菌叢の変容(Dysbiosis)と病態との関連
3. 学会等名 第6回 日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	國澤 純  (Kunisawa Jun)  (80376615)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 ワクチン・アジュバント研究センター・センター長   (84420)	
研究分担者	坂尾 誠一郎  (Seiichiro Sakao)  (80431740)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授   (12501)	
研究分担者	重城 喬行  (Takayuki Jujo)  (90736422)	千葉大学・医薬基盤研究所 ワクチン・アジュバント研究センター・プロジェクト研究員   (84420)	

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
---------	---------