



Analysis of gut microbiota in coronary artery disease patients – A possible link between gut microbiota and coronary artery disease –

Emoto, Takuo

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2016-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6680号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006680>

※ 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。



学位論文の内容要旨

Analysis of gut microbiota in coronary artery disease patients
- A possible link between gut microbiota and coronary artery disease -

冠動脈疾患患者における腸内細菌叢の解析

- 腸内細菌叢と冠動脈疾患が関連する可能性 -

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)

江本拓央

背景)

ヒトの腸管には約 1000 種類、100 兆個以上の腸内細菌が生息し、密接な共生関係を築き上げ、免疫や代謝と深く関わっていることが明らかになってきている。免疫に関しては、特定の菌が免疫抑制系の制御性 T 細胞を誘導するという報告があり、代謝に関しては腸内細菌代謝産物の人体に与える影響が解明されつつある。私たちは、抗体薬である CD3 抗体の内服による制御性 T 細胞の誘導やビタミン D3 内服による免疫寛容性樹状細胞誘導といった作用を報告し腸管免疫修飾によって動脈硬化を予防できる可能性を示してきた。近年、肥満や 2 型糖尿病をはじめ、腸内細菌叢と様々な疾患発症との関係性が相次いで報告されている。また、Hazen らのグループは、腸内細菌の代謝産物である、Trimethylamine-N-oxide(TMAO) という物質が心血管イベントに関係することを報告しており、動脈硬化性疾患についても腸内細菌叢の役割が注目を集めている。

動脈硬化性疾患と腸内細菌の菌種との関連調査では、頸動脈狭窄患者で菌種との関係性が報告されているが、冠動脈疾患についての報告はない。

目的)

本研究は、冠動脈疾患発症と関係が想定される腸内細菌叢のタイプ、もしくは特定の菌を同定することを目的としている。将来的には、関係性と機序を解明し、腸内細菌叢への介入による冠動脈疾患発症予防法を開発することを目指している。

方法)

神戸大学医学部附属病院に入院中で、カテーテル検査で診断の確定している冠動脈疾患患者（冠動脈疾患群）39 名と、冠動脈疾患を持たないが、そのリスクファクターである、高血圧、脂質異常症、糖尿病のいずれかをもつ患者（コントロール群）30 名、健診会場でリクルートした、既往歴、内服歴のない健常者（健常者群）50 名について、糞便を供与頂いて細菌 DNA を抽出し、腸内細菌叢を比較した。腸内細菌叢の解析は、(株) テクノスルガラボに依頼し、細菌の 16S リボソーム RNA 領域の DNA を PCR で増幅し、制限酵素で切断する事でそのフラグメントを解析するという、Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism(T-RFLP 法) を用いた。本研究では、制限酵素 *Bsl I* を使用しており、腸内細菌叢を *Prevotella*、*Bacteroides*、*Lactobacillales*、*Bifidobacterium*、*Clostridium cluster IV*、*Clostridium subcluster XIVa*、*Clostridium cluster IX*、*Clostridium cluster XI*、*Clostridium cluster XVIII*、その他の 10 のおおまかな目から属レベルに分類することができる。

結果)

患者背景については、冠動脈疾患患者はガイドラインに沿って治療されているために、群間の内服薬の背景が大きく異なっていた。肥満や糖尿病などの腸内細菌叢への影響が報告されている疾患に関しては、冠動脈疾患群とコントロール群間で有意な差はない。

Pearson's correlation analysis と the unweighted pair-group methods with arithmetic means (UPGMA)を使用して、腸内細菌叢の類似度の樹形図を作成すると、冠動脈疾患患者においては、コントロール群や健常者群と比較して、全体としての菌叢に差異が認められた。また、Arumugamらが2011年にヒトの腸内細菌叢は大きく3つのEnterotype(I~III)に分類できるということを報告しており、本研究においてもT-RFLP法の結果から腸内細菌叢のEnterotype分類を試みた。*Bacteroidetes*属菌が30%以上の菌叢をEnterotype I、*Prevotella*属菌が15%以上の菌叢をEnterotype II、それ以外をEnterotype 'others' (III)とすると、冠動脈疾患患者では*Bacteroidetes*属と*Prevotella*属がともに少ない、Enterotype 'others' (III)に属する方が多いということが分かった。

統いて、それぞれの菌について、その割合を比較すると、冠動脈疾患群において*Lactobacillales*目菌が多く、(冠動脈疾患群、コントロール群 vs. 健常者群; 13.6 ± 12.0%, 6.2 ± 7.7% vs. 4.09 ± 5.89; p < 0.001)、冠動脈疾患を多枝病変と一枝病変に分けて解析した場合、多枝病変の方に*Lactobacillales*目菌が多かった(多枝病変群、一枝病変群 vs. コントロール群; 16.5 ± 12.6%, 6.3 ± 6.1%, 6.2 ± 7.7%; p = 0.002)。

単独では有意差を認めなかつたが、*Bacteroides*属菌と*Prevotella*属菌を足した*Bacteroidetes*門菌は冠動脈疾患群で有意に少なかつた(冠動脈疾患群、コントロール群 vs. 健常者群; 35.5 ± 11.6%, 43.9 ± 11.2% vs. 47.4 ± 11.5%; p < 0.001)。また、*Firmicutes*門と*Bacteroidetes*門の比(F/B比)を取った場合、冠動脈疾患群で有意にF/B比が高かつた(冠動脈疾患群、コントロール群 vs. 健常者群; 1.6 ± 1.0, 1.3 ± 2.0 vs. 1.1 ± 1.4; p < 0.001)。

冠動脈疾患群とコントロール群(69例)のなかで、冠動脈疾患へ影響を及ぼしている可能性のある要素を、リスクファクターと薬とで分けて、本研究で重要と考えられた*Lactobacillales*目菌と交絡しているのかを検討した。すると、従来のリスクファクターとは独立して*Lactobacillales*目菌が冠動脈疾患を規定する因子として残るが、薬については交絡している可能性を示す結果であった。しかし、サブ解析として、多枝病変をもつ重症の冠動脈患者を規定する因子を検討すると、*Lactobacillales*目菌が、薬とは独立して、多枝病変をもつ重症の冠動脈患者を規定する因子であることが示された。

考察)

類似度の樹形図やEnterotypeの分類から、冠動脈疾患患者において、腸内細菌叢が異なっていることが判明した。Enterotype others(III)に属する患者が多いというのは、過去の頸動脈狭窄患者の論文とも一致している。

冠動脈疾患患者で増えていた、*Lactobacillales*目菌の中には属レベルでいうと*Lactobacillus*、*Streptococcus*、*Enterococcus*などが存在している。*Lactobacillus*属菌は2型糖尿病で増えていると言われているが、私たちの研究では、*Lactobacillales*目菌とHbA1cとの相関は認められなかった。また、2型糖尿病患者だけで検討しても*Lactobacillales*目菌は有意に冠動脈疾患患者で増加していた。*Bacteroidetes*門菌の中の*Bacteroides*属菌については、特に*Bacteroides fragilis*は制御性T細胞を誘導する作用が報告されている。また他の*Bacteroides*属菌についても短鎖脂肪酸を多く産生するという報告もある。冠動脈疾患における役割は、今後解明すべきと考えられる。

F/B比については、肥満との関係が既に報告されているが、本研究においてもF/B比とBMIとの相関を認めており、本研究で用いたTRFLPが既報と一致する腸内細菌の変化を捉えられていると考えられる。F/B比の増加というのは、本研究では*Firmicutes*門菌のなかの*Lactobacillales*目菌が増えていること、*Bacteroidetes*門菌が減っていることを見ていると考えている。

コントロール群と健常者群では腸内細菌叢の差異はなく、冠動脈疾患群とコントロール群では菌叢の差異が認められるので、冠動脈疾患によって、原因か結果かは分からぬが菌叢が変化しているということが想定される。しかし、薬による交絡は除外できおらず、本研究で示した腸内細菌叢の変化は冠動脈疾患と関連している可能性を示したにすぎない。今後、その菌叢の変化が原因であるか結果であるか、薬の影響を見ているだけなのかも含めて、前向きのコホート研究が望まれる。また腸内細菌叢が冠動脈疾患の原因であった場合、その生物学的な意義も明らかにする必要がある。

結語)

本研究は、冠動脈疾患患者における腸内細菌叢を解析した初めての報告である。薬の背景がそろっていないなど制限が多い研究ではあるが、冠動脈疾患と腸内細菌とが関係している可能性を示した。本研究だけでは腸内細菌が冠動脈疾患の原因となっているのかどうかは断定できず、前向きのコホート研究が望まれる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2582 号	氏名	江本 拓央
論文題目 Title of Dissertation	<p>'Analysis of gut microbiota in coronary artery disease patients -A possible link between gut microbiota and coronary artery disease-</p> <p>冠動脈疾患患者における腸内細菌叢の解析 —腸内細菌叢と冠動脈疾患が関連する可能性—</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 高村 善博</p> <p>副査 Vice-examiner 東 健</p> <p>副査 Vice-examiner 勝田 有夫</p>		
(要旨は1,000字~2,000字程度)			

ヒトの腸管には約 1000 種類、100 兆個以上の腸内細菌が生息し、密接な共生関係を築き上げ、免疫や代謝と深く関わっていることが明らかになっている。本研究者らは、抗体薬である CD3 抗体の内服による制御性 T 細胞の誘導やビタミン D3 内服による免疫寛容性樹状細胞誘導といった作用を報告し、腸管免疫修飾によって動脈硬化を予防できる可能性を示してきた。近年、動脈硬化性疾患と腸内細菌の菌種との関連調査では、頸動脈狭窄患者で菌種との関係性が報告されているが、冠動脈疾患についての報告はない。本研究は、冠動脈疾患発症と関係が想定される腸内細菌叢のタイプ、もしくは特定の菌を同定することを目的として計画された。

神戸大学医学部附属病院に入院中で、カテーテル検査で診断の確定している冠動脈疾患患者（冠動脈疾患群）39名と、冠動脈疾患は持たないが、そのリスクファクターである、高血圧、脂質異常症、糖尿病のいずれかを持つ患者（コントロール群）30名、健診会場でリクルートした、既往歴、内服歴のない健常者（健常者群）50名について、糞便より細菌 DNA を抽出し、腸内細菌叢を比較した。腸内細菌叢の解析は、（株）テクノスルガラボに依頼し、Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism(T-RFLP 法)を用いた。

患者背景については、冠動脈疾患患者はガイドラインに沿って治療されているために、群間の内服薬の背景が大きく異なっていた。肥満や糖尿病などの腸内細菌叢への影響が報告されている疾患に関しては、冠動脈疾患群とコントロール群間で有意差はなかった。

Pearson's correlation analysis と the unweighted pair-group methods with arithmetic means (UPGMA)を使用して、腸内細菌叢の類似度の樹形図を作成すると、冠動脈疾患患者においては、コントロール群や健常者群と比較して、全体としての菌叢に差異が認められた。Bacteroidetes 属菌が 30%以上の菌叢を Enterotype I、Prevotella 属菌が 15%以上の菌叢を Enterotype II、それ以外を Enterotype 'others'(III)とすると、冠動脈疾患患者では、Enterotype 'others'(III)に属するものが多かった。

統いて、それぞれの菌について、その割合を比較すると、冠動脈疾患群において Lactobacillales 目菌が多く、冠動脈疾患を多枝病変と一枝病変に分けて解析した場合、多枝病変の方に Lactobacillales 目菌が多かった。

単独では有意差を認めなかったが、Bacteroides 属菌と Prevotella 属菌を足した Bacteroidetes 門菌は冠動脈疾患群で有意に少なかった。また、Firmicutes 門と Bacteroidetes 門の比 (F/B 比) を取った場合、冠動脈疾患群で有意に F/B 比が高かった。

冠動脈疾患群とコントロール群のなかで、冠動脈疾患へ影響を及ぼしている可能性のある要素を、リスクファクターと薬とで分けて、本研究で重要と考えられた Lactobacillales 目菌と交絡しているのかを検討したところ、従来のリスクファクターとは独立して Lactobacillales 目菌が冠動脈疾患を規定する因子として残るが、薬については交絡してい

る可能性を示す結果であった。しかし、サブ解析として、多枝病変をもつ重症の冠動脈患者を規定する因子を検討すると、*Lactobacillales* 目菌が、薬とは独立して多枝病変を持つ重症の冠動脈患者を規定する因子であることが示された。

類似度の樹形図や Enterotype の分類から、冠動脈疾患患者において、腸内細菌叢が異なっていることが判明した。Enterotype ‘others’(III)に属する患者が多いというのは、過去の頸動脈狭窄患者の論文とも一致していた。

冠動脈疾患患者で増えていた、*Lactobacillales* 目菌の中には属レベルでいうと *Lactobacillus*、*Streptococcus*、*Enterococcus* などが存在している。*Lactobacillus* 属菌は 2 型糖尿病で増えていると言われているが、本研究では、*Lactobacillales* 目菌と HbA1c との相関は認められなかった。また、2 型糖尿病患者だけで検討しても *Lactobacillales* 目菌は有意に冠動脈疾患患者で増加していた。

F/B 比については、肥満との関係が既に報告されているが、本研究においても F/B 比と BMI との相関を認めており、本研究で用いた TRFLP が既報と一致する腸内細菌の変化を捉えられていると考えられた。

本研究では、薬による交絡は除外できておらず、本研究で示した腸内細菌叢の変化は冠動脈疾患と関連している可能性を示したに過ぎない。今後、前向きのコホート研究や、その生物学的な意義も明らかにする必要がある。

本研究より、冠動脈疾患患者における腸内細菌叢を解析した初めての報告がなされた。本研究は冠動脈疾患と腸内細菌とが関係している可能性を示す重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。