Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Structural differences in bacterial lipopolysaccharides determine atherosclerotic plaque progression by regulating the accumulation of neutrophils

斉藤，克寛

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2022-09-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第8481号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482229

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Structural differences in bacterial lipopolysaccharides determine atherosclerotic plaque progression by regulating the accumulation of neutrophils

細菌リポ多糖の構造的差異が好中球の集積の制御に関わり
動脈硬化巣の進展を規定する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
循環器内科学
（指導教員：平田　健一 教授）

斉　藤　　克　寛

【背景】

我々は、腸内細菌叢と循環器疾患の関連調査研究を継続して行っている。腸内細菌の中でも、グラム陰性桿菌はリポ多糖（LPS）を保持しており、その血中移行はエンドトキシン血症を引き起こし、炎症関連病態の増悪に関与する。高脂肪食摂取は、「メタボリックエンドトキセミア」と呼称される軽微であるが持続的な血中 LPS 活性の上昇を引き起こし、慢性炎症を介した動脈硬化を含む生活習慣病の病態悪化への関与が想定されている。

我々の臨床研究にて、冠動脈疾患患者においてグラム陰性菌の *Bacteroides* 属菌が減少し、その中の *Bacteroides dorei* と *Bacteroides vulgatus* の 2 菌種が有意に減少していることが明らかとなった。さらに、ヒト糞便中の *Bacteroides* 属菌の存在量と LPS 活性の間に有意な負の相関があることがわかり、*Bacteroides* 2 菌種を抗炎症的な細菌製剤として利用するための研究開発を進めている。

LPS の Lipid A 部分は、Toll 様受容体 4 (TLR4) のリガンドであり、そのアシル鎖の数は免疫活性の主要な決定因子であることが分かってきた。興味深いことに、我々の見だした *Bacteroides* 2 菌種の LPS (B. LPS) は、Lipid A のアシル鎖が 4 本または 5 本であり、強い炎症活性を持つ 6 本鎖大腸菌由来 LPS (E. LPS) に比べて、低い免疫活性しか持たない。

エンドトキシン血症と動脈硬化に関する研究にて、LPS の免疫細胞活性化を介した動脈硬化増悪が想定されるが、その詳細な機序は解明されていない。また、細菌由来 LPS の Lipid A の構造差が、動脈硬化プラーク形成にどのように影響するかを示した報告はない。

【目的】

本研究の目的は、異なる構造の LPS が、動脈硬化形成に及ぼす影響の差異を検証し、生体内で LPS が動脈硬化を進展・増悪させる機序を解明することである。

【方法】

E. LPS は市販製品を購入し、B.LPS は、京都大学農学研究科の共同研究者に抽出・精製いただき入手した。8 週齢の動脈硬化モデル（アポリポ蛋白 E 遺伝子欠損；*Apoe*$^{-/-}$）マウスに高脂肪含有食を 6 週間投与して、動脈硬化を評価した。2mg/kg（計 200μl）の E. LPS、B. LPS および同量の LPS フリー水を週 1 回（計 6 回）腹腔内投与した 3 群の差異を検証した。また、LPS 単回投与後の動脈硬化プラークへの影響を調査するため、動脈硬化が進展した *Apoe*$^{-/-}$ マウスに、解析の 3 日前または 7 日前に E. LPS、B. LPS または LPS フリー水を 1 回だけ腹腔内投与して、病巣を解析した。大動脈基部病変のオイルレッド O 染色、免疫蛍光染色によって動脈硬化巣の定量的評価と免疫細胞浸潤の評価を行った。

臨床のヒト冠動脈動脈硬化巣サンプルの評価を行うため、方向性冠動脈粥腫切除術（DCA）によって得られたプラーク病変に対して、組織免疫染色を行い、マウスで認められる現象が、ヒトでも起こっているのかを検証した。

【結果】

E. LPS の 2 mg/kg 腹腔内投与後に、血中 LPS 活性の有意な上昇が認められたが、同量の B. LPS 投与では上昇は認められなかった。*Apoe-/-*マウスに、各 LPS を週 1 回（計 6 回）投与した実験では、E. LPS 投与群で動脈硬化巣面積が有意に増加したが、B. LPS 投与群では増加はなかった。プラーク切片の免疫蛍光染色にて、CD68 抗体（マクロファージのマーカー）の陽性面積は各群で有意な差を認めないが、Ly6G 抗体（好中球のマーカー）の陽性面積は E. LPS 投与群で有意に増加した。さらに、好中球細胞外トラップ（NETs）のマーカーであるシトルリン化ヒストン-3（Cit-H3）抗体を用いた染色を行うと、Ly6G 陽性領域内に Cit-H3 陽性領域が確認され、プラーク内での NETs 形成が示された。そして、E. LPS 投与群での NETs 形成は、他群に比べて有意に増加した。大動脈組織において、好中球の動員や活性化に関与する代表的なケモカインの mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で測定したところ、E. LPS 投与群において Ccl5 の発現が有意に多かった。さらに、E. LPS 投与群では、ELISA 法で測定した血漿 CCL5 レベルも、B. LPS 投与群より有意に高値であった。

次に、プラークにおける好中球集積と動脈硬化増悪の因果関係と詳細な機序の調査のために、マウスへ LPS を単回投与する実験を行った。投与 3 日目、7 日目ともにマクロファージ面積に差は見られなかったが、E. LPS 投与後 3 日目に好中球面積が増加し、その後 7 日目に減少した。また、E. LPS 投与群では、7 日目に NETs と、IL-1β陽性面積の有意な増加を認め、これらの共染色により、IL-1β は好中球と NETs の周辺で多く存在することがわかった。B. LPS 投与群ではこれらの変化は認められなかった。

最後に、DCA で治療した急性冠症候群（ACS）患者から採取したプラーク病変の組織免疫染色での解析を行った。ヒト冠動脈プラークにおいても、マクロファージの存在する領域に好中球が集積し、同領域に Cit-H3 陽性細胞も観察された。さらに、NETs 形成部位の近辺に IL-1β陽性領域が存在することが観察された。

【論考】

本研究では、各細菌由来 LPS の Lipid A 部分の構造差が原因と考えられる炎症活性の差異が、エンドトキシン血症とその後の免疫反応や動脈硬化プラーク形成に寄与していることを明らかにした。我々のデータは、エンドトキシン血症および動脈硬化進展における腸内細菌 LPS の役割や作用機序について、その構造差異の重要性に関して、新たな見解を与えるものである。

過去の報告で、極めて低用量の E. LPS 投与でも動脈硬化を増悪させることが報告されているが、4, 5 本鎖アシル鎖の Lipid A を持つ LPS の動脈硬化への影響は解明されていなかった。今回、B. LPS 投与でエンドトキシン血症が誘発されず、動脈硬化を有意に悪化させないことを確認した。一方、6 本鎖アシル鎖の Lipid A を持つ E. LPS 投与群では、エンドトキシン血症が強く誘発され、プラーク中の好中球増加と、好中球の動員・接着に関わるケモカイン遺伝子（Ccl5）の発現レベル上昇、血漿中 CCL5 濃度の上昇を認めた。また、E.

LPS 投与 3 日後でプラーク病巣に好中球の集積が認められ、7 日目に NETs 形成と IL-1β の産生が確認されるという今回の結果は、集積した好中球によって形成された NETs が、マクロファージを活性化してサイトカイン産生を促進するという過去の報告と一致し、E. LPS 投与によりプラーク内のマクロファージが増加しないにも関わらず、プラーク病変が悪化した理由を説明し得るものである。さらに、このエンドトキシン血症による好中球の蓄積と NETs 形成は、時間単位の速度で観察されるのではなく、比較的長時間（日単位）で起こることが本研究で明らかになった。この結果から、LPS による直接的な好中球への刺激によって NETs が形成されるのではなく、LPS 刺激によって血管内皮細胞や血小板などから産生される、CCL5 のような好中球関連ケモカインを介して好中球が集積し、NETs を形成することでさらなる炎症の起点となることを考えた。

最後に、DCA によって得られた ACS 患者のヒト冠動脈プラークにおいて、NET 形成と IL-1β の産生が観察された。マウスにおいて NETs 由来物質であるヒストンがプラークの不安定化を促進することが示されており、ヒトにおいては、血中 LPS 値や NETs マーカーが、ACS 患者で非 ACS 患者や対照群より高いことが報告されている。これらのことから、エンドトキシン血症や NETs 形成の抑制は、動脈硬化巣の形成抑制だけでなく、ACS 発症の抑制にも寄与する可能性が想定される。さらに、腸内細菌由来の LPS は、心血管疾患だけでなく他の炎症性疾患との関連も示唆され、本研究で得られた知見は、腸内細菌への介入で炎症を抑制する新たな治療戦略として、他疾患の患者へも貢献できる可能性があると考える。

【結論】

強い炎症活性を持つ LPS は、動脈硬化巣への好中球の集積とその後の NETs 形成を誘導して、動脈硬化の増悪に関わることを示した。B. LPS は、E. LPS が持つプラークへの好中球集積および NETs 形成作用を示さず、動脈硬化増悪を引き起こさないことが示された。臨床的には、腸内細菌叢中の *Bacteroides* 属の存在量を優位にすることで、エンドトキシン血症の軽減を介する動脈硬化予防法への応用を検討したい。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3224 号	氏　名	斉藤　克寛
論文題目 Title of Dissertation	細菌リポ多糖の構造的差異が好中球の集積の制御に関わり動脈硬化巣の進展を規定する Structural differences in bacterial lipopolysaccharides determine atherosclerotic plaque progression by regulating the accumulation of neutrophils		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	児玉裕三 古屋敷智之 小川琢	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【背景】

腸内細菌のうちグラム陰性桿菌はリポ多糖（LPS）を保持しており、その血中移行はエンドトキシン血症を引き起こし、炎症関連病態の増悪に関与する。LPS の Lipid A 部分は、Toll 様受容体 4（TLR4）のリガンドであり、そのアシル鎖の数は免疫活性の主要な決定因子であることが分かってきた。これまでに、冠動脈疾患患者においてグラム陰性菌の *Bacteroides* 属菌が減少し、その中の *Bacteroides dorei* と *Bacteroides vulgatus* の 2 菌種が有意に減少していることが明らかとなった。興味深いことに *Bacteroides* 2 菌種の LPS（B. LPS）は、Lipid A のアシル鎖が 4 本または 5 本であり、強い炎症活性を持つ 6 本鎖大腸菌由来 LPS（E. LPS）に比べて、低い免疫活性しか持たない。

【目的】

本研究の目的は、異なる構造の LPS が、動脈硬化形成に及ぼす影響の差異を検証し、生体内で LPS が動脈硬化を進展・増悪させる機序を解明することである。

【方法】

8 週齢の動脈硬化モデル（アポリポ蛋白 E 遺伝子欠損；*Apoe*$^{-/-}$）マウスに高脂肪含有食を 6 週間投与し動脈硬化を評価した。2mg/kg（計 200 μl）の E. LPS、B. LPS および同量の LPS フリー水を週 1 回（計 6 回）腹腔内投与した 3 群の差異を検証した。また、動脈硬化が進展した *Apoe*$^{-/-}$ マウスに、解析の 3 日前または 7 日前に E. LPS、B. LPS または LPS フリー水を 1 回だけ腹腔内投与し病巣を解析した。ヒト冠動脈動脈硬化巣サンプルの評価を行うため、方向性冠動脈粥腫切除術（DCA）によって得られたプラーク病変に対して組織免疫染色を行った。

【結果】

E. LPS の 2 mg/kg 腹腔内投与後に、血中 LPS 活性の有意な上昇が認められたが、同量の B. LPS 投与では上昇は認められなかった。*Apoe*$^{-/-}$マウスに、各 LPS を週 1 回（計 6 回）投与した実験では、E. LPS 投与群で動脈硬化巣面積が有意に増加したが、B. LPS 投与群では増加はなかった。プラーク切片の免疫蛍光染色にて、CD68 抗体の陽性（マクロファージ）の面積は各群で有意な差を認めないが、Ly6G 抗体陽性（好中球）の面積は E. LPS 投与群で有意に増加した。さらに、好中球細胞外トラップ（NETs）のマーカーであるシトルリン化ヒストン-3（Cit-H3）抗体を用いた染色を行うと、E. LPS 投与群での NETs 形成は、他群に比べて有意に増加した。E. LPS 投与群における大動脈組織の Ccl5 mRNA の発現、および血漿 CCL5 レベルは B. LPS 投与群より有意に高値であった。

次に、マウスへ LPS を単回投与する実験を行った。E. LPS 投与後 3 日目に好中球面積が増加し、その後 7 日目に減少した。また、E. LPS 投与群では、7 日目に NETs と、IL-1β陽性面積の有意な増加を認め、IL-1β は好中球と NETs の周辺で多く存在することがわかった。B. LPS 投与群ではこれらの変化は認められなかった。

最後に、DCA で治療した急性冠症候群（ACS）患者から採取したプラーク病変の組織免疫染色での解析を行った。ヒト冠動脈プラークにおいても、マクロファージの存在する領

域に好中球が集積し、同領域に Cit-H3 陽性細胞も観察された。さらに、NETs 形成部位の近辺に IL-1β 陽性領域が存在することが観察された。

【論考】

本研究では、各細菌由来 LPS の Lipid A 部分の構造差が原因と考えられる炎症活性の差異が、エンドトキシン血症とその後の免疫反応や動脈硬化プラーク形成に寄与していることを明らかにした。

過去の報告で、極めて低用量の E. LPS 投与でも動脈硬化を増悪させることが報告されているが、4, 5 本鎖アシル鎖の Lipid A を持つ LPS の動脈硬化への影響は解明されていなかった。今回、B. LPS 投与でエンドトキシン血症が誘発されず、動脈硬化を有意に悪化させないことを確認した。一方、6 本鎖アシル鎖の Lipid A を持つ E. LPS 投与群では、エンドトキシン血症が強く誘発され、プラーク中の好中球増加と、好中球の動員・接着に関わるケモカイン遺伝子（Ccl5）の発現レベル上昇、血漿中 CCL5 濃度の上昇を認めた。また、E. LPS 投与 3 日後でプラーク病巣に好中球の集積が認められ、7 日目に NETs 形成と IL-1β の産生が確認されるという今回の結果は、E. LPS 投与によりプラーク内のマクロファージが増加しないにも関わらず、プラーク病変が悪化した理由を説明し得るものである。この結果から、LPS による直接的な好中球への刺激によって NETs が形成されるのではなく、LPS 刺激によって血管内皮細胞や血小板などから産生される、CCL5 のような好中球関連ケモカインを介して好中球が集積し、NETs を形成することでさらなる炎症の起点となることを考えた。

最後に、DCA によって得られた ACS 患者のヒト冠動脈プラークにおいて、NET 形成と IL-1β の産生が観察された。ヒトにおいては、血中 LPS 値や NETs マーカーが、ACS 患者で非 ACS 患者や対照群より高いことが報告されている。これらのことから、エンドトキシン血症や NETs 形成の抑制は、動脈硬化巣の形成抑制だけでなく、ACS 発症の抑制にも寄与する可能性が想定される。さらに、腸内細菌由来の LPS は、心血管疾患だけでなく他の炎症性疾患との関連も示唆され、本研究で得られた知見は、腸内細菌への介入で炎症を抑制する新たな治療戦略として、他疾患の患者へも貢献できる可能性があると考える。

【結論】

強い炎症活性を持つ LPS は、動脈硬化巣への好中球の集積とその後の NETs 形成を誘導して、動脈硬化の増悪に関わる。B. LPS は、E. LPS が持つプラークへの好中球集積および NETs 形成作用を示さず、動脈硬化増悪を引き起こさない。

本研究は、細菌由来 LPS の Lipid A の構造差が、動脈硬化プラーク形成にどのように影響するかを明らかにし、腸内細菌叢の制御による動脈硬化予防法の可能性を示した価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。