



# Bacteroides vulgatus and Bacteroides dorei Reduce Gut Microbial Lipopolysaccharide Production and Inhibit Atherosclerosis

Yoshida, Naofumi

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2019-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7335号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007335>

※ 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

### *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* Reduce Gut Microbial Lipopolysaccharide Production and Inhibit Atherosclerosis

*Bacteroides vulgatus*と*Bacteroides dorei*は腸内細菌のリポ多糖産生を減少させて動脈硬化を抑制する

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

吉田 尚史

#### 【背景】

食事由来の腸内細菌代謝産物が、動脈硬化の発症、進展に関与する事が報告され、腸内細菌代謝産物を標的とした動脈硬化性疾患に対する予防法、治療法の開発が行われている。しかし特定の腸内細菌種がどのように疾患発症に寄与するかは未だ詳細に解明されていない。我々は、動脈硬化性疾患の一つである冠動脈疾患患者の腸内細菌叢において、*Bacteroides*属の存在割合が減少している事を報告した。*Bacteroides*属の外膜構成成分であるリポ多糖には4本ないし5本のアシル基が結合しているが、6本のアシル基を持つ大腸菌のリポ多糖と比してToll-like receptor 4 (TLR4) 刺激能が弱い事が知られている。これらの事から我々は、免疫刺激作用の弱いリポ多糖を持つ*Bacteroides*属の存在割合の低下が、慢性炎症性疾患である冠動脈疾患の発症に繋がっていると考えた。本研究では、冠動脈疾患発症に寄与する腸内細菌を、特に*Bacteroides*属に着目して種レベルで同定し、その種と冠動脈疾患発症の因果関係や発症機序を明らかとする。

#### 【方法】

最初に、神戸大学医学部附属病院に入院された冠動脈疾患患者30人と、冠動脈危険因子は保有するが冠動脈疾患発症には至っていないコントロール患者30人から採便した。16S リボソームRNA遺伝子の網羅的解析と定量的ポリメラーゼ連鎖反応により両群の腸内細菌叢を同定後、その差異を種レベルで解析した。次に、冠動脈疾患患者で有意に存在割合が低下していた菌株を購入し、嫌気下に液体培地を用いて培養後、6週齢の動脈硬化モデルマウス (*ApoE*<sup>-/-</sup>マウス) に $5 \times 10^8$  CFU/200 $\mu$ l/回を週5回、10週間、強制経口投与した。コントロール群は液体培地のみ投与とした。一連のマウスを用いた研究により、腸内細菌種と冠動脈疾患における因果関係と発症機序を解明し、最後に患者糞便を用いてその機序がヒトに応用できるかを検証した。腸内細菌の機能組成データは、PICRUStを用いて腸内細菌叢データからKyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Orthologyに基づく機能分類を行う事で得た。リポ多糖値はLimulus Amebocyte Lysateアッセイを用いて測定した。

#### 【結果】

冠動脈疾患患者30人とコントロール患者30人の年齢は有意な差を認めなかった (62.9 $\pm$ 6.8歳 vs 63.6 $\pm$ 7.2歳,  $p=0.72$ )。性別、Body Mass Indexも両群間で有意な差を認めなかった。計60人の腸内細菌叢は3つの集団に大別され、*Bacteroides*属が多い集団に分類された冠動脈疾患患者は5人 (17%) と、コントロール患者15人 (50%) と比べて有意に少なかった ( $p=0.006$ )。主成分分析で、*Bacteroides vulgatus*と*Bacteroides dorei*が両群の識別に有用な因子である事が示唆されたため、ポリメラーゼ連鎖反応により2菌の存在比率を定量した結果、冠動脈疾患患者では2菌の存在割合が有意に低下していた (16.0 $\pm$ 12.6% vs 9.6 $\pm$ 9.0%,  $p=0.03$ )。

次に2菌の標準菌株を培養し、*ApoE*<sup>-/-</sup>マウスに2菌株を強制経口投与した結果、2菌投与群

の大動脈洞における動脈硬化巣でMOMA-2陽性細胞やCD4陽性T細胞の集積の低下を認め、大動脈洞と大動脈における動脈硬化巣面積が有意に減少した。2菌投与群では、血中リポ多糖値が有意に低下し、炎症性サイトカイン濃度も低下傾向であった。2菌投与後の腸内細菌叢はコントロール群と比して大きく変化しており、*Bacteroides vulgatus*と*Bacteroides dorei*の存在割合は、2菌投与群で約10倍に増加していた。PICRUStで腸内細菌が持つ機能を推定した結果、2菌投与群では腸内細菌の有するリポ多糖合成に関わる遺伝子量が低下し、特にリポ多糖の形成に必須の*lpxA*と*lpxD*の遺伝子量は有意に低下していた。この結果と一致して、腸内細菌が産生したリポ多糖（糞便リポ多糖値）も、2菌投与群で有意に低下していた。さらに腸管透過性に関連する密着結合を担う分子であるzo-1の大腸におけるmRNAの発現は、2菌投与群で有意に増加していた。

ヒトにおいても、冠動脈疾患患者の糞便リポ多糖値はコントロール患者に比し有意に高値であった（ $2.54 \pm 2.17$  Endotoxin Unit/g vs  $4.29 \pm 3.22$  Endotoxin Unit/g,  $p=0.017$ ）。また冠動脈疾患患者においては、*Bacteroides vulgatus*と*Bacteroides dorei*の存在比率と糞便リポ多糖値は有意な逆相関を認めた（ $r=-0.541$ ,  $p=0.002$ ）。冠動脈疾患患者の腸内細菌機能解析では、大腸菌などが持つ免疫刺激性のあるリポ多糖に特徴的な6本目のアシル基付加に関わる遺伝子（*lpxM*）量がコントロール患者より平均約1.8倍多かった。

#### 【論考】

我々は横断研究により、冠動脈疾患患者の腸内細菌叢では、非冠動脈疾患患者に比して、*Bacteroides vulgatus*と*Bacteroides dorei*の存在比率の和が有意に低下している事を示した。この2菌を動脈硬化モデルマウスに経口投与すると動脈硬化が抑制された事から、2菌の減少が冠動脈疾患発症に繋がっている事を示した。その機序としては、2菌が腸内細菌のリポ多糖産生を減少させ、ひいては代謝性エンドトキシン血症が改善し動脈硬化の抑制に繋がっている事を示した。当初はTLR4刺激能が弱いリポ多糖を持つ*Bacteroides vulgatus*と*Bacteroides dorei*の投与により腸管免疫の活性化が抑制され動脈硬化が改善するという仮説であったが、2菌が腸内細菌叢全体としてのリポ多糖産生を抑制している事が明らかとなった。

冠動脈疾患は慢性炎症性疾患であり、リポ多糖とその受容体であるTLR4の刺激が動脈硬化を増悪させる事が数多く報告されている。これまで腸内細菌が産生するリポ多糖が血中に移行すると考えられていたものの、冠動脈疾患において腸内細菌産生リポ多糖値（糞便リポ多糖値）を定量し、疾患発症との関連を示した初の研究である。今後、*Bacteroides vulgatus*と*Bacteroides dorei*の存在比率で冠動脈疾患リスクの層別化を行うだけでなく、糞便リポ多糖値が新たなバイオマーカーとなる可能性がある。

本研究では、*Bacteroides vulgatus*と*Bacteroides dorei*の16S rRNA遺伝子は96%以上相同性を示す事や2菌共にヒトにおいて存在比率の多い優勢菌である事から、2菌の和に着目して研究を進めた。今後単菌と疾患発症との関連や、独自に2菌株を単離し、よりリポ多糖

産生を抑制する菌株を樹立するなど、さらなる検討を行っていきたい。

2菌投与により、リポ多糖産生の少ない腸内細菌叢を誘導する事で代謝性エンドトキシン血症を改善した本研究成果は、多くの慢性炎症性疾患（肥満や肥満関連疾患、炎症性腸疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患/非アルコール性脂肪肝炎、心不全）に、*Bacteroides*2菌による治療を応用できる点で発展性・将来性があると考えられる。

#### 【結論】

*Bacteroides vulgatus*と*Bacteroides dorei*が、腸内細菌のリポ多糖産生を制御する事で冠動脈疾患発症に関わっている可能性を示した。今後2菌を標的とした、冠動脈疾患の予防法・治療法を臨床に応用したい。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2828 号	氏 名	吉田 尚史
論文題目 Title of Dissertation	<p><i>Bacteroides vulgatus</i> と <i>Bacteroides dorei</i> は腸内細菌のリポ多糖産生を減少させて動脈硬化を抑制する</p> <p><i>Bacteroides vulgatus</i> and <i>Bacteroides dorei</i> Reduce Gut Microbial Lipopolysaccharide Production and Inhibit Atherosclerosis</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 見玉 裕三 Chief Examiner</p> <p>副 査 勝 = 郁夫 Vice-examiner</p> <p>副 査 古屋敷 智之 Vice-examiner</p>		

(要旨は1, 000字~2, 000字程度)

要旨

食事由来の腸内細菌代謝産物が、動脈硬化の発症、進展に関与する事が報告され、腸内細菌代謝産物を標的とした動脈硬化性疾患に対する予防法、治療法の開発が行われている。しかし特定の腸内細菌種がどのように疾患発症に寄与するかは未だ詳細に解明されていない。本研究グループは、動脈硬化性疾患の一つである冠動脈疾患患者の腸内細菌叢において、*Bacteroides* 属の存在割合が減少している事を報告した。*Bacteroides* 属の外膜構成成分であるリポ多糖には4本ないし5本のアシル基が結合しているが、6本のアシル基を持つ大腸菌のリポ多糖と比して Toll-like receptor 4 (TLR4) 刺激能が弱い事が知られている。これらの事から免疫刺激作用の弱いリポ多糖を持つ *Bacteroides* 属の存在割合の低下が、慢性炎症性疾患である冠動脈疾患の発症に繋がっていると考えられた。本研究では、冠動脈疾患発症に寄与する腸内細菌を、特に *Bacteroides* 属に着目して種レベルで同定し、その種と冠動脈疾患発症の因果関係や発症機序を明らかとすることを目的とする。

最初に、神戸大学医学部附属病院に入院された冠動脈疾患患者 30 人と、冠動脈危険因子は保有するが冠動脈疾患発症には至っていないコントロール患者 30 人から採便した。16S リボソーム RNA 遺伝子の網羅的解析と定量的ポリメラーゼ連鎖反応により両群の腸内細菌叢を同定後、その差異を種レベルで解析した。次に、冠動脈疾患患者で有意に存在割合が低下していた菌株を購入し、嫌気下に液体培地を用いて培養後、6 週齢の動脈硬化モデルマウス (*ApoE*<sup>-/-</sup>マウス) に  $5 \times 10^8$  CFU/200 $\mu$ l/回を週 5 回、10 週間、強制経口投与した。コントロール群は液体培地のみ投与とした。一連のマウスを用いた研究により、腸内細菌種と冠動脈疾患における因果関係と発症機序を解明し、最後に患者糞便を用いてその機序がヒトに応用できるかを検証した。腸内細菌の機能組成データは、腸内細菌叢データから Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Orthology に基づく機能分類を行う事で得た。リポ多糖値は *Limulus Amebocyte Lysate* アッセイを用いて測定した。

冠動脈疾患患者 30 人とコントロール患者 30 人の年齢は有意な差を認めなかった (62.9 $\pm$ 6.8 歳 vs 63.6 $\pm$ 7.2 歳,  $p=0.72$ )。性別、Body Mass Index も両群間で有意な差を認めなかった。計 60 人の腸内細菌叢は 3 つの集団に大別され、*Bacteroides* 属が多い集団に分類された冠動脈疾患患者は 5 人(17%)と、コントロール患者 15 人(50%)と比べて有意に少なかった ( $p=0.006$ )。主成分分析で、*Bacteroides vulgatus* と *Bacteroides dorei* が両群の識別に有用な因子である事が示唆されたため、ポリメラーゼ連鎖反応により 2 菌の存在比率を定量した結果、冠動脈疾患患者では 2 菌の存在割合が有意に低下していた (16.0 $\pm$ 12.6% vs 9.6 $\pm$ 9.0%,  $p=0.03$ )。

次に 2 菌の標準菌株を培養し、*ApoE*<sup>-/-</sup>マウスに 2 菌株を強制経口投与した結果、2 菌投与群の大動脈洞における動脈硬化巣で MOMA-2 陽性細胞や CD4 陽性 T 細胞の集積の低下を認め、大動脈洞と大動脈における動脈硬化巣面積が有意に減少した。2 菌投与群では、血中リポ多糖値が有意に低下し、炎症性サイトカイン濃度も低下傾向であった。2 菌投与後の腸内細菌叢はコントロール群と比して大きく変化しており、*Bacteroides vulgatus* と *Bacteroides dorei* の存在割合は、2 菌投与群で約 10 倍に増加していた。腸内細菌が持つ

機能を解析した結果、2 菌投与群では腸内細菌の有するリポ多糖合成に関わる遺伝子量が低下し、特にリポ多糖の形成に必須の *lpxA* と *lpxD* の遺伝子量は有意に低下していた。この結果と一致して、腸内細菌が産生したリポ多糖（糞便リポ多糖値）も、2 菌投与群で有意に低下していた。さらに腸管透過性に関連する密着結合を担う分子である *zo-1* の大腸における mRNA の発現は、2 菌投与群で有意に増加していた。

ヒトにおいても、冠動脈疾患患者の糞便リポ多糖値はコントロール患者に比し有意に高値であった(2.54±2.17 Endotoxin Unit/g vs 4.29±3.22 Endotoxin Unit/g, p=0.017)。また冠動脈疾患患者においては、*Bacteroides vulgatus* と *Bacteroides dorei* の存在比率と糞便リポ多糖値は有意な逆相関を認めた(r = -0.541, p=0.002)。冠動脈疾患患者の腸内細菌機能解析では、大腸菌などが持つ免疫刺激性のあるリポ多糖に特徴的な 6 本目のアシル基付加に関わる遺伝子(*lpxM*)量がコントロール患者より平均約 1.8 倍多かった。

本横断研究により、冠動脈疾患患者の腸内細菌叢では、非冠動脈疾患患者に比して、*Bacteroides vulgatus* と *Bacteroides dorei* の存在比率の和が有意に低下している事が示された。また、この 2 菌を動脈硬化モデルマウスに経口投与すると動脈硬化が抑制された事から、2 菌の減少が冠動脈疾患発症に繋がっている事が示された。その機序としては、2 菌が腸内細菌のリポ多糖産生を減少させ、ひいては代謝性エンドトキシン血症が改善し動脈硬化の抑制に繋がっている事が示された。当初は TLR4 刺激能が弱いリポ多糖を持つ *Bacteroides vulgatus* と *Bacteroides dorei* の投与により腸管免疫の活性化が抑制され動脈硬化が改善するという仮説であったが、2 菌が腸内細菌叢全体としてのリポ多糖産生を抑制している事が明らかとなった。

冠動脈疾患は慢性炎症性疾患であり、リポ多糖とその受容体である TLR4 の刺激が動脈硬化を増悪させる事が数多く報告されている。これまで腸内細菌が産生するリポ多糖が血中に移行すると考えられていたものの、冠動脈疾患において腸内細菌産生リポ多糖値（糞便リポ多糖値）を定量し、疾患発症との関連を示した初の研究である。今後、*Bacteroides vulgatus* と *Bacteroides dorei* の存在比率で冠動脈疾患リスクの層別化を行うだけでなく、糞便リポ多糖値が新たなバイオマーカーとなる可能性がある。また、2 菌投与により、リポ多糖産生の少ない腸内細菌叢を誘導する事で代謝性エンドトキシン血症を改善した本研究成果は、多くの慢性炎症性疾患（肥満や肥満関連疾患、炎症性腸疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患/非アルコール性脂肪肝炎、心不全）に、*Bacteroides* 2 菌による治療を応用できる点で発展性・将来性があると考えられる。

本研究は特定の腸内細菌種について、その冠動脈疾患への関与を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった *Bacteroides vulgatus* と *Bacteroides dorei* の腸内細菌のリポ多糖産生の制御を介する冠動脈疾患発症への関与について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。