

腸内細菌叢変容による難治性血管病の病態形成機構と治療法の開発

中岡 良和

国立循環器病研究センター研究所血管生理学部・部長
病院心臓血管内科・副院長

略歴

- a. 出生年・地：1969年、静岡県
- b. 最終学歴：大阪大学大学院医学系研究科、博士（医学）
- c. 主な学歴・職歴：1991年3月 東京大学理学部生物化学科卒業
1996年3月 大阪大学医学部医学科卒業
1996年6月～大阪大学医学部附属病院・第3内科研修医
1997年6月～国立大阪病院・研修医
1998年6月～大阪府立成人病センター循環器内科・レジデント
2000年4月～大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学専攻入学
2004年3月 大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学専攻終了
2004年4月～国立循環器病センター研究所循環器形態部・室員
2007年4月～大阪大学大学院医学系研究科循環器内科・特任助教
2009年11月～大阪大学大学院医学系研究科循環器内科・助教
2013年10月～2017年3月 科学技術振興機構さきがけ研究者（兼任）
2015年8月～大阪大学大学院医学系研究科循環器内科・講師
2016年1月～国立循環器病センター研究所血管生理学部・部長
2023年2月～国立循環器病センター病院副院長（研究担当）（併任）
現在に至る
- d. 主な研究テーマ：難治性血管病（肺高血圧症、高安動脈炎）の病態解明と治療法開発
循環器病態における腸内細菌叢の役割解明
- e. 主な受賞：
2006年10月 日本心不全学会 Young Investigator Award 最優秀研究賞受賞
2008年3月 日本循環器学会第17回八木賞受賞
2014年7月 大阪大学 総長奨励賞
2022年7月 日本肺高血圧・肺循環学会 八巻賞
- f. その他の活動：大阪大学医学系研究科循環器内科学・招聘教授
厚労科研難治性疾患政策研究「難治性血管炎調査研究班」（大型血管炎臨床分科会長）
日本循環器学会フェロー（FJCS）
ISHR（International Society for Heart Research）Fellow
日本血管生物医学会理事
日本肺高血圧肺循環学会理事

要約

はじめに

腸内細菌叢は宿主の代謝・免疫に影響を与えることで、さまざまな疾患の発症・増悪と相関することが示されている。循環器病領域での腸内細菌叢由来代謝物で最も有名なものに、食事成分由来のフォスファチジルコリンやカルニチンの腸内細菌関連代謝物であるトリメチルアミン N- オキシド (TMAO) がある。TMAO は心血管イベントと強い相関が報告されて、動脈硬化、腎臓病や心不全の病態との関連性から非常に注目されている。本発表では、演者が専門とする難治性血管病の腸内細菌叢変容と病態の関連性と、その分子機構に基づく新しい診断・治療法の開発に向けた試みを紹介させて頂く。

1. 高安動脈炎における腸内細菌叢変容と大動脈瘤形成

高安動脈炎 (TAK) は東アジアの若年女性に多くみられる厚生労働省指定難病で、未だ原因不明である。TAK は大動脈とその 1 次分枝血管に炎症を来し、大動脈瘤や大動脈弁閉鎖不全などの血管合併症の罹患が多くみられる。TAK は自己免疫疾患で、第 1 選択の治療薬はステロイドである。ステロイドの高容量投与で TAK 患者は一旦寛解に至るものの、ステロイド減量過程で半数以上の患者で再燃が生じる。我々は TAK のステロイド治療抵抗性を示す症例の新しい治療法開発に取り組み、炎症性サイトカインの interleukin-6 (IL-6) を阻害する抗体医薬トシリズマブの有効性を臨床試験と治験から見出した (Nakaoka et al. *Ann Rheum Dis* 2018, Nakaoka et al. *Rheumatology (Oxford)* 2020)。上記の結果から、2017年にトシリズマブは TAK に日本で薬事承認され、臨床現場で使用可能となっている。トシリズマブ治療の問題点として、血液検査での治療指標となる炎症マーカーがトシリズマブの薬理作用で陰性化してしまい、治療指標として機能しなくなることが挙げられる。TAK の再燃は自覚症状と定期的な画像検査で注意深くモニターするしかなく、大動脈瘤や大動脈弁閉鎖不全症のリスクを予測できる患者層別化のバイオマーカーを開発する必要がある。TAK 患者と健常者で腸内細菌叢を比較すると、TAK 患者では健常者に比して口腔内常在菌の *Campylobacter gracilis* 菌が有意に増加していることを見出した。本菌の増加は TAK で服薬する薬剤の副作用予防で投与されるプロトンポンプ阻害薬 (PPI) の内服と強い相関が見られた。PPI を内服する TAK 患者では *Campylobacter gracilis* 菌陽性者は陰性者に比べて大動脈瘤形成・増悪関連イベントの発生率が有意に高かった (Manabe et al. *Arthritis Res Ther* 2023)。この結果を踏まえて、厚生労働省政策研究班を構成する 23 の医療施設と共同研究で、*Campylobacter gracilis* と大動脈瘤形成の関連性の検証を現在進めている。

2. 肺高血圧症病態形成における腸内細菌叢変容と芳香族炭化水素受容体シグナルの役割

肺高血圧症 (PH) は厚生労働省指定難病の 1 つで、肺動脈の遠位部 (細動脈、小動脈) に原因不明の狭窄・閉塞を来す予後不良の疾患である。PH 発症には遺伝的素因に加えて、炎症や外来性の薬物・毒物曝露などの外的素因が重要とされるが、発症機構の詳細は未だ明らかでない。我々は、IL-6 とその下流の Th17 細胞及び Th17 細胞由来の IL-21 からなるシグナル軸が PH 病態形成で中心的役割を担うことをこれまで報告して来た

(Hashimoto-Kataoka et al. *PNAS* 2015, Yaku et al. *Circulation* 2022, Ishibashi et al. *PNAS* 2024)。

我々は Th17 細胞の分化に重要な役割を持つ転写因子の芳香族炭化水素受容体 (Aryl Hydrocarbon Receptor: AHR) に焦点をあてて、AHR が PH 病態形成で非常に重要であることを見出した (Masaki et al. *PNAS* 2021)。AHR は別名ダイオキシン受容体としても知られ、環境中の有機化学物質の毒物を検知して解毒代謝酵素の誘導に関わる。腸管内での AHR リガンドの産生には腸内細菌叢による代謝が重要な役割を持つことが報告されており、我々は PH 患者の腸内細菌叢変容を検討した。PH 患者 89 例、健常者 82 例から便検体を集積して 16S メタゲノム解析を施行したところ、*Streptococcus* 属や *Rothia* 属などの口腔内常在細菌が増加しており、*Coprococcus* 属や *Subdoligranulum* 属などの短鎖脂肪酸産生菌の減少が見られ、腸内細菌叢変容は疾患重症度や予後との相関が観察された。次に抗生剤投与ラット及び無菌ラットで PH の誘導に関わる化学物質 (炎症惹起物質) のモノクロタリン (MCT) を投与して、血行動態や右室 / 左室重量比を評価すると、PH 病態は抗生剤投与及び無菌化により著明に改善することが明らかとなった。そこで、無菌ラットに PH 患者及び健常者の腸内細菌叢を移植 (FMT) するノトバイオラットを作製して MCT 負荷をすると、患者 FMT ラットでは健常者と比較して PH 病態の悪化が見られた。糞便中の AHR リガンド活性をルシフェラーゼアッセイで測定すると、患者及び患者便 FMT ラットでは、健常者及び健常者便 FMT ラットと比較してそれぞれ便中の AHR リガンド活性が上昇しており、患者便 FMT ラットの腸管上皮細胞層で AHR 標的遺伝子である *Cyp1a1*mRNA の発現レベルが上昇していた。以上より、PH 患者及び PH モデル動物では腸管内の AHR シグナルが亢進していることが明らかとなった。また、患者便 FMT ラットに対して、AHR 阻害薬を経口投与すると PH 病態は改善したことから、PH 患者では口腔内常在細菌が腸管内で増加する腸内細菌叢の変容が生じて、その移行定着による AHR リガンド産生の腸管内での亢進が生じて PH 病態が誘導されている可能性が示唆された (Asano et al. *manuscript in preparation*)。腸内細菌叢変容とそれに伴う AHR シグナルの亢進を制御することで、PH に対する新しい治療法の開発に繋がることが期待される。

Development of novel therapeutics for intractable vascular diseases through elucidation of the pathogenesis focusing on gut dysbiosis

Yoshikazu Nakaoka
National Cerebral and Cardiovascular Center

Brief curriculum vitae

Prof. Yoshikazu Nakaoka is Director of Department of Vascular Physiology at Research Institute and Deputy Director of Department of Cardiovascular Medicine at Hospital of National Cerebral and Cardiovascular Center (NCVC) and serves as an Adjunct Professor at Department of Cardiovascular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine. He was awarded his M.D. in 1996 and his Ph.D. in 2004 from Osaka University, respectively. He worked as a staff scientist for Department of Structural Analysis at NCVC Research Institute from 2004 to 2007. In 2007, he came back to Department of Cardiovascular Medicine at Osaka University and has served as Assistant and Associate Professor, before moving to NCVC as Director to launch a new laboratory at Department of Vascular Physiology in 2016. He was promoted to Deputy Director of Department of Cardiovascular Medicine at NCVC Hospital in 2023. His research has been focusing on the pathogenesis of intractable cardiovascular diseases such as pulmonary hypertension, Takayasu arteritis (TAK), heart failure and stroke in association with inflammation and gut dysbiosis. He has been conducting several clinical trials as a principal investigator to evaluate the efficacy and safety of biologic treatment for TAK.

Abstract

Introduction

The gut microbiota has been shown to correlate with the onset and exacerbation of various diseases by influencing host metabolism and immunity. One of the most well-known metabolites derived from the gut microbiota in the field of cardiovascular disease is trimethylamine N-oxide (TMAO), a gut-associated metabolite of phosphatidylcholine and carnitine derived from dietary components. TMAO has received a great deal of attention due to its association with atherosclerosis, aortic aneurysm, renal disease, and heart failure. In this presentation, I would like to introduce the relationship between intestinal microbiota alteration and the pathogenesis of intractable vascular diseases such as pulmonary hypertension and Takayasu arteritis, and the attempts toward novel diagnostics and therapeutics based on this relationship.

1. Alteration of intestinal microbiota and aortic aneurysm formation in Takayasu arteritis

Takayasu arteritis (TAK) is an intractable disease designated by Ministry of

Health, Labour and Welfare in Japan. TAK is frequently observed in young women in Japan and other East Asian countries. TAK causes inflammation of aorta and its primary branches, leading to vascular complications such as aortic aneurysms and aortic regurgitation. Although high doses of steroids can bring TAK patients into remission, more than half of them relapse during the steroid-tapering process. We have been working on the development of a new treatment for patients with TAK refractory to steroid therapy, and have found that tocilizumab, a monoclonal antibody targeting the receptor for inflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6), may be effective for the steroid-resistant TAK patients from clinical trials (Nakaoka et al. *Ann Rheum Dis* 2018, Nakaoka et al. *Rheumatology (Oxford)* 2020, Nakaoka et al. *Rheumatology (Oxford)* 2022). Based on the above findings, tocilizumab was approved by the Japanese health authorities for TAK in 2017 and is now available in clinical practice. One problem with tocilizumab treatment is that inflammatory markers that serve as biomarkers in blood tests can become negative due to the pharmacologic effects of tocilizumab and no longer serve as therapeutic markers; relapse of TAK can only be carefully monitored by subjective symptoms and regular imaging tests. Thus, we would like to develop a novel biomarker to effectively predict the risk of aortic aneurysm and aortic regurgitation in TAK patients. Comparing the gut microbiota of the patients with TAK and healthy controls, we found a significant increase of the oral commensal bacterium *Campylobacter gracilis* in patients with TAK compared to healthy controls. The increase in *Campylobacter gracilis* was strongly correlated with the use of proton pump inhibitors (PPIs), which are administered to prevent side effects of drugs associated with TAK, and the incidence of aortic aneurysm formation and progression-related events was significantly higher among the TAK patients taking PPIs than among those who were negative for *Campylobacter gracilis* (Manabe et al. *Arthritis Res Ther* 2023). Based on these results, we launched a validation study group is collaborating with the 23 medical centers of JPVAS study group to examine the association between *Campylobacter gracilis* and aortic aneurysm formation, including verification of whether PPI oral administration is necessary for TAK patients.

2. Role of gut microbiota alterations and aromatic hydrocarbon receptor signaling in the pathogenesis of pulmonary hypertension

Pulmonary hypertension (PH) is an intractable disease, designated by the MHLW, that causes stenosis or obstruction of distal pulmonary arteries (small arteries) due to unknown cause. We have reported that a signaling axis consisting of IL-6 and its downstream Th17 cells and Th17 cell-derived IL-21 plays a central role in the pathogenesis of PH (Hashimoto-Kataoka et al. *PNAS*2015, Yaku et al. *Circulation* 2022, Ishibashi et al. *PNAS*2024). We focused on the aryl hydrocarbon receptor

(AHR), a transcription factor with an important role in Th17 cell differentiation, and found that AHR has an essential role in the pathogenesis of PH (Masaki et al. *PNAS* 2021). AHR is also known as dioxin receptor and serves as a chemical sensor for organic chemical toxins in the environment which is responsible for induction of detoxification metabolic enzymes. However, the ligands for AHR and the sources remain unknown. We hypothesized that gut microbiota might be involved in the production of AHR ligands derived from diet. We investigated the gut microbiota in the PAH model rats and the PAH patients using 16S metagenomic analysis. Both PAH model rats and patients displayed gut dysbiosis compared to the respective controls. The pathophysiology of PAH model rats significantly improved in the rats treated with antibiotic cocktails to reduce gut microbiota. Furthermore, in the 89 patients with PAH, the prevalence of *Veillonella*, *Streptococcus*, *Rothia*, and other oral bacteria increased, whereas *Alistipes*, *Subdoligranulum*, and other butyrate producing bacteria decreased, compared with the 82 healthy controls. The ectopic colonization of oral bacteria in the gut significantly correlated with the severity of PAH and independently associated with poor prognosis. Next, we transferred fecal microbiota from the PAH patients (PAH-FMT) and healthy controls (HC-FMT) to germ free rats. PAH-FMT rats showed exacerbated monocrotaline-induced PAH pathophysiology along with increased AHR activation, compared to HC-FMT rats. These results indicate that AHR signaling in the intestinal tract is enhanced in PH patients and PH model animals. In addition, oral administration of an AHR inhibitor to patients' FMT rats improved PH pathology, suggesting that PH patients have an altered intestinal microbiota in which oral commensal bacteria increase in the intestinal tract, resulting in enhanced AHR ligand production in the intestinal tract due to their migratory colonization (Asano et al. *manuscript in preparation*). Take together, controlling the alteration of the intestinal microbiota and the associated increment of AHR activity might lead to the development of novel therapies for PH.