

# “食”による腸管免疫修飾を介した新規動脈硬化予防法の開発

山下 智也

神戸大学大学院医学研究科内科学講座循環器内科学分野 助教（現：講師）

## 緒言

動脈硬化は慢性の炎症性疾患であるとされており、様々な免疫細胞・サイトカイン・ケモカインなどの病態への関与が報告されている。しかし、臨床の現場においては、炎症や免疫反応に直接介入する動脈硬化性疾患の予防法はない。我々は動脈硬化性疾患の予防や治療のために炎症免疫反応を制御するという戦略が、期待される次世代の動脈硬化予防法になると考えて研究を進めている。最近、腸管からの免疫制御にて主に制御性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg) と樹状細胞 (dendritic cell; DC) の機能修飾を介した新規動脈硬化予防法を開発した。これにて“腸管からの免疫修飾により動脈硬化が予防できる”という新たな疾患予防の概念を提唱し、その可能性を示すことができた。すなわち、我々の研究グループは、腸管が動脈硬化の治療ターゲットになる可能性を初めて報告しており、さらに経口投与物質（薬物・食品など）による動脈硬化予防効果をスクリーニングして、新たな予防法の開発をめざしている。

最近、腸管免疫に影響する腸内細菌叢（腸内フローラ）と肥満やメタボリック症候群との関連が報告され注目されている。本研究では、食事成分が腸内フローラに及ぼす影響を臨床でも使用できる解析方法を用いて検討し、同時に行う腸管免疫細胞の機能解析や表現型の変化などの免疫機能解析結果との関連を解析し、関連性を検討する。特に本研究では、腸内フローラに影響を与える可能性のあるプロバイオティクスに注目した研究を進めており、「動脈硬化」「腸管免疫」「腸内フローラ」の3要素の関連を検討することも考慮した。

## 目的

この研究の目的は、経口である食成分を摂取することにより、腸管から免疫担当細胞機能を制御する新規の動脈硬化予防法を開発し、その詳細な機序を解明することにより、最終的に臨床応用して患者に還元することである。

さらに腸管免疫修飾と関連性が高いことが予想される、腸内細菌叢の差異や変化も同時に調査研究し、新規の治療ターゲットの創出も目指すものである。新規の心血管病予防のための腸管細菌関連検査法、腸管免疫修飾療法などが臨床応用できれば、社会貢献できてその意義は非常に大きい。

## 実験方法

動脈硬化モデル動物のアポリポ蛋白 E 遺伝子欠損 (apoE-KO) マウスを使用して、プロバイオティクス (Lactobacillus or Bifidobacterium) や他の治療介入物質 (健康食品物質ウコンの主成分であるクルクミン) の投与を開始して、8週間継続する。

本実験においては、8週齢から乾燥粉末に調整して保護剤を混入させたある乳酸菌 P を粉末にした食餌 (CE-2; クレア) に混入して、マウスに8週間投与した。乳酸菌数として、 $7.65 \times 10^9$  cfu/day で経口投与することになるように、餌との混入比率を調整した。コントロールとしては、同比率で保護剤が混入している条件で同じ粉末食を投与した。

体重の変化は毎週行い、血清脂質への影響は sacrifice 時に血液を採取して評価した。動脈硬化巢の定量は、大動脈弁直上に形成された部分を 100 $\mu$ m おきに 5 スライスの標本を作成して、その平均で評価した。

同時に、主に腸管免疫に対しての乳酸菌経口摂取の影響を検討する。腸間膜リンパ節と脾臓の免疫細胞の機能解析免疫機能に与える作用を検討した。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 制御性 T 細胞 (Treg) の比率、CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> または免疫寛容性樹状細胞 CD11c<sup>+</sup>CD80<sup>-</sup>CD86<sup>-</sup> (tolerogenic dendritic cell; tDC) の比率の測定をそれぞれ特異的な抗体を使用して行った。

さらに、近年腸管免疫調節に関わるという報告がある腸内細菌叢の解析を、糞便を用いて T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法で行

う。T-RFLP 解析とは、マウス糞便中の細菌 DNA を PCR にて増幅し、制限酵素で切断したフラグメントサイズの組み合わせと定量解析にて菌群の種類と存在量を、主な腸内細菌について網羅的に同定する方法である。

## 結 果

乳酸菌 P の投与によっては、マウスの体重の増加や、血清脂質に影響は与えなかった (Data not shown)。

16 週齢での apoE-KO マウスの大動脈弁直上の動脈硬化巣を定量評価した。乳酸菌 P 投与によっては、動脈硬化巣の面積には有意な影響を与えなかった (Control  $3.03 \pm 0.49 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ , P  $3.69 \pm 0.82 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ; 図 1)。

腸管免疫を修飾する物質により、腸間膜リンパ節や脾臓の Treg の存在比率が増加するとする報告があり、フローサイトメトリーによって、脾臓、腸間膜リンパ節の Foxp3 陽性もしくは CD25 陽性の Treg の存在比率について検討した。乳酸菌 P 投与によって、これらの Treg に優位に影響を与えないことが分かった (図 2)。さらに、腸管免疫の中で重要な役割を担っている tDC に与える

影響を検討するため、CD11c 陽性細胞の中の CD80 と CD86 陽性細胞の比率をフローサイトメトリーで検討した。脾臓、腸間膜リンパ節の CD80 陽性もしくは CD86 陽性の tDC に優位な比率の変化は認めなかった (Data not shown)。

T-RFLP 法により、マウス糞便内に含まれる細菌の属種を定量した (図 3)。

健康食品物質ウコンの主成分であるクルクミンを、上記の乳酸菌と同様のプロトコルで、apoE-KO マウスに投与を行い、非投与コントロール群と比較したが、動脈硬化抑制効果は認められなかった (Data not shown)。

## 考 察

我々は、基礎的な動脈硬化免疫研究を行ってきた背景をもと、いち早く動脈硬化と腸管免疫の研究を開始し、世界に先駆けて「腸管から動脈硬化を予防する」という概念を確立した<sup>1,2)</sup>。この概念の発展として、食事成分によって、その経口投与により腸管免疫機能を変化させ

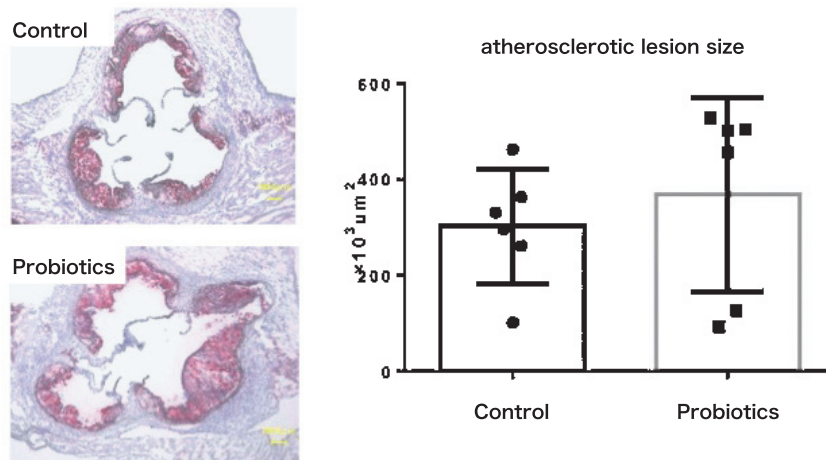


図 1 乳酸菌 P の動脈硬化形成に与える影響の検討

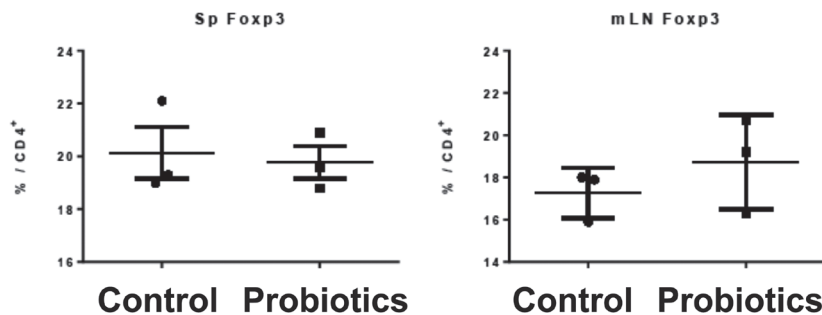


図 2 乳酸菌 P の免疫機能 (制御性 T 細胞の比率) への影響

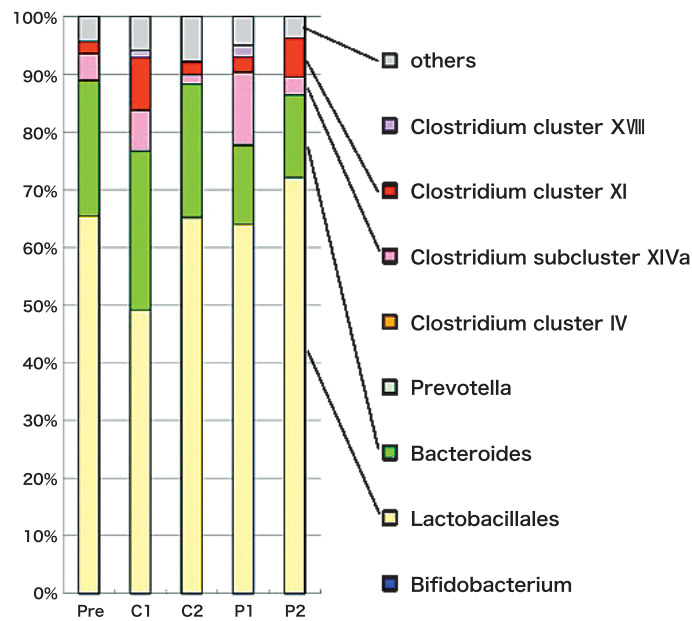


図3 乳酸菌 P の腸内フローラへの影響の検討

る食事物質が同定できれば、その成分投与により、医療（薬剤）に頼らない疾患予防法が確立できると考えて研究を進めている。本研究課題で行った研究は、まさにその研究の中のひとつである。

残念ながら、今回の実験で使用した乳酸菌 P とクルクミン成分の経口投与では、腸管での優位な免疫変化や動脈硬化抑制作用は認められなかった。

### 要 約

食による、動脈硬化予防を目指して研究を行った。本研究課題内では、プロバイオティクスとしての乳酸菌と健康食品として食されているウコンの成分クルクミンを投与して、動脈硬化へ与える影響を検討した。残念ながら、マウスにおいて動脈硬化抑制作用は認められず、

腸管免疫修飾作用も証明できなかった。食による動脈硬化予防法の確立を目指して、引き続き研究を進めていきたい。

### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人三島海雲記念財団による研究助成を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Takeda M, et al. : *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* , 30, 2495-2503, 2010.
- 2) Sasaki N, et al. : *Circulation.* , 120, 1996-2005, 2009.