

## 腸から動脈硬化を予防する ～腸内細菌叢と動脈硬化性疾患との関わり～

山下 智也

神戸大学医学部附属病院循環器内科

Prevention of Atherosclerosis Via Modulating Intestinal Immunity and Metabolism  
～Gut Bacterial Flora and Atherosclerotic Cardiovascular Diseases～

Tomoya Yamashita

Division of Cardiovascular Medicine, Department of Internal Medicine, Kobe University Hospital

(日本医科大学医学会雑誌 2017; 13: 205-209)

**Key words:** atherosclerosis, regulatory T cell, gut microbiota, TMAO, Enterotype

### はじめに

心筋梗塞や脳梗塞を代表とする動脈硬化性疾患による死亡は、日本人では、癌について死亡原因の第2位である。高齢化による動脈硬化性疾患増加の問題と、さらに冠動脈疾患のみならず脳・頸動脈狭窄や下肢閉塞性動脈硬化症の合併と重症患者の増加が課題となっている。動脈硬化性疾患の予防のために高血圧・脂質異常症・糖尿病など生活習慣病の治療が行われており、治療薬の開発により、それら危険因子のコントロールは比較的容易になってきたが、必ずしも心血管イベントの抑制が有効にできないこと、そして医療費高騰の問題が挙げられる。

近年、動脈硬化は血管の慢性炎症性疾患であるとされ、炎症・免疫反応の病態への関与が示されている<sup>12</sup>。動脈硬化巣には、マクロファージやTリンパ球などの炎症細胞が存在し、炎症性サイトカインによる血管細胞や炎症細胞の活性化が病態の進行に重要な役割を果たしていると考えられている。その概念を基に、炎症・免疫反応の一部が、動脈硬化のバイオマーカーや新たな治療標的として注目されている。われわれは、動脈硬化の抗炎症免疫療法の研究を進めるなか

で、「動脈硬化を腸管免疫修飾により予防する」という概念を提唱した<sup>3-5</sup>。そして、その腸管免疫に強く影響する腸内細菌に注目するようになった。本稿では、腸管免疫や腸内細菌叢に注目した動脈硬化研究を紹介して、近未来の臨床への応用を展望したい。

### 1. 腸管からの免疫制御で動脈硬化を予防する

われわれの研究室では、血管の慢性炎症性疾患と考えられている動脈硬化を、抗炎症・免疫調節により予防する取り組みを行っている。その中で、「腸から免疫修飾により動脈硬化を予防できる」可能性をいち早く示した(図1)。腸管は身体の中で最大の免疫臓器であり、常に生体外から入ってくる経口摂取食物抗原や共生する腸内常在細菌にさらされている。しかし、常在する非自己抗原に対しては過剰な免疫反応を起こさない免疫寛容を誘導・維持している。この経口免疫寛容の維持に、免疫抑制性Tリンパ球である制御性T細胞(Treg; regulatory T cell)が重要な役割を担っている<sup>6</sup>。われわれは、この免疫寛容に関わる細胞と動脈硬化の抑制機序に関わる細胞群の共通点に注目し、腸管からこれらの免疫細胞の制御を行うことで、動脈硬化が抑制できるのではないか?という仮説を立

Correspondence to Tomoya Yamashita, MD, PhD, Division of Cardiovascular Medicine, Department of Internal Medicine, Kobe University Hospital, 7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan

E-mail: tomoya@med.kobe-u.ac.jp

Journal Website (<http://www2.nms.ac.jp/jmanms/>)

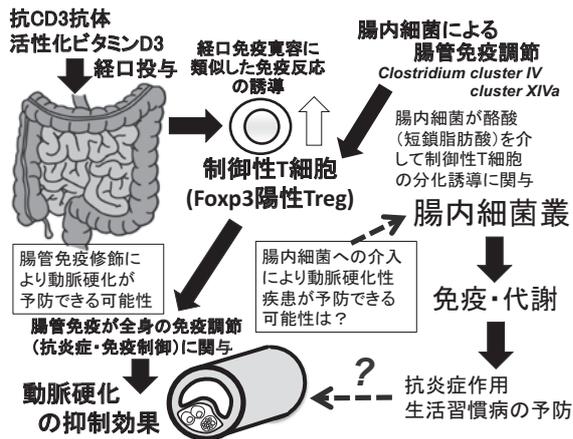


図1 腸から動脈硬化が予防できる可能性がある。経口で投与した物質・薬剤により、腸管免疫を修飾することで動脈硬化の予防が実現できる可能性がある。腸内細菌と腸管での免疫細胞の分化との強い関連が証明されている。クロストリジウム菌クラスターIVとXIVaは、短鎖脂肪酸である酪酸の産生を介して、大腸での制御性T細胞の分化に大きな影響を与えることが分かっている。

てた。

抗体医薬の抗CD3抗体を動脈硬化モデルマウス(apoE-KOマウス；アポリポ蛋白E遺伝子欠損マウス)に少量経口投与すると、腸間膜リンパ節にTregが増加し、脾臓や動脈硬化巣内でも、その数が増加して動脈硬化抑制効果を示した<sup>3</sup>(図1)。また、免疫修飾物質としての報告もある活性化ビタミンD3を経口投与すると、マウスの腸管においてTregの存在比率が上昇し、動脈硬化抑制効果が認められた<sup>4</sup>(図1)。この2つの研究では、経口で投与した物質が主に腸管で働き、経口免疫寛容と同様の免疫反応を誘導したことで、全身の免疫反応にも影響を与え、結果として動脈硬化が抑制できた。ほかの研究室からの報告でも、Tregの移入による動脈硬化抑制と欠失による悪化が報告されており<sup>7-9</sup>、Tregの動脈硬化形成における役割をさらに検討することで、新たな動脈硬化の抗炎症免疫療法につながるのではないかと考えている。

## 2. 腸内細菌による腸管免疫の制御

無菌(germ free)マウスでは、抗菌ペプチドの産生低下・Tリンパ球の数の減少と活性化低下・腸粘膜におけるIgAの産生障害などが報告されている<sup>10</sup>。同じく無菌マウスの実験で大腸のTregが劇的に減少していることが分かり、その無菌マウスに常在腸内細菌が存在する普通のマウスの糞便を投与すると、腸内細菌が繁殖してTregの数が普通のマウスと同程度にま

で回復した。その腸内細菌の関与を検討した結果、クロストリジウム属サブクラスターIVとXIVaの菌株を定着させるとTregが増加することが証明された。さらに、このTregの増加(Tregの分化誘導)にクロストリジウム菌の産生する短鎖脂肪酸の酪酸が関与していることが示された(図1)<sup>11,12</sup>。すなわち、このクロストリジウム属の菌種を増減させることで、Tregの増加や減少を少なくとも腸管においてコントロールできる可能性があるわけである。

以上の研究成果により、腸内に存在する細菌の属種の違いは、そのまま腸管免疫調節の違いになる可能性が高い。そして、われわれの研究と重ねて考えると、腸内細菌が腸管免疫を介して、動脈硬化の形成に影響するのではないか？腸内細菌が新たな治療標的になるのではないか？という仮説が立てられる。

## 3. 腸内細菌と動脈硬化の関係

飼育されたマウスでも、施設や環境によって常在腸内細菌叢に差があることが知られている。今まで無菌apoE-KOマウスの実験で、腸の常在細菌が動脈硬化にどのような影響を与えるのかが検討された。無菌で動脈硬化は悪化する、変化がない、抑制されるという報告があり、一定しない結果である<sup>13-15</sup>。これらは、元々存在している優位な常在細菌叢が施設によって異なることが原因である可能性があり、その腸内細菌叢(動脈硬化を進展させやすい菌が優位なのか、抑制作用を持つ菌が多いのか)の違いや、細菌の生体機能への影響の相違が関与していると予想できる。すなわち、ヒトでも常在腸内細菌叢の相違が、動脈硬化の成り易さと成り難さという個人差に関わっていることが想定され、新たなバイオマーカーとしての可能性と治療ターゲットとしての期待が持てる。

動脈硬化予防のために、腸内細菌叢を変化させる方法はいくつか想定される。抗生物質投与により、腸内細菌がどのように変化し、動脈硬化形成にどのような影響を与えるのかということ動物モデルで調査した。われわれの実験結果では、投与抗生物質の種類や組み合わせにより動脈硬化へ与える影響が異なることが分かってきた。特定の腸内細菌の増減、免疫機能と代謝機能への影響が関与することも分かってきており、その機序の解明が課題である。

## 4. 動脈硬化に腸内細菌が関与するというエビデンス

腸内細菌が代謝に関与するホスファチジルコリン

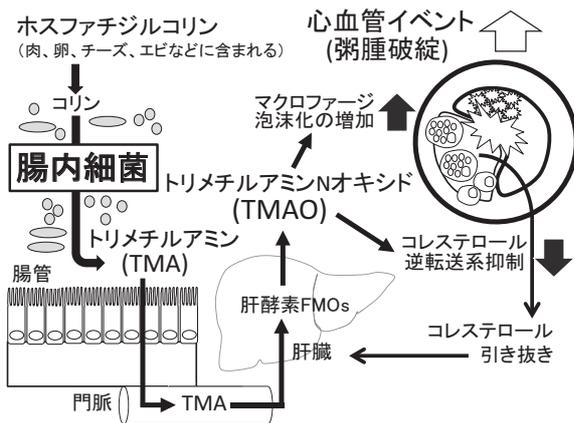


図2 腸内細菌が動脈硬化性疾患の悪化に関与している。腸内細菌によるホスファチジルコリン代謝産物が、マクロファージの泡沫化を促進したり、コレステロールの末梢からの引き抜き機構（逆転送系）を抑制することで、動脈硬化の悪化に関与し、心血管イベントに関連することが示されている。

(phosphatidylcholine ; PC) 代謝物が心血管病の悪化に関与することが報告された (図 2)<sup>16,17</sup>。臨床研究で、PC 代謝物 TMAO (trimethylamine N-oxide) の血中濃度が高いことが、心血管イベントの発症増加に関連することが示された。PC は、卵、牛乳、チーズ、牛肉、甲殻類などに含まれており、消化管内で代謝されコリン (choline) となり、さらに腸内細菌がコリンを代謝することで TMA (trimethyl amine) となる。TMA は腸管から吸収されて、肝臓において酵素的に代謝され、TMAO となる。これらの事実に基づき以下の動物実験を行って TMAO と動脈硬化形成との因果関係を証明している。apoE-KO マウスに PC 含有食を投与すると、血中脂質には影響を与えずに血中 TMAO の濃度上昇を経て、普通食投与コントロール群に比較して動脈硬化巣面積が増加した。そして、同時に広域スペクトラム抗生物質を投与して腸内細菌をきわめて少なくすると、PC 投与による血中 TMAO の増加は抑制されて、動脈硬化の悪化がキャンセルされた。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マクロファージの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。さらに、TMAO は動脈硬化巣を含む末梢組織から肝臓へのコレステロール逆転送系を抑制する効果もあるようである。すなわちこれらの実験結果により、腸内細菌は TMAO の産生という代謝機序を介して、動脈硬化悪化に関与していることが示された (図 2)。

### 5. 腸内細菌叢の検査

腸内細菌の同定と言え、便培養を思い浮かべるが、腸内細菌の半分以上は培養困難菌である。培養法は、ある菌が存在するか否かの判定には有効だが、網羅的解析は不可能である。腸内フローラの解析は分子生物学的・遺伝子工学的解析技術の発展と DNA シーケンサーの進歩により「腸内細菌メタゲノム解析」と呼ばれるような糞便から腸内細菌の DNA を抽出して解析することで、網羅的かつ詳細な分析ができるようになった<sup>18</sup>。複数の方法が開発されているが、比較的簡便にコストも考慮した方法としては、細菌の 16S リボゾーム (r) RNA 遺伝子の特異的なプライマーを用いて PCR で増幅し、次世代シーケンサーで解析する 16SrRNA 遺伝子ランダムシーケンス法が利用しやすい。さらに、その PCR アンプリコンを特定の制限酵素で処理して出来た DNA 断片の大きさや量の情報を分析して、細菌の門～目レベルの定量ができる方法 Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 法という簡易検査もある。ただし、糞便から腸内細菌 DNA を抽出して行う腸内細菌叢検査の問題点はいくつかあり、糞便採取の条件・糞便採取後の保存条件・DNA 抽出法・16SrRNA 遺伝子の PCR プライマー設定などの差異が結果の差となるのだが、その標準化が進んでおらず、採用する解析方法によって結果に差が生じて比較が困難である。

腸内細菌叢を調査して、疾患との関係を考えるときに、どのような状態であれば“腸内細菌叢の異常”と言えるのか？ということが不明である。異常がある限りは、正常の定義というものもあるべきであるが、“正常の腸内細菌叢”とはいかなるものなのか？という質問に対しての答えを、われわれは持っていない。この辺りを解決する手がかりとなるのは、ヒトの腸内フローラのタイプ Enterotype を明らかにし、“正常(標準)の腸内フローラタイプ”を同定することも出来ない<sup>19</sup>。ヒトの腸内フローラの型は、優位菌により 3 種類の Enterotype に分類できて、*Bacteroides* が優位な Enterotype I、*Prevotella* が優位な Enterotype II、*Ruminococcus* が優位な Enterotype III に分類された (図 3)。その後の報告では、必ずしもこの分類ですべてが処理できるわけではなさそうだが、こういう分類が完成すると、疾患を持つ患者の腸内フローラタイプの差異を容易に分類することが可能となり、疾患と特定のフローラの型や腸内細菌との関係を明らかにする研究がさらに進展する。

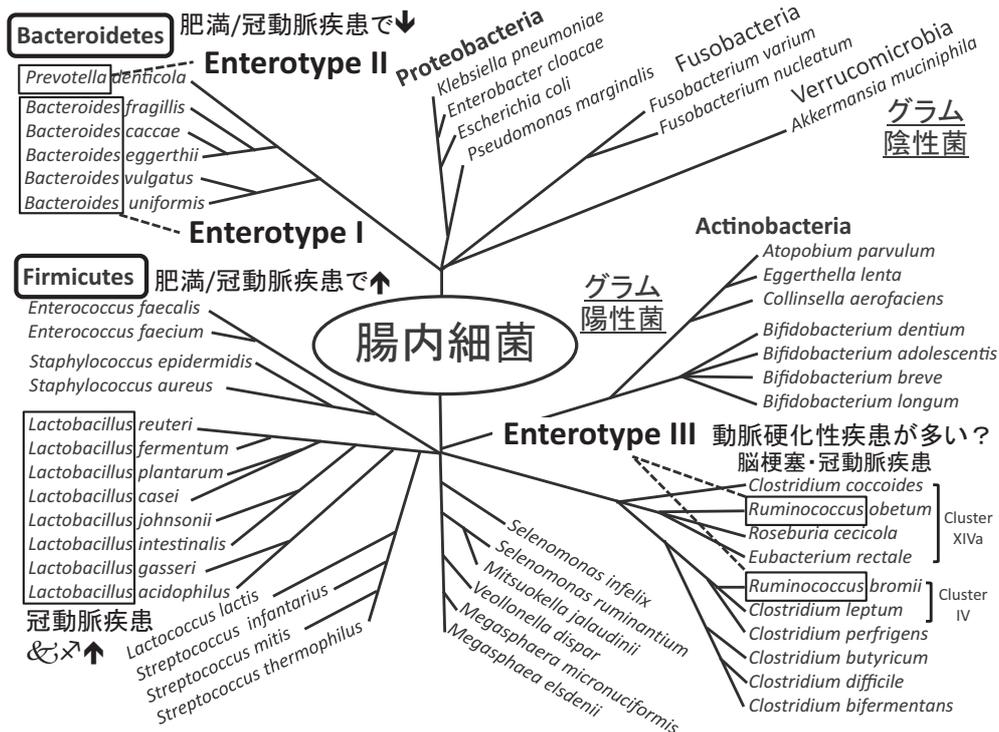


図3 代表的なヒト腸内細菌と肥満・動脈硬化性疾患発症との関係  
ヒト腸内細菌叢の分類表を示す。ヒト腸内細菌叢は、優位菌によりエンテロタイプ (Enterotype) I ~ III に分類され、疾患との関係が調査しやすくなった。腸内細菌叢と話題にした疾患発症との関連を示したが、今後はさらに多くの疾患との関連が報告されていくであろう。

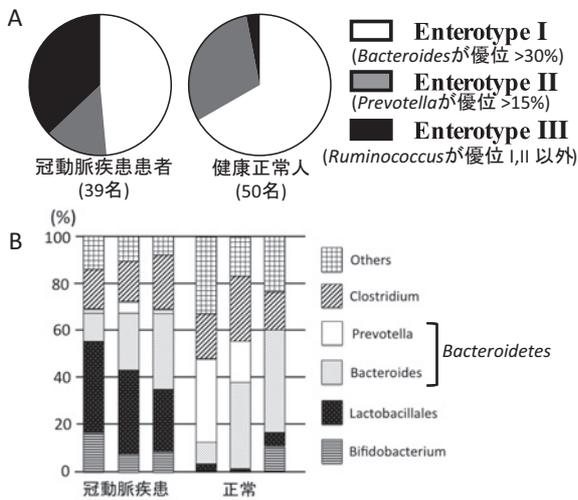


図4 冠動脈疾患患者における腸内細菌叢の特徴  
T-RFLP 法により解析した、冠動脈疾患患者群・正常健康者群における腸内細菌叢の違いを示す。A. Enterotype の相違 冠動脈疾患患者で Enterotype III の比率が高い特徴がある。B. 各群の代表例をそれぞれ3名ずつ示す。冠動脈疾患患者群にて Lactobacillales 目菌が増え、Bacteroidetes 門菌 (Bacteroides 属菌 + Prevotella 属菌) が減っている特徴が認められた。(文献 20 より改変)

ここ数年、世界的に腸内細菌を扱うベンチャー企業が数多く設立されており、日本でも複数が起業している。その中で、いくつかの企業が、腸内細菌叢の検査キットを発売しており、一般の人でもインターネット経由で購入可能である。いまだ、その報告書は、発表論文のデータを引用した解釈を掲載するだけで、医療に応用できるレベルではないが、人間ドックで利用する病院も現れている。臨床で比較的安価に実施できる腸内フローラ検査法が開発され、疾患と腸内フローラとの因果関係が証明されれば、保険承認される可能性は十分にある。

### 6. 動脈硬化性疾患に特徴的な腸内細菌叢があるのか？

われわれは、循環器内科病棟に入院される虚血性心疾患患者にご協力いただき、糞便の細菌叢の解析研究を T-RFLP 法を用いて行った。まずは、先に紹介した Enterotype について、冠動脈疾患患者と健康正常人の糞便に含まれる腸内細菌叢のタイプを分析したデータを図4に示す。健康者に比較して、冠動脈疾患患者に Enterotype III が多いことがわかった<sup>20</sup> (図4 A)。脳梗塞・頸動脈狭窄患者の研究でも、Enterotype

III に頸動脈硬化が多い傾向があることが示されている (図 3)<sup>21</sup>。Enterotype III が、動脈硬化になり易い要因の一つである可能性があり、解明する意義があるかもしれない。

われわれの使用した T-RFLP 法では、腸内細菌を約 10 種類の門～目に分類して、それぞれの存在比率が分かる。正常者に比較して、冠動脈疾患患者ではラクトバシラレス (*Lactobacillales*) 目が増加し、バクテロイデテス (*Bacteroidetes*) 門が減少することがわかった<sup>20</sup> (図 4B)。単純に考えると、ラクトバシラレス菌群の中に、冠動脈疾患を悪化させる菌が含まれていることになるが、もちろんこの結果だけでは因果関係までは解明できない。さらに詳細な解析を進めるために、16SrRNA 遺伝子ランダムシーケンス法による科～種レベルの解析を行っている。中国からの報告で、冠動脈疾患患者で *Bacteroidetes* 門菌が減少し、*Firmicutes* 門菌が増加するという、肥満の腸内フローラ (図 3) と同じ報告が出されており、われわれの結果に類似する結果であった<sup>22</sup>。

#### まとめ

世界的に腸内フローラと疾患発症との関連性を調査する研究が進められており、腸内細菌の代謝・免疫に与える影響も次第に明らかになってきている。このようなタイプの腸内フローラの人は、このような疾患になりやすい (なり難い) というような報告が益々増加していくことが予想される。われわれも、「腸内フローラと循環器疾患との関連性」を調査する研究を現在進めている。腸内細菌が疾患特異的に病態に関連していることが証明できれば「胃癌予防を目的としたヘリコバクター・ピロリ菌の除菌」のような腸内細菌に治療的介入を行う動脈硬化性疾患の予防法が実現できるかもしれない。この分野の研究が進展し、一日も早く臨床において患者貢献できるよう努力したい。

#### 文献

- Libby P, Lichtman AH, Hansson GK: Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans. *Immunity* 2013; 38: 1092-1104.
- Hansson GK, Hermansson A: The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 2011; 12: 204-212.
- Sasaki N, Yamashita T, Takeda M, et al: Oral anti-CD3 antibody treatment induces regulatory T cells and inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Circulation* 2009; 120: 1996-2005.
- Takeda M, Yamashita T, Sasaki N, et al: Oral administration of an active form of vitamin D3 (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 2495-2503.
- Nakajima K, Yamashita T, Kita T, et al: Orally administered eicosapentaenoic acid induces rapid regression of atherosclerosis via modulating the phenotype of dendritic cells in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 1963-1972.
- Tsuji NM, Kosaka A: Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells. *Trends Immunol* 2008; 29: 532-540.
- Mallat Z, Gojova A, Brun V, et al: Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2003; 108: 1232-1237.
- Mor A, Planer D, Luboshits G, et al: Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 893-900.
- Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, et al: Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 2006; 12: 178-180.
- Kamada N, Seo SU, Chen GY, et al: Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 321-335.
- Atarashi K, Tanoue T, Shima T, et al: Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 2011; 331: 337-341.
- Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al: Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 2013; 504: 446-450.
- Wright SD, Burton C, Hernandez M, et al: Infectious agents are not necessary for murine atherogenesis. *J Exp Med* 2000; 191: 1437-1442.
- Stepankova R, Tonar Z, Bartova J, et al: Absence of microbiota (germ-free conditions) accelerates the atherosclerosis in ApoE-deficient mice fed standard low cholesterol diet. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17: 796-804.
- Kasahara K, Tanoue T, Yamashita T, et al: Commensal bacteria at the crossroad between cholesterol homeostasis and chronic inflammation in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2017; 58: 519-528.
- Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al: Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011; 472: 57-63.
- Tang WH, Wang Z, Levison BS, et al: Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2013; 368: 1575-1584.
- 相馬勇志ほか: フローラ解析. 医科プロバイオティクス学 (古賀泰裕編), 2009; pp 34-93, シナジー.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473: 174-180.
- Emoto T, Yamashita T, Sasaki N, et al: Analysis of Gut Microbiota in Coronary Artery Disease Patients: a Possible Link between Gut Microbiota and Coronary Artery Disease. *J Atheroscler Thromb* 2016; 23: 908-921.
- Karlsson FH, Fak F, Nookaew I, et al: Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun* 2012; 3: 1245.
- Cui L, Zhao T, Hu H, et al: Association study of gut flora in coronary heart disease through high-throughput sequencing. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 3796359.

(受付: 2017年7月27日)

(受理: 2017年8月9日)