

## 抗生剤投与による腸内細菌の死滅は腸肺相関を介して LPS 誘発性急性肺障害を改善する

研究分担者 鈴木拓児  
千葉大学大学院医学研究院呼吸器内科学 教授

### 研究要旨

急性肺損傷 (Acute Lung Injury, ALI) は、急性呼吸不全を引き起こす致死的な炎症性疾患であり、肺胞への好中球浸潤や肺胞上皮、毛細血管内皮への障害が要因とされている。腸内細菌叢は呼吸器疾患との関連が示唆されているが、ALI との関連の詳細は不明である。そこでマウス ALI モデルにおける腸内細菌叢の変動を解析し、短鎖脂肪酸との関連やメタボローム解析についての検討をおこなった。マウスにあらかじめ抗生物質カクテル (ABX) あるいは水 (Vehicle) を 14 日間投与後に LPS を気管内投与して ALI モデルを作成した。Vehicle + LPS 群と ABX+LPS 群において、肺病理の HE 染色における肺障害スコア、気管支肺胞洗浄液の細胞数・総タンパク量・LDH 活性・IL-6 において有意差を認め、ABX による腸内細菌の死滅が肺障害を抑制することが示唆された。ABX + LPS グループの潜在的な微生物マーカーとして、*Enterococcus faecalis*、*Clostridium tertium*、および *Bacteroides caecimyrus* が特定され、メタボロミクス解析では特定の代謝産物が同定された。腸内細菌叢は代謝産物を介して急性肺障害の病態に関与することが示唆された。

共同研究者

橋本弥永子、橋本謙二

### A. 研究目的

急性肺損傷 (Acute Lung Injury, ALI) は、急性呼吸不全を引き起こす致死的な炎症性疾患である。肺胞への好中球浸潤や肺胞上皮、毛細血管内皮への障害が要因とされているが、明らかな病態メカニズムは不明である。本研究では急性肺障害における腸内細菌叢の役割について解析した。

### B. 研究方法

抗生剤カクテル(ABX) (アンピシリン 1g/L、ネオマイシン 1g/L、メトロニダゾール 1g/L) あるいは水 (Vehicle) を 14 日間投与して腸内細菌を死滅させたマウスに対してリポポリサッカライド (LPS) を気管内投与して LPS 誘発性急性肺障害モデルを作成し解析した。肺組織、気管支肺胞洗浄液、血液および糞便を採取し、肺の病理学的検討、各々のバイオマーカー検索、糞便中の 16s rRNA 解析と短鎖脂肪酸の測定および血液中のメタボロミクス分析をおこなった。

### C. 研究結果

LPS 投与前に抗生剤カクテルを投与した群 (ABX+LPS 群) では、コントロール群 (Vehicle +LPS 群) に比べて肺病理の HE 染色における肺障害スコア、気管支肺胞洗浄液の細胞数・総タンパク量・LDH 活性・IL-6 値において有意に軽減していた。Vehicle +LPS 群と ABX+LPS 群の腸内細菌叢の  $\alpha$  多様性と  $\beta$  多様性に有意差を認めた。LEfSe 分析により、ABX + LPS グループの潜在的な微生物マーカーとして、*Enterococcus faecalis*、*Clostridium tertium*、および *Bacteroides caecimyrus* が特定された。非標的メタボロミクス分析により、ABX+LPS 群から Vehicle +LPS 群を判別するような、いくつかの血漿代謝物 (5-[(4-nitrobenzoyl)amino] isophthalic acid、2,2'-(2-hydroxyethylazanediyl)diacetic acid、coumatetralyl、

histidine、N- $\alpha$ -(tert-butoxycarbonyl)-L-histidine) が特定された。腸内微生物叢の相対存在量と血漿代謝産物の間には相関関係があった。統合ネットワーク分析では気管支肺胞洗浄液の IL-6 レベルといくつかの腸内微生物 (または血漿代謝産物)の相関性を示した。

#### D. 考察

抗生剤カクテル投与により腸内細菌叢の  $\alpha$  多様性と  $\beta$  多様性に変化を生じ、おそらく腸内細菌叢由来の代謝物を介して LPS 誘発性肺障害を抑制することが示された。

#### E. 結論

抗生剤カクテルの投与で腸内細菌を枯渇させることにより、腸—細菌叢—肺の関連を介して、LPS 誘発性急性肺障害から肺を保護できる可能性が示唆された。腸内細菌叢は急性肺障害の病態に関連する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文

Hashimoto Y, Eguchi A, Wei Y, Shinno-Hashimoto H, Fujita Y, Ishima T, Chang L, Mori C, Suzuki T, Hashimoto K. Antibiotic-induced microbiome depletion improves LPS-induced acute lung injury via gut-lung axis. *Life Sci.* 2022 Oct 15; 307:120885.



## Antibiotic-induced microbiome depletion improves LPS-induced acute lung injury via gut-lung axis

Yaeko Hashimoto<sup>a,b,\*</sup>, Akifumi Eguchi<sup>c</sup>, Yan Wei<sup>b,1</sup>, Hiroyo Shinno-Hashimoto<sup>b,d</sup>, Yuko Fujita<sup>b</sup>, Tamaki Ishima<sup>b</sup>, Lijia Chang<sup>b</sup>, Chisato Mori<sup>c,e</sup>, Takuji Suzuki<sup>a</sup>, Kenji Hashimoto<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Respiriology, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba 260-8670, Japan

<sup>b</sup> Division of Clinical Neuroscience, Chiba University Center for Forensic Mental Health, Chiba 260-8670, Japan

<sup>c</sup> Department of Sustainable Health Science, Chiba University Center for Preventive Medical Sciences, Chiba 263-8522, Japan

<sup>d</sup> Department of Dermatology, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba 260-8670, Japan

<sup>e</sup> Department of Bioenvironmental Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba 260-8670, Japan

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Acute lung injury  
Microbiota  
ARDS  
LPS  
Lung gut axis

### ABSTRACT

**Aims:** Acute lung injury (ALI) is an acute inflammatory disorder. However, the precise mechanisms underlying the pathology of ALI remain elusive. An increasing evidence suggests the role of the gut-microbiota axis in the pathology of lung injury. This study aimed to investigate whether antibiotic-induced microbiome depletion could affect ALI in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration.

**Main methods:** The effects of antibiotic cocktail (ABX) on ALI in the mice after intratracheally administration of LPS (5 mg/kg) were examined. Furthermore, 16s rRNA analysis and measurement of short-chain fatty acids in feces samples and metabolomics analysis of blood samples were performed.

**Key findings:** LPS significantly increased the interleukin-6 (IL-6) levels in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of water-treated mice. Interestingly, an ABX significantly attenuated the LPS-induced increase in IL-6 in BALF and lung injury scores. Furthermore, ABX and/or LPS treatment markedly altered the  $\alpha$ - and  $\beta$ -diversity of the gut microbiota. There were significant differences in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -diversity of the water + LPS group and ABX + LPS group. LEfSe analysis identified *Enterococcus faecalis*, *Clostridium tertium*, and *Bacteroides caecimyrus* as potential microbial markers for ABX + LPS group. Untargeted metabolomics analysis identified several plasma metabolites responsible for discriminating water + LPS group from ABX + LPS group. There were correlations between the relative abundance of the microbiome and plasma metabolites. Integrative network analysis showed correlations between IL-6 levels in BALF and several gut microbes (or plasma metabolites).

**Significance:** These data suggest that ABX-induced microbiome depletion could protect against LPS-induced ALI via the gut-microbiota-lung axis.

### 1. Introduction

Acute lung injury (ALI) is a critical illness syndrome of acute respiratory failure causing a substantial morbidity and mortality. Patients who recovered from ALI have long-term adverse effects on their quality of life. A prospective, population-based cohort study showed that the

incidence of ALI in the United States was 78.9 per 100,000 persons-years, and the in-hospital mortality rate was 38.5 % [1]. Although inflammatory injuries to the endothelium and epithelium plays a major role in the pathogenesis of ALI, its precise pathogenesis remains unclear [2,3].

Multiple evidence suggest that the gut microbiome plays an

**Abbreviations:** ABX, antibiotic cocktail; ALI, acute lung injury; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; LPS, lipopolysaccharide; SCFAs, short chain fatty acids.

\* Corresponding authors at: Division of Clinical Neuroscience, Chiba University Center for Forensic Mental Health, 1-8-1 Inohana, Chiba 260-8670, Japan.

**E-mail addresses:** [yaekoh@chiba-u.jp](mailto:yaekoh@chiba-u.jp) (Y. Hashimoto), [hashimoto@faculty.chiba-u.jp](mailto:hashimoto@faculty.chiba-u.jp) (K. Hashimoto).

<sup>1</sup> Present address: Key Laboratory of Medical Electrophysiology of Ministry of Education and Medical Electrophysiological Key Laboratory of Sichuan Province, Collaborative Innovation Center for Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease, Institute of Cardiovascular Research, Southwest Medical University, Luzhou, 646000, Sichuan, China.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120885>

Received 8 June 2022; Received in revised form 2 August 2022; Accepted 11 August 2022

Available online 16 August 2022

0024-3205/© 2022 Published by Elsevier Inc.

