

令和 6 年 5 月 11 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16121

研究課題名（和文）代謝物が繋ぐ肺・腸・肝連関に着目した肺高血圧症の新規病態形成機構の解明

研究課題名（英文）Novel Pathogenesis of Pulmonary Hypertension Focusing on the Lung-Gut-Liver axis

研究代表者

浅野 遼太郎（Asano, Ryotaro）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：60827004

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：肺高血圧症（PH）は肺血管のリモデリングにより肺動脈圧上昇から右心不全に至る予後不良の難病であるが、その病態形成機構は明らかになっていない。我々はPH発症に環境因子（炎症、毒物、薬剤、ホルモンなど）が必要であることから腸内細菌叢に注目して研究を実施してきた。その中で肝臓を介して肺動脈に至る腸内細菌由来代謝物がPH病態形成に重要である実験結果を得た。腸内細菌代謝物によって肺の免疫細胞が活性化し、病態促進に関わっていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により肺動脈性肺高血圧症（PAH）病態形成の鍵が腸内細菌由来代謝物である可能性を見出した。門脈圧亢進に関連したPH（PoPH）を含むPAHは厚労省指定の特定疾患であり、本研究結果により腸内細菌叢を標的とした新しい治療法開発に繋がれば非常に社会的意義は大きい。またPAH発症の前段階に環境因子としての腸内細菌叢変容が先行して存在している可能性もある。今後発症前の検体を集積し解析を進めれば発症予防にもつなげられる可能性もある。

研究成果の概要（英文）：Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a serious disease that leads to elevated pulmonary arterial pressure due to vascular remodeling, and eventually results in heart failure. The mechanisms behind the disease are not yet clear. Our research has focused on the role of environmental factors such as inflammation, toxins, drugs, and hormones, and particularly on the gut microbiome. We have found that metabolites derived from gut flora, passing through the liver to the pulmonary arteries, are crucial in the development of PAH. These metabolites activate immune cells in the lungs, contributing to the progression of the disease.

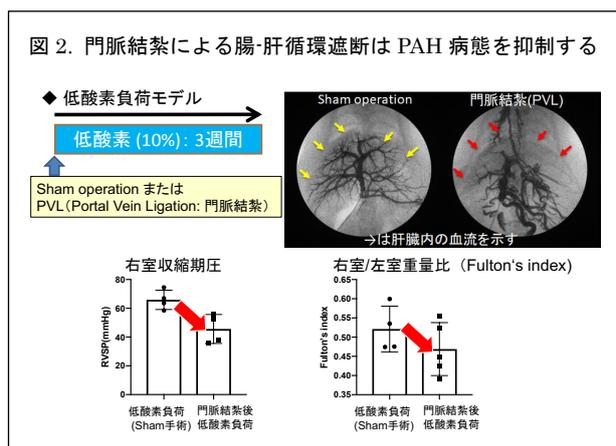
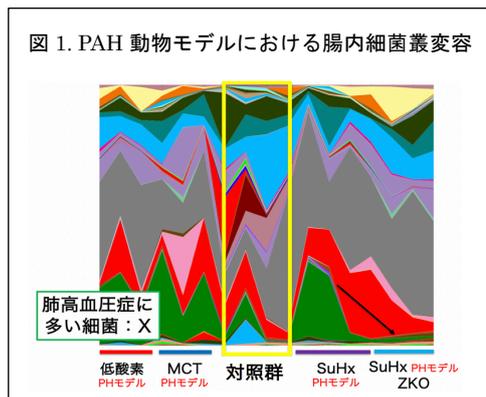
研究分野：循環器内科学

キーワード：肺高血圧症 門脈圧亢進症 メタボローム解析 メタゲノム解析

### 1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary arterial hypertension; PAH) は原因不明の機序で肺動脈にリモデリングを生じ、右心不全から死に至る難病である。中でも「門脈圧亢進に関連した肺動脈性肺高血圧症(PoPH)」は特に治療抵抗性で予後不良の難病であるが、その病態は不明である。研究代表者は、PAH 患者の診療と PAH 動物モデルを用いた基礎的研究背景から、PAH 病態形成における炎症や化学物質の役割に注目して研究を行ってきた。

肺高血圧症モデルラットを用いた検討で、モノクロタリン (MCT) 負荷、低酸素負荷、重症 PAH モデルである SU5416/低酸素/正酸素 (SuHx) 負荷ラットという 3 系統の異なるモデルにおいて、対照群と比較して特定の腸内細菌が顕著に増加するなど、腸内細菌叢の構成が大きく変化 (Dysbiosis) していることを見出してきた (図 1)。また抗生剤経口投与により腸内細菌叢を殲滅させると PAH 病態が改善すること、さらに肝臓での代謝の影響を見るため腸管で吸収された物質を直接肝臓に輸送されないように門脈結紮したラットを作製し低酸素負荷による肺高血圧症誘導をかけると、PAH 病態が大幅に減弱するという結果を得てきた (図 2)。以上から、腸内細菌由来代謝物は肝臓を介して肺動脈リモデリングに寄与し、特に PoPH でその傾向が強いのではないかと考えるに至った。



### 2. 研究の目的

研究代表者は、動物モデルとヒトでの予備的な検討の結果、変容した腸内細菌叢に由来する何らかの代謝物が肝臓を介して PAH 病態に寄与する可能性があると考えられた。そこで本研究では、①PoPH 患者を中心とした PAH 患者の腸内細菌叢解析(メタゲノム解析)によって PoPH 患者に特徴的な腸内細菌叢変容を明らかにすること、②PAH 病態 (特に PoPH 病態) を促進する腸内細菌叢由来代謝物を探索することを目的とした。

### 3. 研究の方法

以下の手順で本研究を実施した。

- ①健常者及び PoPH 患者を中心とした PAH 患者の臨床サンプル (便や血液) についてできるだけ多検体を集積する。
- ②便検体を用いたメタゲノム解析により腸内細菌叢解析を行う。
- ③ルシフェラーゼアッセイやメタボローム解析を用いて、PAH 病態を促進する可能性のある候補代謝物を探索する。
- ④動物実験を用いて候補代謝物の検証を行う。

#### 4. 研究成果

まず、健常者及び PoPH 患者を中心とした PAH 患者の臨床サンプル（便や血液）集積を進めた。研究開始時点で健常者約 80 名、PAH 患者約 60 名の臨床サンプルの集積が完了していたが PoPH 患者は少数例であった。国立循環器病研究センター・肺循環科で診療する PAH 患者の中で PoPH は全体の 5%程度であり、単施設での集積が困難と考えられた。そこで近隣医療機関（吹田市民病院など）にリクルート活動を行なって臨床研究を促進し、PoPH 患者 15 例の登録を完了することができた。

続いて集積された健常者及び PAH 患者の便サンプルを用いてメタゲノム解析を実施した。その結果 PAH 患者では健常者と比較して腸内細菌叢変容が認められ、特に *Streptococcus* 属や *Rothia* 属、*Veillonella* 属などの口腔内常在菌が PAH 患者の腸内に定着し予後不良と関連することを見出した（図 3）。

中でも PoPH 患者の腸内細菌叢に注目すると、他の PAH サブグループと同様の腸内細菌叢変化を示す一方で、*Dorea* 属や *Blautia* 属細菌が増加していることがわかった（図 4）。これらの細菌は、宿主側の炎症性サイトカイン産生を促してインスリン抵抗性と相関することが報告されており、PoPH 病態においても同様の役割を果たす可能性が示唆された。

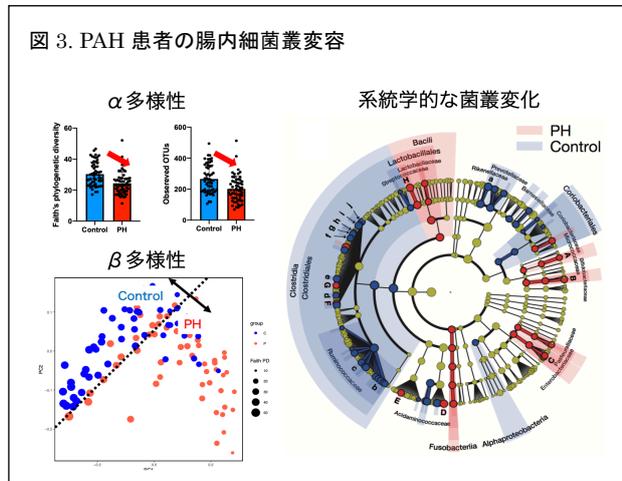


図 3. PAH 患者の腸内細菌叢変容

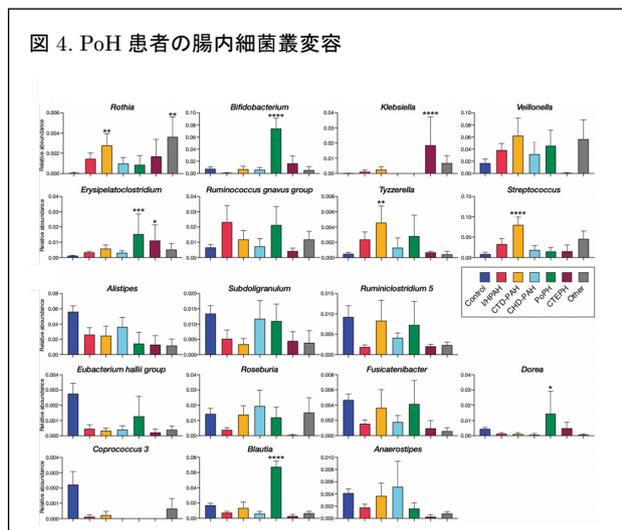
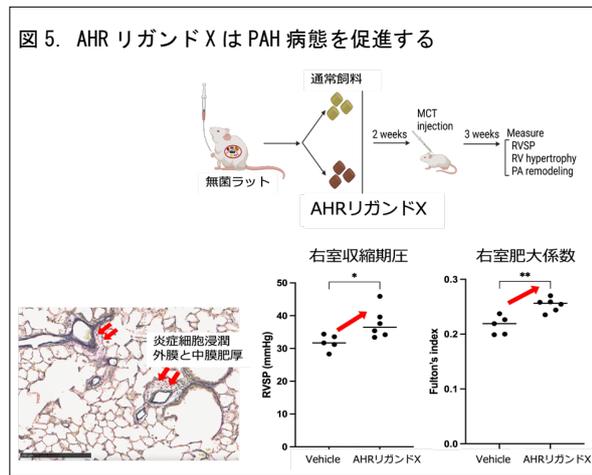


図 4. PoH 患者の腸内細菌叢変容

続いて腸内細菌叢由来代謝物の検討を進めた。研究代表者らは、PAH 病態形成に外的化学物質として芳香属炭化水素受容体(Aryl Hydrocarbon Receptor: AHR)リガンドが重要であることを報告した (Masaki T, et al. *Proc Natl Acad Sci.* 2021)。この AHR リガンドは、インドール化合物を代表としてトリプトファンから腸内細菌由来に代謝され産生される。そこで AHR ルシフェラーゼアッセイを便サンプル用に改変し測定したところ、PoPH 患者を代表として PAH 患者全般で AHR 活性が上昇していることがわかった。さらに AHR リガンドを探索するために、液体クロマトグラフィを用いてターゲットメタボローム解析を行なったところ、PAH 病態を促進する可能性のある候補代謝物 X を同定することができた。AHR リガンド X は、腸内細菌によって様々な下流の AHR リガンドに変換されるインドール化合物の根源となる分子であり、AHR シグナルを強く亢進し PAH 病態を形成する重要な役割を果たすと考えられた。

そこで PAH モデル動物に対して AHR リガンド X を負荷する実験を行なった。AHR リガンド X は前述のように腸内細菌によって代謝されるため、AHR リガンド X 自体の病態促進作用を明らかにするために無菌ラットを用いることとした。無菌ラットをアイソレーター内で無菌的に飼育し、AHR リガンド X を経口投与してモノクロタリンで PAH を誘導した。その結果、AHR リガンド X 投与ラットは、PAH 病態が重症化し肺動脈周囲に強い炎症細胞浸潤を誘導することがわかった (図 5)。

以上から、PoPH 患者では PAH で共通する腸内細菌叢変容をもつ一方で特徴的な腸内細菌叢変容を呈し、腸内細菌叢変容は AHR リガンド産生を介して PAH 病態を促進することを明らかにした。これらの成果から、PoPH 患者をはじめとした PAH 患者の腸内細菌叢を標的とした新しい治療法開発につながる可能性がある。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1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 Yaku Ai, Inagaki Tadakatsu, Asano Ryotaro, Okazawa Makoto, Ogo Takeshi, Nakaoka Yoshikazu, Takeuchi Osamu	4. 巻 146
2. 論文標題 Regnase-1 Prevents Pulmonary Arterial Hypertension Through mRNA Degradation of Interleukin-6 and Platelet-Derived Growth Factor in Alveolar Macrophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 1006 ~ 1022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.122.059435	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 Manabe Yusuke, Ishibashi Tomohiko, Asano Ryotaro, Ogo Takeshi, Kumanogoh Atsushi, Nakaoka Yoshikazu	4. 巻 25
2. 論文標題 Gut dysbiosis is associated with aortic aneurysm formation and progression in Takayasu arteritis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 e002054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-023-03031-9	査読の有無 無
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 Suzuki Sho, Asano Ryotaro, Aoki Tatsuo, Nakayama Sayuri, Ueda Jin, Tsuji Akihiro, Noguchi Teruo, Ogo Takeshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Prognostic impact of follow-up pulmonary vascular resistance in pulmonary arterial hypertension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Open Heart	6. 最初と最後の頁 e002054 ~ e002054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/openhrt-2022-002054	査読の有無 無
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 Waddingham Mark T., Tsuchimochi Hirotsugu, Sonobe Takashi, Asano Ryotaro, Jin Huiling, Ow Connie P. C., Schwenke Daryl O., Katare Rajesh, Aoyama Kohki, Umetani Keiji, Hoshino Masato, Uesugi Kentaro, Shirai Mikiyasu, Ogo Takeshi, Pearson James T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Using Synchrotron Radiation Imaging Techniques to Elucidate the Actions of Hexarelin in the Heart of Small Animal Models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 766818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2021.766818	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryotaro Asano
2. 発表標題 Gut dysbiosis in the pathogenesis of inflammatory vascular disease.
3. 学会等名 第88回日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ryotaro Asano
2. 発表標題 Gut Dysbiosis with AHR Ligand Production Drives Progression of Pulmonary Hypertension.
3. 学会等名 Asia Australia Vascular Biology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浅野遼太郎
2. 発表標題 肺高血圧症患者における右室線維化の非侵襲的検出方法の開発
3. 学会等名 第8回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 肺高血圧症の予防又は治療薬、及び肺高血圧症の罹患の有無又は肺高血圧 症の重症度の検査方法	発明者 中岡良和、岡澤慎、 浅野遼太郎	権利者 国立循環器病研究センター
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-202282	出願年 2023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
---------	---------