

慢性血栓塞栓性肺高血圧症患者における腸内微生物叢の変化と炎症との関連：

日本における単一施設観察研究

研究分担者 坂尾 誠一郎

千葉大学大学院医学研究院 呼吸器内科学 准教授

研究要旨

慢性血栓塞栓性肺高血圧症（CTEPH）の病因は、慢性炎症に関連していると認識されている。ただし基になるメカニズムは未だ不明である。最近、肺動脈高血圧症（PAH）の患者および実験的 PAH モデルで、腸内細菌叢の変化が報告された。この研究の目的は、CTEPH 患者の腸内微生物叢を特徴付け、CTEPH における腸内細菌叢と炎症との関係性を評価することである。この観察研究では、11 人の CTEPH 患者と 22 人の健康な参加者から糞便サンプルが採取された。これらの糞便サンプル中の腸内微生物叢の存在量は、16S リボソームリボ核酸（rRNA）遺伝子配列決定を用いて評価された。炎症性サイトカインとエンドトキシンのレベルも、CTEPH 患者と対照参加者で評価された。血清腫瘍壊死因子- α （TNF- α ）、インターロイキン（IL）-6、IL-8、およびマクロファージ炎症性タンパク質（MIP）-1 α のレベルは CTEPH 患者で上昇していた。血漿エンドトキシンレベルは、CTEPH 患者で有意に高値であり（ $P < 0.001$ ）、TNF- α 、IL-6、IL-8、および MIP-1 α レベルと正の相関があった。16S rRNA 遺伝子配列決定と主要な座標分析により、CTEPH 患者の腸内微生物叢の違い（ $P < 0.01$ ）と対照群の参加者、および CTEPH 患者の細菌のアルファ多様性の減少が明らかになった。腸内細菌叢の違いを予測するためのランダム フォレスト分析では、80.3% の精度が明らかになった。CTEPH 患者の腸内微生物叢の組成は、健康な参加者のそれとは異なり、CTEPH の炎症性サイトカインとエンドトキシンの上昇に関連している可能性がある。

共同研究者：

井窪祐美子、重城喬行、内藤亮、東海林寛樹、三澤智子、須田理香、関根亜由美、杉浦寿彦、重田文子、坂尾誠一郎、田邊信宏、鈴木拓児、巽浩一郎

A. 研究目的

慢性血栓塞栓性肺高血圧症（CTEPH）は、肺高血圧症（PH）の臨床分類グループ 4 に分類されている。CTEPH は、慢性血栓による肺動脈の閉塞を特徴とし、肺動脈圧の上昇、右心不全、最終的には死に至る。肺動脈内膜切除術、バルーン肺血管形成術、および内科的治療などによる治療が 1980 年代から始まり、診断および治療アルゴリズムの進歩が CTEPH 予後の改善に貢献してきた。にもかかわらず、CTEPH は依然として難治性疾患である。低心機能、特定の治療後の持続性 PH、腎不全、および悪性腫瘍を合併した CTEPH の一部症例は、依然として死亡リスクが高い。CTEPH 発生の詳細なメカニズムは完全には理解されていない。そのため CTEPH の病因に焦点を当てた研究が必要となる。

慢性炎症は CTEPH の発生と概念的に関連している。炎症性腸疾患、脾臓摘出術、および悪性腫瘍などの関連する病状は、肺血管リモデリングおよび CTEPH の発症と密接に関連している可能性がある。CTEPH における炎症性サイトカインの上昇は、その病因、血行動態、および予後に関連している可能性がある。他のタイプの PH と比較して明確な病理学的特徴である CTEPH の慢性組織化血栓では、リンパ球、好中球、およびマクロファージなどの炎症細胞の蓄積が観察される。しかし CTEPH における慢性炎症のメカニズムは未だ完全には解明されていない。

異常な腸内細菌叢(dysbiosis)は、心血管疾患の発症に関連している。腸内細菌叢異常は、腸内腔から血流への代謝産物および細菌成分の流入につながる可能性があり、マクロファージの活性化、炎症性サイトカインの放出、血小板の異常な凝集、および泡沫細胞の形成を含む炎症プロセスを誘発する可能性がある。誘発された炎症は、全身性高血圧症、アテローム性動脈硬化症、冠動脈疾患、および慢性心不全の発症に関連している可能性がある。最近の研究では、腸内細菌叢異常が実験動物の PH モデルおよび肺動脈高血圧症 (PAH) の患者に現れ、PAH の発症に原因となる役割を果たしている可能性があると示唆されている。腸内細菌叢異常も CTEPH に存在し、CTEPH の慢性炎症と病因に関連していると仮定した。この研究の目的は、CTEPH 患者の腸内細菌叢を特徴づけることである。この研究では、CTEPH 患者と対照群の参加者から糞便サンプルを採取し、腸内細菌叢の組成を 16S rRNA シーケンスによって分析した。さらに、腸内環境異常と炎症性サイトカインの上昇との関係も評価した。

B. 研究方法

CTEPH 患者と対照参加者：2017 年 10 月から 2020 年 1 月までに千葉大学病院で CTEPH と診断された合計 11 人の患者がこの研究に登録された。この研究では、診断時の CTEPH 患者の臨床データを分析した。すべての CTEPH 患者は、2015 年の欧州心臓病学会/欧州呼吸器学会のガイドラインの基準に従って診断された。画像診断法により確認された持続性肺塞栓症、呼吸困難や胸痛などの症状、有効な抗凝固療法に抵抗して 3 か月以上持続する持続性肺塞栓症を有していた。すべての患者の血行動態データは、右心カテーテル検査を使用して評価された。コントロールの参加者は、国立バイオメディカル イノベーション、健康、栄養研究所のデータベースから選択され、年齢、性別、BMI の点で CTEPH 患者と一致させた。

糞便採取：糞便サンプルの収集とデオキシリボース核酸 (DNA) の分離は、以前に報告されたように行われた。CTEPH 患者の糞便サンプルは、入院時の診断時に右心カテーテル検査の前後 1 週間以内に収集されたが、対照参加者のサンプルは自宅で収集された。糞便サンプルは、グアニジン チオシアネート溶液 (株式会社テクノ駿河研究所、静岡、日本) を含むチューブに入れ、収集後 5 分以内に冷蔵庫に移した。サンプルは、DNA 分離前に 4°C で保存および輸送された。殴打法を用いて糞便サンプルから DNA を単離した。

16S リボソームリボ核酸配列決定：細菌の 16S rRNA の増幅と配列決定は、以前の報告に従って行った。細菌の 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域は、次のプライマーを使用したポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅された。シーケンスアダプターの追加によって。アンプリコンは、Illumina MiSeq プラットフォーム (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) を使用して配列決定された。さらなる分析のために、サンプルごとに合計 10,000 の読み取りがランダムに選択された。読み取り数が不十分なサンプルは再シーケンスされ、読み取り数が不十分なサンプルは除外された。

バイオインフォマティクス分析：得られたペアエンド FASTQ データは、操作上の分類単位 (OTU) を選択する前にトリミングおよびマージされた。OTU 分類と多様性分析は、QIIME パイプライン (v1.9.1) を使用して実行された。FASTQ トリミングから腸内微生物叢の多様性分析までのすべてのステップは、以前に説明された方法に従って自動的に実行された。OTU は、USEARCH アルゴリズムを使用して、97% の類似性で SILVA128 参照データベースに対してクラスター化された。属レベルの分類群 (以下、属と呼ぶ) への分類学的分類は、SILVA 128 参照データベースを使用して実行された。特定の分類名は、SILVA データベース系統分類基準 (<https://www.arb-silva.de/browser/ssu/>) に基づいている。

血漿エンドトキシンの評価：血漿エンドトキシンレベルは、Toxin Sensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript, Piscataway, NJ, USA) を製造元のプロトコルに従って使用して測定した。参加者から血漿サンプルを採取し、標準物質を *Limulus amoebocyte lysate* とインキュベートした後、発色基質とインキュベートした。その後、停止液で反応を停止させ、色安定剤を添加した。最後に、プレートリーダーを使用して 545 nm での吸光度を読み取り、検量線に基づいてエンドトキシンの血清濃度を計算した。

炎症性サイトカインの評価：血清サンプル中の炎症性サイトカインは、製造元の指示に従って、Bio-plex

Pro Human Cytokine 27-plex アッセイ (Bio-Rad、Hercules、CA、US) を使用して分析した。4 倍希釈の血清をビーズおよび抗体とインキュベートし、蛍光強度を Bio-plex システム (Bio-Rad) を使用して測定した。データは、Bio-Plex Manager Software ver. を使用して分析された。6.1 (Bio-Rad) を使用して、標準曲線に基づいてサイトカインの濃度を計算した。

統計分析: Biom テーブル形式の QIIME パイプラインの出力は、R バージョン 3.5.1 (The R Foundation for Statistical Computing、ウィーン、オーストリア) を使用してインポートおよび分析された。アルファ多様性指数は、「phyloseq」R パッケージの estimate_richness 関数を使用して計算された。属レベルのデータを使用して Bray-Curtis 距離によって計算されたベータ多様性指数は、「vegan」R パッケージの vegdist 関数を使用して生成された。dudi を使用して主座標分析 (PCoA) を実行した。

C. 研究結果

参加者の特徴: 対照群と CTEPH 群の年齢、性別、BMI には有意差はなかった。1 人の患者は前立腺癌の病歴があり、別の患者はクローン病の病歴があった。埋め込み型医療機器を使用している患者はいなかった。CTEPH 患者 11 人中 8 人(72.7%)は、診断前に可溶性グアニル酸刺激剤による治療を受けていた。CTEPH 11 人の患者全員が、診断時に抗凝固剤を投与されていた (9 人はワルファリン; リバーロキサバンとエドキサバンそれぞれ 1 人)。糞便サンプルが採取される前に、肺動脈内膜切除術や肺バルーン血管形成術などの特定の侵襲的治療を受けた患者はいなかった。6 人(54.5%)の CTEPH 患者と 2 人(9.01%)の対照参加者がプロトンポンプ阻害剤(PPI)を投与され、その用量は CTEPH 患者で高かった($P < 0.01$)。食事摂取量は 2 つのグループ間で差はなかった。

CTEPH 患者におけるサイトカインの上昇: 炎症性サイトカインは、Bio-plex サイトカインアッセイを使用して最初に評価された。血清腫瘍壊死因子 (TNF) α 、インターロイキン (IL) -6、IL-8、およびマクロファージ炎症性タンパク質 (MIP) -1 α のレベルは、対照参加者よりも CTEPH 患者で有意に高かった。

CTEPH 患者におけるエンドトキシンレベルの上昇: エンドトキシンの血漿濃度を、CTEPH 患者と対照参加者で評価した。エンドトキシンは、グラム陰性菌の細胞膜の構成要素であるリポ多糖であり、腸内腔から血流に移行することができ、炎症性サイトカインの発現と心血管疾患の発症を誘発する可能性がある。エンドトキシン濃度は、コントロール参加者よりも CTEPH 患者の方が有意に高かった($P < 0.001$)。血清 TNF- α 、IL-6、IL-8、および MIP-1 α レベルは、血漿エンドトキシンレベルと正の相関があった (TNF- α : $r = 0.492$ 、 $P < 0.01$; IL-6 : $r = 0.565$ 、 $P < 0.01$; IL-8: $r = 0.425$ 、 $P < 0.05$; および MIP-1 α : $r = 0.481$ 、 $P < 0.01$)。

CTEPH 患者における腸内細菌叢の変化: 16S rRNA シーケンスを実施して、CTEPH 患者と対照参加者の腸内微生物叢の組成を評価した。アルファ多様性に関して、OTU の数とフィッシャー指数は、対照参加者よりも CTEPH 患者で有意に低かった。PCoA 分析により、CTEPH 患者の腸内細菌叢の組成が、対照群の参加者とは異なることが明らかになった ($P < 0.01$ 、図 3c)。Faecalibacterium、Roseburia、および Fusicatenibacter の豊富なレベルは、CTEPH 患者で有意に減少した。エンドトキシン濃度は、これらの細菌の相対量と負の相関があった (フェカリバクテリウム: $r = -0.365$ 、 $P < 0.05$; ロゼブリア: $r = -0.516$ 、 $P < 0.01$; フシカテニバクター: $r = -0.397$ 、 $P < 0.05$)。

ランダムフォレスト分析: 最後に、ランダム フォレストを使用して、CTEPH 患者の腸内微生物叢の成分を対照参加者の成分と区別する予測モデルが作成された。分類ランダム フォレスト予測モデルによる 2 つのグループの腸内細菌叢の違いの検出は、80.3% の精度、89.8% の感度、および 58.9% の特異性を示した。この予測モデルで注目すべき変数として影響を受けた細菌は、Roseburia、Parabacteroides、Faecalibacterium、Prevotella、ラクノスピラ科 NK4A136 グループ、および Porphyromonas 細菌であった。

D. 考察

この研究は、CTEPH 患者の腸内微生物叢を特徴付けた最初の研究である。16S rRNA シーケンシング分析は、CTEPH 患者の腸内細菌叢の組成が対照参加者と比較して異なること、および CTEPH 患者のアルファ多様性が減少していることを示唆した。この発見は、80.3% の精度で区別を示すランダム フォレスト プロットによっても裏付けられた。血漿エンドトキシンレベルは CTEPH 患者で上昇し、TNF- α 、IL-6、IL-8、MIP-1 α などの血清炎症性サイトカインのレベルと正の相関があった。まとめると、我々の結果は、CTEPH 患者は診断時に腸内細菌叢を持っていることを示唆している。さらに、腸内微生物組成の変化は、エンドトキシンおよび炎症性サイトカインの上昇と関連している可能性があった。

CTEPH 患者の腸内微生物叢の組成は、対照群のそれとは異なっていた。最近の研究では、PAH および PH 動物モデル (Sugen 5416/低酸素、モノクロタリン、および低酸素誘発 PH モデルなど) の患者で腸内細菌叢異常が発生することが示唆されている。私たちの知る限りこれは CTEPH 患者の腸内細菌叢の特徴を説明した最初の報告である。PCoA 分析により、CTEPH 患者と対照参加者との間の腸内細菌叢の組成の違いが明らかになり、ランダム フォレスト分析の結果はこの違いを支持した。キムらはランダム フォレスト分析を実行して、PAH 患者と対照参加者の間の腸内微生物叢の違いを検出し、83%の精度を報告した。したがって、腸内微生物叢の分析は、将来、CTEPH を含む PH を検出するための新しいツールになる可能性がある。

この研究では、CTEPH 患者の炎症性サイトカインレベルが上昇していた。CTEPH 患者は、TNF- α 、IL-6、IL-8、および MIP-1 α のレベルが上昇していることはよく知られている。これらは活性化されたマクロファージから分泌される。CTEPH 患者の慢性組織化血栓では、マクロファージの蓄積が好中球の蓄積よりも優勢であることが報告されている。TNF- α は、CTEPH の単核組織因子レベルの上昇を介して凝固に影響を与える可能性があり、急性肺塞栓症から CTEPH への変化に関連している可能性がある。フォン・ヘリングらは、IL-6 が肺血管抵抗と正の相関があることを報告した。高い血清 IL-8 レベルは、肺動脈内膜切除術後の残存 PH の発生および CTEPH 患者の生存率の低さに関連していることが報告されている。マクロファージとマクロファージから放出されるサイトカインが CTEPH の病因に関連している可能性がある。

エンドトキシンレベルは、対照参加者よりも CTEPH 患者で有意に高かった。いくつかの報告では、CTEPH と PAH およびモノクロタリン動物モデルと診断された患者におけるエンドトキシンレベルの上昇が報告されており、これは我々の結果を裏付けている。エンドトキシンは腸管腔から血流に移行する可能性があり、これは腸の透過性の増加に起因する。PAH および実験的 PH モデルの患者で腸透過性の増加が起こることも知られている。エンドトキシンレベルは、腸透過性の増加の間接的な指標となる。したがって、この研究におけるエンドトキシンレベルの上昇は、CTEPH 患者の腸透過性の増加を示している可能性がある。特に、フェカリバクテリウム、ローズブリア、およびフシカテニバクターの相対存在量は、CTEPH 患者で減少し、これらの患者および対照参加者のエンドトキシン レベルと負の相関があった。フェカリバクテリウム、ローズブリア、フシカテニバクターには、抗炎症機能を含むいくつかの生物学的機能があり、腸の恒常性を維持している。ルクレールらは、フェカリバクテリウムの相対的存在量は腸透過性と負の相関があると報告した。Roseburia は、酪酸の産生を介して腸のバリア機能を保護し、制御性 T 細胞と抗炎症性サイトカインの発現を増加させることにより、エンドトキシンによって誘発される腸の炎症を抑制する。フシカテニバクター存在量の減少は、肝硬変患者における酪酸を含む短鎖脂肪酸レベルの減少に関連している。この研究でランダムフォレスト分析によって作成された予測モデルの重要な変数の結果、フシカテニバクターと腸内環境異常との間には関連性がないことが分かったが、Faecalibacterium と Roseburia は、CTEPH 患者を特徴付ける重要な変数であった。比較分析の結果、CTEPH における腸の恒常性と抗炎症機能を保護する役割を持つ細菌の減少は、エンドトキシンとサイトカインのレベルの上昇を介した慢性炎症に関連している可能性がある。

この研究では、エンドトキシンは炎症性サイトカインと正の相関があった。エンドトキシンは、核内因子カプパ B (NF- κ B) シグナル伝達の活性化を介して、マクロファージと内皮細胞を活性化しうる。NF κ B シグナル伝達の活性化は、CTEPH の病因と関連している可能性がある。NF κ B シグナル伝達は、CTEPH 患者の

組織化血栓内の内皮細胞で活性化され、炎症性サイトカインの発現が増加する。最近「代謝性エンドトキシン血症」と呼ばれている腸内毒素症によって誘発されるエンドトキシンの転座は、慢性的な軽度の炎症と心血管疾患の発症に関連している。代謝性エンドトキシン血症も CTEPH の病因に関連している可能性がある。

CTEPH 患者の腸内環境異常が示されましたが、2つの重要な問題が未解決のままである。CTEPH 患者の腸内細菌叢異常の原因は、この研究では不明である。食生活は、腸内細菌叢の変化にとって重要な要素となる。しかし食習慣に関する我々の結果は、CTEPH 患者と対照参加者との間で食事摂取量に違いはなく、腸内細菌叢に対する食事の影響は限定的であることを示唆していた。PPI 治療は、腸内微生物叢の組成にも影響を与える可能性がある。この研究では、対照参加者よりも多くの CTEPH 患者が PPI を使用していた。ただし、サンプルサイズが小さいため、腸内細菌叢への影響は評価できなかった。さらに、これは腸内細菌叢にも何らかの影響を与える可能性がある。さらに、腸内細菌叢が CTEPH の原因なのか結果なのかは不明のままである。心不全と誘発されたうっ血は、腸内細菌叢の変化と腸透過性の増加に関連している可能性があることが報告されている。したがって、腸内細菌叢異常は、CTEPH による右心不全の結果である可能性がある。これらの問題を解決するには、CTEPH および急性肺塞栓症の患者と、CTEPH およびその他の原因による右心機能障害の患者を比較することが役立つ場合がある。

この研究にはいくつかの制限がある。まず、サンプルサイズが小さかった。第二に、この研究の CTEPH 患者と対照群はすべて日本人であった。居住地域の違いと食習慣の違いは、人間の腸内微生物叢の特性に影響を与える可能性がある。したがって、CTEPH 患者における dysbiosis の影響が全体的なものであるかどうかは不明のままとなる。第三に、これは観察研究であった。したがって、腸内細菌叢が上記の CTEPH の原因なのか結果なのかはまだ不明である。第4に、日中の時間と糞便サンプル収集技術は、結果に影響を与えた可能性があるが、参加者に依存していた。これらの制限にもかかわらず、私たちの結果は、CTEPH 患者における腸内細菌叢の存在を示唆しており、CTEPH の病因を理解するための重要な情報を提供すると考える。

E. 結論

本研究では CTEPH 患者は、エンドトキシンと炎症性サイトカインのレベルの上昇に関連している可能性のある腸内細菌叢を持っていることを示唆した。この研究の結果は CTEPH の病因を理解するための新しい視点を提供する可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文

Ikubo Y, Sanada TJ, Hosomi K, Park J, Naito A, Shoji H, Suda R, Sekine A, Sugiura T, Shigeta A, Sakao S, Tanabe N, Mizuguchi K, Kunisawa J, Suzuki T, Tatsumi K. Altered gut microbiota and its association with inflammation in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: A single-center observational study in Japan. *BMC Pulm Med.* 2022;22:138. doi:10.1186/s12890-022-01932-0.

RESEARCH

Open Access



Altered gut microbiota and its association with inflammation in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a single-center observational study in Japan

Yumiko Ikubo^{1†}, Takayuki Jujo Sanada^{1*†}, Koji Hosomi², Jonguk Park³, Akira Naito¹, Hiroki Shoji¹, Tomoko Misawa¹, Rika Suda^{1,4}, Ayumi Sekine¹, Toshihiko Sugiura¹, Ayako Shigeta¹, Hinako Nanri⁵, Seiichiro Sakao¹, Nobuhiro Tanabe^{1,4}, Kenji Mizuguchi^{3,6}, Jun Kunisawa², Takuji Suzuki¹ and Koichiro Tatsumi¹

Abstract

Background: The pathogenesis of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) is considered to be associated with chronic inflammation; however, the underlying mechanism remains unclear. Recently, altered gut microbiota were found in patients with pulmonary arterial hypertension (PAH) and in experimental PAH models. The aim of this study was to characterize the gut microbiota in patients with CTEPH and assess the relationship between gut dysbiosis and inflammation in CTEPH.

Methods: In this observational study, fecal samples were collected from 11 patients with CTEPH and 22 healthy participants. The abundance of gut microbiota in these fecal samples was assessed using 16S ribosomal ribonucleic acid (rRNA) gene sequencing. Inflammatory cytokine and endotoxin levels were also assessed in patients with CTEPH and control participants.

Results: The levels of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, IL-8, and macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α were elevated in patients with CTEPH. Plasma endotoxin levels were significantly increased in patients with CTEPH ($P < 0.001$), and were positively correlated with TNF- α , IL-6, IL-8, and MIP-1 α levels. The 16S rRNA gene sequencing and the principal coordinate analysis revealed the distinction in the gut microbiota between patients with CTEPH ($P < 0.01$) and control participants as well as the decreased bacterial alpha-diversity in patients with CTEPH. A random forest analysis for predicting the distinction in gut microbiota revealed an accuracy of 80.3%.

Conclusion: The composition of the gut microbiota in patients with CTEPH was distinct from that of healthy participants, which may be associated with the elevated inflammatory cytokines and endotoxins in CTEPH.

Keywords: Chronic thromboembolic pulmonary hypertension, Gut microbiota, Inflammation, Cytokines, Gut dysbiosis, Inflammatory cytokines

Background

Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) is a type of pulmonary hypertension (PH) categorized as group 4 PH [1–3]. CTEPH is characterized by the occlusion of the pulmonary arteries with chronic thrombi [1], which leads to the elevation of pulmonary

*Correspondence: naikamo_resp19184@yahoo.co.jp

[†]Yumiko Ikubo and Takayuki Jujo Sanada have contributed equally to this work

¹ Department of Respiriology, Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1, Inohana, Chuo-Ku, Chiba City 260-8670, Japan
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.