

部分加水分解グアーガムは、SU5416/低酸素ラットモデルにおける肺動脈高血圧症の進行を抑制する

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

この研究では、SU5416/低酸素ラットモデルを使用して、肺動脈性高血圧症の発症に対する部分加水分解グアーガム (PHGG) の影響を調査した。我々の結果は、PHGG 治療が腸内細菌叢の組成の変化により肺高血圧症の発症と血管リモデリングを抑制することを示した。

共同研究者：重城喬行、細見 晃司、Jonguk Park、内藤亮、田邊信宏、國澤 純、巽浩一郎、鈴木拓児

A. 研究目的

肺動脈性高血圧症 (PAH) は、肺動脈圧と肺血管抵抗の上昇を特徴とする生命にかかわる疾患で、右心不全となり最終的には死に至る。肺動脈リモデリングは、肺動脈 (PA) の血管内膜における細胞増殖と中膜肥厚を特徴とし、PAH の病理学的所見である。リモデリングが進行すると肺動脈閉塞に至り、肺動脈圧がさらに上昇する。リモデリングは正常と異なる炎症反応によって誘発される。しかし、炎症の起源とそのメカニズムは依然として不明である。

腸内細菌叢は、共生微生物の生態学的コミュニティであり、ビタミンの生成、腸管バリア機能と免疫系の維持に重要な役割を果たしている。腸内細菌叢異常として知られる変化は、心血管疾患の発症に関連している。腸内毒素症は、PAH 動物モデル、PAH および慢性血栓性肺高血圧症の患者で確認されている。腸内毒素症は腸管バリア機能を損ない、エンドトキシンやトリメチルアミン N-オキシドなどの腸内微生物由来の有毒物質の体循環への流入を促進する可能性がある。これは全身性炎症および PAH における肺血管リモデリングの進行を誘発する可能性がある。

部分加水分解グアーガム (PHGG) は、*Cyamopsis tetragonolobus* の卵白から抽出された水様食物繊維である。PHGG は便秘と下痢に効果があり、数十年前から市場で入手可能である。PHGG は短鎖タンパク質の生産を増加させる。我々は、PHGG を使用して腸内細菌叢の異常を改善すると、PAH の発症を軽減できる可能性があるとの仮説を立てた。

この研究は、PAH を有する動物モデルにおける PAH および血管リモデリングに対する PHGG の効果を評価することを目的とした。

B. 研究方法

方法の詳細はサポート情報で説明され、研究デザインは図 S1 に示されている(報告書未掲載)。まず成語集患のすべてのラットをランダムに3つのグループに分けた：対照、SU5416/低酸素ラット (Su/Hx)、PHGG で処理した Su/Hx ラット (Su/Hx+G)。PHGG 粉末を3%の濃度に希釈し、その溶液を飲料水として Su/Hx+G ラットに4週間供給した。対照群と Su/Hx 群には、PHGG を含まない滅菌飲料水を全期間にわたって摂取させた。1週間後、Su/Hx ラットおよび Su/Hx+G ラットに SU5416 (20 mg/kg) を皮下注射し、低酸素状態 (10%O₂) に3週間曝露した。4週間後、すべての動物から糞便サンプルを収集し、30分間凍結し、DNA を分離するまで保存した。右心カテーテル検査を行って右心室収縮期圧 (RVSP) を測定し

た。右心肥大の指標となる、右心室と左心室および中隔の重量比 (RV/LV+S) を計算した。肺血管リモデリングの程度は、以前の報告に従って病理学的に定量化された。

採取した糞便サンプルから DNA を単離し、16S リボソーム リボ核酸の配列決定と分析を以前の報告に従って実施した。詳細はサポート情報の方法に記載されている。

この研究は、千葉大学機器動物利用委員会によって承認された (承認番号 4-355 および 4-379)。この研究は、千葉大学大学院医学系研究科実験動物センター動物研究委員会のガイドラインに従って実施された。

C. 研究結果

RVSP および RV/LV+S は、対照ラットよりも Su/Hx ラットの方が有意に高かった (図 1a, b)。閉塞性血管病変の割合は、対照ラットよりも Su/Hx ラットの方が有意に高く (図 1c)、これは 2 つのグループ間の血行力学的変化と一致していた。PHGG は、Su/Hx グループと比較して、Su/Hx+G ラットの RVSP および RV / LV + S 値を減少させた (図 1a, b)。これは、閉塞性血管病変の割合が Su/Hx グループよりも Su/Hx+G グループの方が有意に低かったという事実によって裏付けられた (図 1c)。病理学的評価では、Su/Hx ラットの結腸の上皮層の萎縮も示されたが、これは Su / Hx + G ラットの PHGG 処理によって抑制された (図 1d-f)。16S rRNA シーケンスにより、コントロール、Su/Hx、および Su/Hx+G グループ間で異なる腸内微生物叢の組成が示された (図 1g)。主な座標分析では、3 つのグループ間で腸内細菌叢の組成が異なることも裏付けられた (図 1h)。ただし、 α 多様性は 3 つのグループ間で異ならなかった。Su/Hx グループと Su/Hx+G グループ間の腸内細菌叢の違いを特徴付けるために、線形判別分析の効果サイズを実行し、Su/Hx+G ラットで特徴付けられた 9 個の細菌と、Su/Hx ラットで特徴付けられた 12 個の細菌を明らかにした (図 1i)。9 つの細菌のうち、Su / Hx + G グループのバクテロイダル S24-7 グループとアッカーマンシア属の相対存在量は、Su / Hx グループと比較して大幅に増加した (図 1j, k)。ただし、Su/Hx+G グループにおけるプレボテラ科 UCG-001、アセチノマキュラム、ルミノコッカス科 UCG-005、クリステンセンネラ科 R-7 グループ、およびルミノコッカス 2 の相対存在量は、Su/Hx グループのものと比較して大幅に減少した。

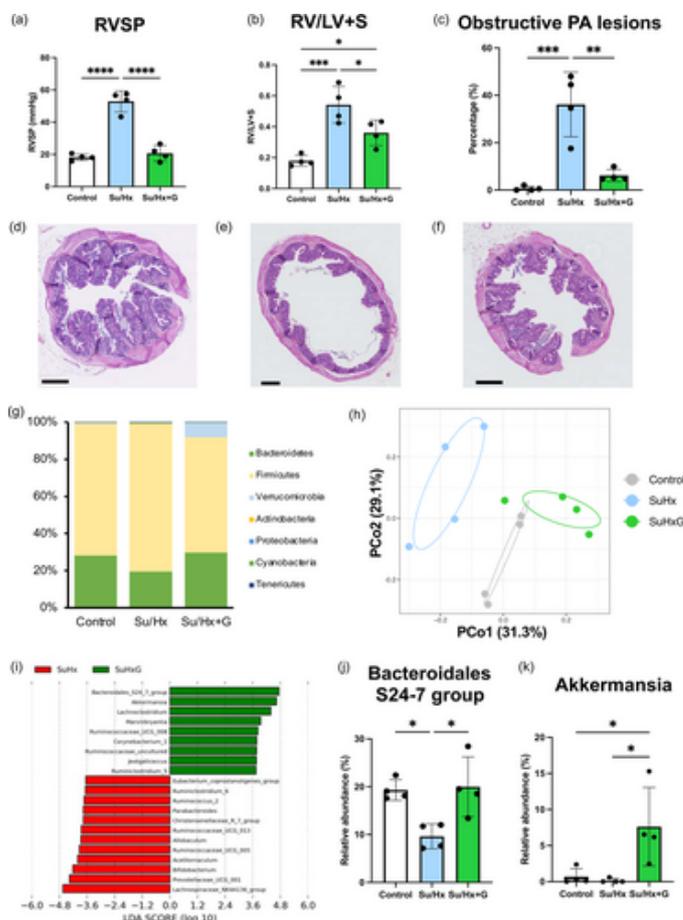


図 1 SU5416/低酸素ラットにおける肺動脈性肺高血圧症に対する部分加水分解グアーガムの効果 (a) 右心室収縮期圧 (RVSP)。 (b) 右心室と左心室および中隔の重量の比 (RV/LV+S)。 (c) 肺野における閉塞性肺動脈の割合。 (d) - (f) ヘマトキシリン エオシン染色で染色された結腸の代表的なスライス: (d) コントロール。 (e) Su/Hx; (f) Su/Hx+G 基。 (g) 腸内細菌叢の相対存在量の平均。 (h) 主座標分析 (多変量分散分析, $p < 0.005$)。 (i) Su/Hx および Su/Hx+G グループにおける線形判別分析の効果量。 LDA スコアの閾値は 3.5 でした。 コントロール、Su/Hx、および Su/Hx+G グループ間の細菌の相対存在量: バクテロイダル目 S24-7 グループ (j) およびアッカーマンシア属 (k)。 PHGG: 部分的に加水分解されたグアーガム。 Su/Hx: SU5416/低酸素; Su/Hx+G: PHGG で治療した Su/Hx ラット。 LDA: 線形判別分析。

D. 考察

この研究では、PHGG 投与が、腸内微生物叢組成の変化に関連する Su/Hx ラットにおける肺血管リモデリングの進行と RVSP の上昇を防止することを発見した。

PHGG は、腸内細菌叢の組成を変化させ、Su/Hx ラットの結腸の萎縮した上皮層を回復させた。PHGG が上皮層およびムチン層への損傷を改善し、炎症反応を抑制できることが知られている。Sakakida らは、PHGG がラットのバクテロイダル目 S24-7 およびアッカーマンシア属の相対存在量を増加させ、腸のバリア機能を回復し、そしてムチン層が厚くなり、これは我々の結果と一致している。アッカーマンシア属とバクテロイダル目 S24-7 はムチンを代謝し、酢酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩などの短鎖脂肪酸を生成する。アッカーマンシア属は腸上皮細胞のツール様受容体 2 も活性化し、密着結合と腸管バリアを改善する。これらの細菌の増加は、PAH に対する PHGG の抑制効果に関連している可能性がある。

PHGG 投与は、Su/Hx ラットにおける PAH の発生を防止した。私たちの以前の研究では、抗生物質を使用して腸内細菌叢を改変すると、Su/Hx ラットの肺高血圧症の発症が抑制されることが実証されており、腸内細菌叢の異常が PAH 発症の原因となっている可能性があることを示しており、腸内細菌叢の回復は PAH の新しい治療選択肢となる可能性がある。しかし、長期にわたる抗生物質治療は患者に害を及ぼす可能性があり、臨床状況に適用できるプレバイオティクス剤ではない。PAH 患者における糞便微生物叢移植に関する第 I 相臨床研究が進行中であるが、この特定の集団におけるこのアプローチの安全性と実現可能性は試験が完了するまで不明のままである。PHGG は臨床現場で広く使用されており、その安全性はすでに証明されている。したがって、PHGG は将来 PAH の進行を予防するための選択肢となる可能性がある。

PHGG による細菌組成の変化の根底にある詳細なメカニズムは、我々の結果からは依然不明のままである。PHGG は、直鎖状に結合した 2 分子の d-マンノースと 1 分子の d-ガラクトース側鎖を持つガラクトマンナンであり、一般の腸内細菌が使用する前に β-ガラクトマンナーゼによって変性する必要がある。生体内での PHGG の変性メカニズムはまだ不明である。しかし、*in vitro* 研究では、ルミノコッカス、ユーバクテリウム、ビフィズス菌など、β-ガラクトマンナーゼを持ついくつかの細菌が PHGG を発酵できることが示された。さらにアッカーマンシアおよびバクテロイデス S24-7 は PHGG を直接利用していないようである。詳しいメカニズムは今後研究する必要がある。

この研究にはいくつかの制限があった。第一に、ラットの腸内細菌叢の構成はヒトの腸内細菌叢と比較して全く異なるため、この結果が人間の PAH 患者に適用できるかどうかは不明である。この研究では、PAH に対する PHGG の効果は PAH 患者のみで調べられた。動物モデルではあるが、人間の患者ではそうではない。したがって、ヒトの PAH 患者に対する影響を調査する将来の臨床研究が必要である。第二に、この研究で実証された PHGG の効果は予防的であったが、治療的ではなかった。Su/Hx モデルの 0 ~ 3 週目は、正常状態から肺高血圧症への疾患進行の段階に相当する。PAH に対する PHGG の治療効果を評価するために、投与後 3 週間の Su/Hx ラットに PHGG を投与するさらなる実験が必要である。

E. 結論

結論として、PHGG 治療は Su/Hx 動物モデルにおける PAH の進行を抑制した。PHGG による腸内細菌叢の改変は、肺動脈リモデリングおよび PAH の抑制に関連している可能性がある。したがって、PHGG は PAH の発症を抑制するための潜在的なプレバイオティクス薬剤である可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文

Sanada TJ, Hosomi K, Park J, Naito A, Sakao S, Tanabe N, Kunisawa J, Tatsumi K, Suzuki T.

Partially hydrolyzed guar gum suppresses the progression of pulmonary arterial hypertension in a SU5416/hypoxia rat model. *Pulm Circ.* 2023 Jul 12;13(3):e12266.

Partially hydrolyzed guar gum suppresses the progression of pulmonary arterial hypertension in a SU5416/hypoxia rat model

Takayuki J. Sanada^{1,2} | Koji Hosomi¹ | Jonguk Park³ | Akira Naito² | Seiichiro Sakao² | Nobuhiro Tanabe^{2,4} | Jun Kunisawa^{1,3,5,6,7,8,9,10,11} | Koichiro Tatsumi² | Takuji Suzuki²

¹Laboratory of Vaccine Materials and Laboratory of Gut Environmental System, Microbial Research Center for Health and Medicine, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN), National Institutes of Biomedical Innovation, Health, and Nutrition (NIBIOHN), Osaka, Japan

²Department of Respiriology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan

³Artificial Intelligence Center for Health and Biomedical Research, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN), Osaka, Japan

⁴Department of Respiriology, Chibaken Saiseikai Narashino Hospital, Narashino, Japan

⁵Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan

⁶Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

⁷Graduate School of Dentistry, Osaka University, Osaka, Japan

⁸Graduate School of Science, Osaka University, Osaka, Japan

⁹Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Medicine, Kobe University, Hyogo, Japan

¹⁰International Vaccine Design Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan

¹¹Research Organization for Nano and Life Innovation, Waseda University, Tokyo, Japan

Correspondence

Takayuki J. Sanada, Laboratory of Vaccine Materials and Laboratory of Gut Environmental System, Microbial Research Center for Health and Medicine, National Institutes of Biomedical Innovation, Health, and Nutrition (NIBIOHN), 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan.
Email: jujo-sanada@nibiohn.go.jp

Funding information

Ministry of Health and Welfare of Japan, and public/private R&D investment strategic expansion program PRISM, Grant/Award Number: 20AC5004; The Japan Agency for Medical Research and Development (AMED), Grant/Award Number: JP20gm1010006h0004; A Grant-in-Aid for

Abstract

This study investigated the effects of partially hydrolyzed guar gum (PHGG) on the development of pulmonary arterial hypertension using a SU5416/hypoxia rat model. Our results demonstrated that PHGG treatment suppressed the development of pulmonary hypertension and vascular remodeling with an altered gut microbiota composition.

KEYWORDS

Akkermansia, bacteroidetes S27-7, dietary fiber, gut dysbiosis, prebiotics

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2023 The Authors. *Pulmonary Circulation* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Pulmonary Vascular Research Institute.