

助成番号 27-2-33

心不全モデルマウスを用いた心腸連関の病態究明

国立循環器病研究センター 臨床研究開発部
中島 友里

1. 諸言

近年の医療の進歩にもかかわらず、心不全は依然として死亡率の高い疾患である。心不全は単一疾患ではなく、その血行動態の異常が全身の臓器へ影響を及ぼし、病態を複雑化させることが治療を困難にする一因である。心不全におけるこのような複雑な病態を理解するために、他臓器との連関を究明することは、新たな病態解明や治療法を検討するうえで非常に重要である。

腸は消化吸収だけでなく、人体最大の免疫機能を担う臓器である。また、腸内細菌は、多彩な代謝機能による宿主へのエネルギー源供給、腸管上皮細胞や免疫細胞の分化や成熟化、腸内環境の恒常性維持、病原菌に対する感染防御などに関与し、ヒトにおける健康の維持と調整に重要な働きをしている。腸は、心不全に伴う虚血やうっ血の影響を受けやすく、心不全患者では腸の透過性が亢進し、血液中で腸内細菌由来のエンドトキシンや炎症性サイトカインが上昇することが報告されている¹⁻²⁾。また、腸内細菌叢の解析では、心不全で腸内細菌叢の多様性が減ることや、特定の菌が有意に増減することなどが報告されている²⁻³⁾。しかし、このような腸の形態的・機能的変化や腸内細菌叢の変化が心不全の病態に及ぼす影響については十分に解明されていない。

われわれはこの〔心腸連関〕の病態究明のために、8週間の大動脈縮窄（TAC）による圧負荷心不全モデルマウスを用いた包括的な検討を行った。腸管の中でも、とくに免疫機構や消化吸収など機能的に豊富な小腸に着目して、心不全が小腸の形態や機能、腸内細菌叢の変化にどのような影響を及ぼすかを検討した。

2. 方法

通常食にて個別に飼育した8週齢オスのC57BL/6Jマウスを用い、TACによる圧負荷心不全モデルを作製した。具体的には、マウスを混合麻酔薬で麻酔維持し、挿管のうえ人工呼吸器で管理をし、開胸手術を行った。TAC群に対しては腕頭動脈と左総頸動脈の間を27ゲージの針とともに7-0絹糸で結紮した後に針を抜くことで縮窄を作製し、閉創した。sham

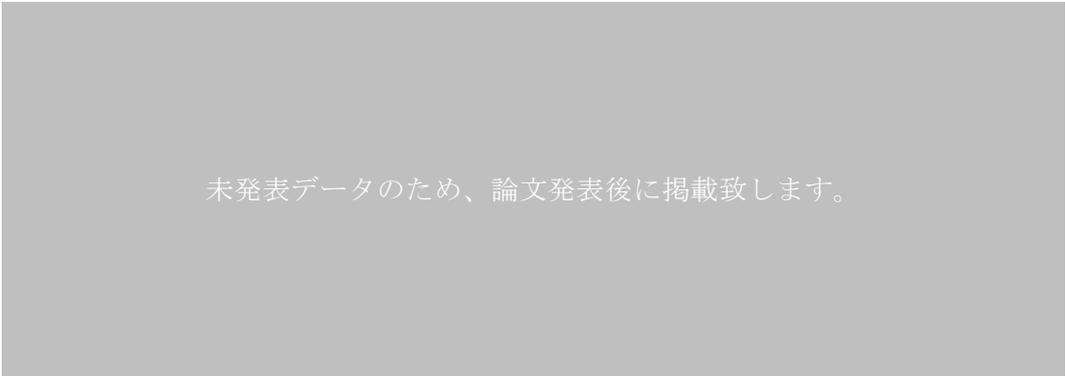
群に関しては、縮窄すること以外に関して同じ開胸手術を行った。術後 8 週目に心エコーで心機能評価を、腹部エコーにて小腸の壁厚の計測を行った後、血液・小腸・便サンプルを回収した。血液サンプルは Bio-Plex™ マルチプレックスアッセイ (Bio-Rad 社製) にて炎症性サイトカインの測定を行った。小腸サンプルに関しては、重量を測定して浮腫の程度を評価した。さらに、組織学的評価として、絨毛の萎縮の有無について定量評価を行った他、免疫染色にて粘膜バリア機構の評価や、マクロファージなどの炎症細胞の浸潤の有無、さらにアポトーシス細胞の有無についても評価を行った。便サンプルは 16S rRNA 解析にて腸内細菌叢の網羅的な解析を行い、着目する菌についてはショットガンメタゲノム解析にて種レベルまでの同定を行うことで詳細な検討を行った。

3.結果

3.1 評価対象と心機能評価

術後 8 週目の評価では、TAC 群 (N=4) は sham 群 (N=4) と比較して有意な心重量、肺重量の増加を認めた。肝臓重量に関しては、両群で有意な差は認めなかった。心エコーでは TAC 群で有意な左室拡張末期径および左室収縮末期径の増加、左室収縮能の低下を認めた (図 1)。

小腸の wet/dry 重量比や腹部エコーで評価した小腸の壁厚には両群に明らかな差はなく、小腸浮腫の存在については明らかではなかった。



未発表データのため、論文発表後に掲載致します。

図 1. TAC に伴う心機能の変化

3.2 小腸の組織学的評価および炎症反応の評価

小腸の組織所見では、TAC 群で有意な絨毛の萎縮を認めた (図 2)。統計学的に有意差はなかったものの、TAC 群で線維化が増加する傾向にあった。腸管上皮の物理的バリア機構であるムチンの産生を担う杯細胞の数は、TAC 群で増加する傾向にあった。一方で、タイトジャンクション構成タンパクである Claudin-1 の発現については、明らかな有意差を認めなかった。Toll-like receptor 4 (TLR4) は、グラム陰性菌の主成分である lipopolysaccharide (LPS) をリガンドとして認識する受容体であるが、小腸上皮における TLR4 の発現に関して両群で有意な差は認めなかった。また、血液中の炎症性サイトカインや LPS の濃度に関しても、両群で有意な差は認めなかった。

未発表データのため、論文発表後に掲載致します。

図 2. TAC に伴う小腸の組織学的変化

3.3 腸内細菌叢の評価

16S rRNA メタゲノム解析にて腸内細菌叢の評価を行った。門レベルでの比較では両群とも *Firmicutes* 門と *Bacteroidetes* 門が大半を占めていたが、腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) の指標である *Firmicutes/Bacteroidetes* 比については両群で有意な差は認めなかった。属レベルでの比較では、TAC 群で ██████████ が 10%以上の有意な増加を示した。また、有意ではないものの ██████████ が TAC 群で増加する傾向にあった。██████████ は TAC 群で有意に減少した。ショットガンメタゲノム解析では、TAC 群で有意な増加を認めた ██████████ の菌種の配列は既知のものとは低い相同性を示し、新規の細菌種であることが示唆された。

未発表データのため、論文発表後に掲載致します。

図 3. TAC に伴う腸内細菌叢の変化

4. 考察

今回、重度の左心不全を呈した TAC マウスにおいて有意な小腸絨毛の萎縮が認められ、腸内細菌叢の解析では TAC マウスで有意に変動する 4 種の菌を同定し、最も有意な増加を認めたのは新種の [REDACTED] であった。

心不全ではその血行動態の異常から腸管バリア機能の低下をもたらし、LPS や細菌の translocation を引き起こし、全身性の炎症が惹起される可能性が示唆されているが、これは心不全に普遍的な現象ではない。これまでの報告では、浮腫性の心不全患者では健常対照者と比較して血清 LPS および炎症性サイトカインの有意な上昇がみられたが、非浮腫性の心不全患者では有意な変化はみられなかったとされている^{1,4)}。今回の心不全モデルでは、肺うっ血を伴う重度の左室収縮不全、それに伴う小腸上皮の萎縮を認めたが、腸管浮腫や肝うっ血は認められなかったことから、腸管バリアの破綻と腸管由来の全身性の炎症は体うっ血を伴う心不全の特徴であることが示唆された。

TAC による心不全モデルマウスの腸内細菌叢の変化についてはいくつか報告があるものの、これまで一貫した見解は得られていない。Boccella らは TAC 4 週間後の心不全モデルマウスの特徴として、*Bifidobacterium* 属、*Lactobacillus* 属、*Turicibacter* 属の増加を報告している⁵⁾。今回の結果においても [REDACTED] が有意に増加しており、病態との関連が考えられた。今後、無菌マウスや抗生剤処理マウスを用いた研究にて、この新種の菌と心不全との関連についてさらなる検討が望まれる。

5. 結語

TAC による重度低心機能のモデルマウスにおいて、有意な小腸絨毛の萎縮がみられ、特徴的な腸内細菌叢の変化がみられた。とくに、[REDACTED] については心不全の病態との関連が示唆された。

6.文献

- 1) Niebauer J, Volk H.D, Kemp M, Dominguez M, Schumann RR, Rauchhaus M et al. Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet*. 1999; 353: 1838-1842.
- 2) Sandek A, Bauditz J, Swidsinski A, Buhner S, JWeber-Eibel J, von Haehling S et al. Altered intestinal function in patients with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2007; 50: 1561-1569.
- 3) Luedde M, Winkler T, Heinsen FA, Rühlemann MC, Spehlmann ME, Bajrovic A et al. Heart failure is associated with depletion of core intestinal microbiota. *ESC Heart Fail*. 2017; 4: 282-290.
- 4) Sandek A, Bjarnason I, Volk HD, Crane R, Meddings JB, Niebauer J et al. Studies on bacterial endotoxin and intestinal absorption function in patients with chronic heart failure. *Int. J. Cardiol*. 2012; 157: 80-85.
- 5) Boccella N, Paolillo R, Coretti L, D'Apice S, Lama A, Giugliano G et al. Transverse aortic constriction induces gut barrier alterations, microbiota remodeling and systemic inflammation. *Sci. Rep*. 2021; 11: 7404.

7.成果発表

未発表