

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07439

研究課題名(和文)腸内細菌をターゲットとした脳血管障害の新たな病態解明と治療

研究課題名(英文)Role of the gut microbiota in acute cerebral ischemia

研究代表者

山城 一雄 (YAMASHIRO, Kazuo)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00348921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌叢が脳梗塞急性期に与える影響とその機序について解析した。糖尿病(db/db)マウスでは正常(db/+)マウスと比較して、便中Enterobacteriaceae菌数、血中Lipopolysaccharide(LPS)濃度、腸管透過性が上昇し、脳梗塞24時間後の運動機能障害および脳梗塞体積も増加していたが、非吸収性抗生物質ポリミキシンB(PL-B)経口投与により、これらは血糖値とは無関係に有意に改善した。また脳梗塞巣のLPS、TLR4、炎症性サイトカインの発現も低下した。腸内細菌叢の異常に伴う高LPS血症が、脳梗塞急性期においてTLR-4を介した炎症を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of the gut microbiota on acute ischemic brain injury. Fecal Enterobacteriaceae counts, plasma lipopolysaccharide (LPS) levels, and intestinal permeability were higher in db/db than in db/+ mice, which were reduced by oral administration of a non-absorbable antibiotic, polymyxin B (PL-B) in db/db mice without changing their plasma glucose levels. Infarct volume was smaller and neurological functions were better at 24 hours after cerebral ischemia in db/db mice that received PL-B compared to that in those did not. LPS and toll-like receptor (TLR) 4 were detected in the microglia, endothelial cells, and neurons at the ischemic zone border by immunohistochemistry. Levels of LPS, TLR4, inflammatory cytokines in the ischemic hemisphere were higher in db/db than in db/+ mice, which were reduced by PL-B. Our data suggest that gut dysbiosis leads to increased circulating LPS levels, thereby inducing TLR4-mediated inflammation in acute cerebral ischemia.

研究分野：神経学

キーワード：脳梗塞 腸内細菌 Lipopolysaccharide トル様受容体 炎症

1. 研究開始当初の背景

腸管と脳との双方向性の関連、すなわち腸脳連関は神経疾患の病態解明、さらには治療ターゲットとして注目されている。とりわけ腸内細菌は、腸脳連関において重要な役割を担っている。脳梗塞は運動麻痺などの重度後遺症を残すことが少なくなく、要介護の主要な原因であり健康寿命に甚大な影響を及ぼす。しかしながら脳梗塞の組織障害を抑制し、後遺症を軽減するための治療法はいまだ不十分であり、新たな視点からの病態解明と治療法の確立が必要である。

近年、脳梗塞における腸脳連関について、いくつかの研究結果が報告されている。腸内細菌は腸管の T 細胞の分化制御を介して、脳梗塞急性期の組織障害に関与している (1)。また脳梗塞は自律神経系を介して腸内細菌叢の異常を引き起こす (2)。さらには脳梗塞急性期には腸管バリアの破綻によるバクテリアトランスロケーションが、感染症の発症に関与していることも示されている (3)。

グラム陰性桿菌の細胞膜成分である Lipopolysaccharide (LPS) は、生体内において炎症を引き起こす。腸管は種々の有害物質の漏出を防いでいる。しかしながら腸内細菌叢の異常により腸管バリアの破綻がおきることによって、腸内細菌由来 LPS の血中への流入が生じることが報告されている (4)。脳梗塞急性期において炎症は組織障害の進展に関与する。したがって、腸管由来 LPS は脳梗塞急性期の炎症に影響を及ぼす可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では脳梗塞急性期における腸脳連関を解明するために、腸内細菌叢の異常と脳梗塞急性期における組織障害との関連について、特に LPS を中心に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

実験にはレプチン遺伝子欠損により過食による糖尿病を発症する 2 型糖尿病モデル動物の *db/db* マウスと正常対象の *db/+* マウスを用いた。さらに 11 週齢の *db/db* マウスに対して、非吸収性抗生物質のポリミキシン B (PL-B) を胃ゾンデにて 1 週間経口投与した群も作成。PL-B 経口投与 4 時間後に血液を採取して、血中に PL-B が検出されないことを確認した。12 週齢の *db/+* マウス、*db/db* マウス、PL-B 投与 *db/db* マウスの 3 群に対して以下の実験をおこなった。

(1) 腸内細菌叢解析

糞便を採取し、株式会社ヤクルト本社中央研究所の腸内細菌解析システム「YIF-SCAN」を用いてリボソーム RNA を解析対象とした定量的 RT-PCR による腸内細菌の定量を行った。

(2) 生化学的解析

血液を採取して血糖値、LPS 濃度の測定をおこなった。

(3) 腸管透過性

FITC デキストランを胃ゾンデにて経口投与し、4 時間後に血液を採取。吸光度計にて解析し、腸管透過性の評価をおこなった。

(4) 脳梗塞モデル作成

イソフルラン吸入麻酔を施行、総頸動脈からナイロン糸を挿入し 60 分間の一過性中大脳動脈閉塞 (MCAO) により脳梗塞を作成。24 時間後に運動機能障害を modified neurological deficit score を用いて評価し、さらに 7 日後までの生存率を調べた。

(5) 脳梗塞組織解析

脳梗塞作成 24 時間に脳と取り出し、脳梗塞体積を測定。また蛍光免疫染色により LPS および toll-like receptor 4 (TLR4) の発現部位について組織学的評価を施行。また LPS と TLR4 はウエスタンブロット、炎症性サイトカインについては ELISA による定量的評価をおこなった。また、血液脳関門の破綻の評価は IgG 染色、さらに matrix metalloproteinase-9 (MMP9) の発現についてゼラチン・ザイモグラフィーによる解析をおこなった。

4. 研究成果

db/db マウスでは、*db/+* マウスと比較して、糞便中においてグラム陰性桿菌である *Enterobacteriaceae* の菌数が増加、また血中では血糖値、LPS 濃度が上昇し、さらに腸管透過性も亢進していた。そこで *db/db* マウスに、グラム陰性桿菌に特異的に作用する抗生物質 PL-B を 1 週間経口投与したところ、*Enterobacteriaceae* 菌数および血中 LPS 濃度と腸管透過性の低下がみられた。一方で、血糖値には有意な変化は認めなかった (図 1)。

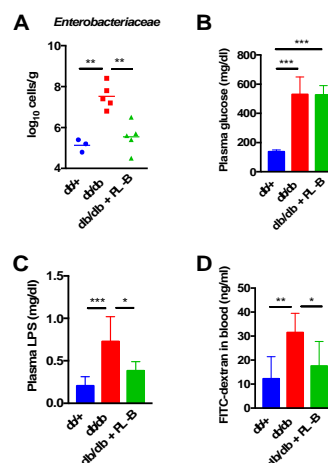


図1. (A) 糞便中 *Enterobacteriaceae* 菌数. (B) 血糖値. (C) 血清 LPS 濃度. (D) 腸管透過性. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.01 by 1-way ANOVA with Tukey's HSD post hoc tests.

さらに MCAO 24 時間後では、*db/db* マウスは *db/+* マウスと比較して有意に運動機能が

悪く、さらに脳梗塞体積が増大していたが、これらの変化は PL-B 投与群では有意に改善し、また脳梗塞後 7 日間の生存率についても有意に改善した (図 2)。

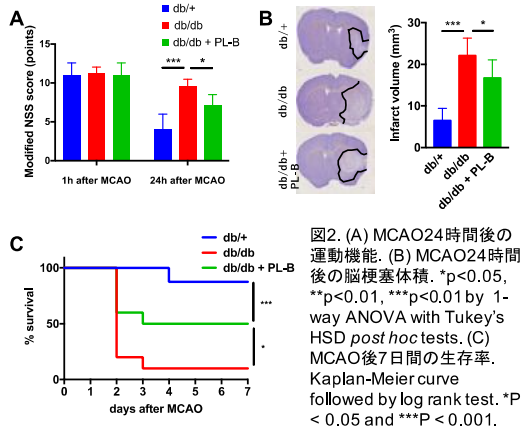


図2. (A) MCAO24時間後の運動機能. (B) MCAO24時間後の脳梗塞体積. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$ by 1-way ANOVA with Tukey's HSD *post hoc* tests. (C) MCAO後7日間の生存率. Kaplan-Meier curve followed by log rank test. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$.

次に、脳梗塞巣における LPS について解析をおこなった。db/db マウスの脳梗塞巣ではミクログリア、血管内皮細胞、神経細胞に LPS が検出されたが、アストロサイトには検出されなかった (図 3)。また LPS のレセプターであるトル様受容体 4 (TLR4) の発現についても同様にミクログリア、血管内皮細胞、神経細胞に検出されたが、アストロサイトには検出されなかった (図 4)。

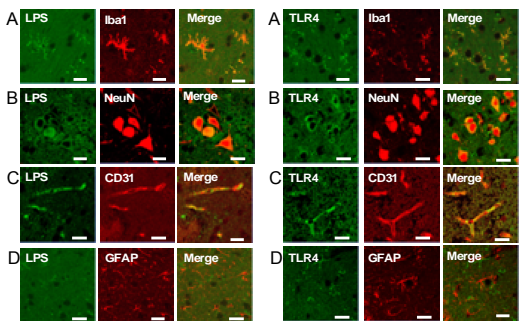


図3. db/dbマウスの脳梗塞巣におけるLPSの局在。(A)ミクログリア。(B)神経細胞。(C)血管内皮細胞。(D)アストロサイト。

図4. db/dbマウスの脳梗塞巣におけるTLR4の局在。(A)ミクログリア。(B)神経細胞。(C)血管内皮細胞。(D)アストロサイト。

ウェスタンブロット法により脳梗塞側大脳半球における LPS と TLR4 の検出量を比較したところ、db/db マウスでは db/+ マウスと比較して有意に LPS (図 5) と TLR4 (図 6) が多くみられたが、これらは PL-B を投与した db/db マウスでは減少していた。

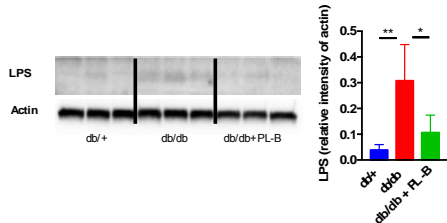


図5. ウェスタンブロット法による虚血側大脳半球におけるLPS検出量の比較. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$ by 1-way ANOVA with Tukey's HSD *post hoc* tests.

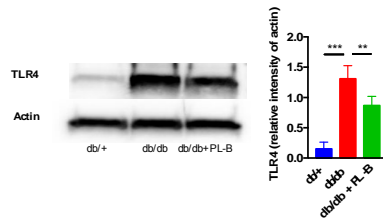


図6. ウェスタンブロット法による虚血側大脳半球におけるTLR4検出量の比較. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$ by 1-way ANOVA with Tukey's HSD *post hoc* tests.

TLR4 の活性化は、炎症性サイトカインの発現亢進により炎症反応による組織障害を引き起こす (5)。db/db マウスの脳梗塞巣では db/+ マウスと比較して TNF (A)、インターロイキン 1 (B)、インターロイキン 6 (C) の発現が有意に上昇していたが、PL-B を投与した db/db マウスでは、これらの炎症性サイトカインは有意に減少していた (図 7)。

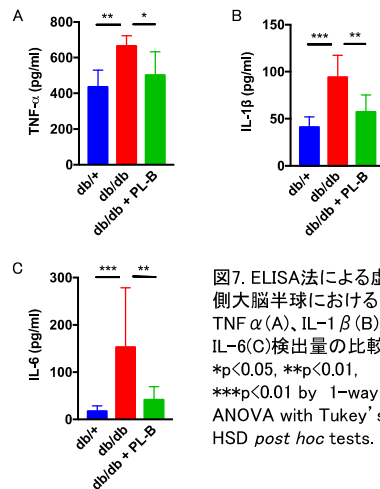


図7. ELISA法による虚血側大脳半球におけるTNF-α (A)、IL-1β (B)、IL-6 (C) 検出量の比較. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$ by 1-way ANOVA with Tukey's HSD *post hoc* tests.

また、db/db マウスの脳梗塞巣では db/+ マウスと比較して血液脳関門の破綻が強く (図 8A)、MMP9 の発現も上昇していたが (図 8B)、PL-B を投与した db/db マウスでは、血液脳関門の破綻と MMP9 の発現が有意に抑制された。

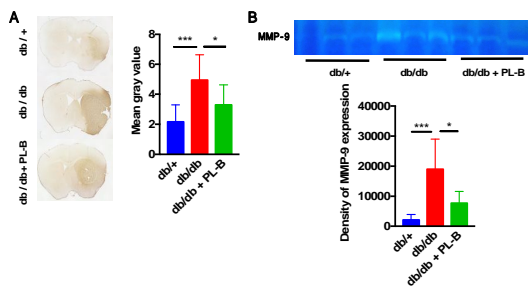


図8. (A) IgG染色による虚血側大脳半球における血液脳関門破綻の比較。(B)ゼラチンゼイモグラフィーによる虚血側大脳半球におけるMMP9発現量の比較. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by 1-way ANOVA with Tukey's HSD *post hoc* tests.

以上の結果から、腸内細菌叢の異常に伴う腸管透過性の亢進は、高 LPS 血症により脳梗塞巣における TLR4 の活性化を介して、炎症性サイトカイン、MMP9 の発現増加をきたすことで、組織障害の進展に関与することが

示唆された (図 9)

腸内細菌叢の異常

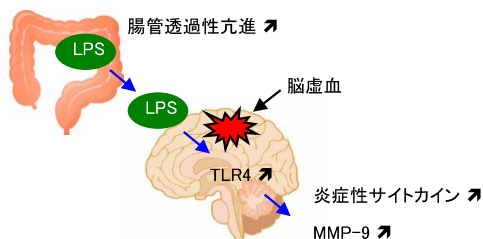


図9. 腸内細菌叢の異常と脳梗塞急性期の病態との関連

本研究において糖尿病マウスを用いたが、糖尿病は脳梗塞発症リスクであるだけでなく、脳梗塞急性期の組織障害の増悪因子であることが知られている。しかしながら血糖管理による脳保護作用や予後改善効果は認められない。糖尿病患者では高 LPS 血症がみられることが報告されている (6)。本研究では血糖値とは独立して、高 LPS 血症を制御することにより、脳保護効果及び予後改善につながることを見いだした。腸内細菌叢の異常あるいは腸管バリアの是正は、脳梗塞予後の改善を目指すうえでの新たな治療ターゲットとなる可能性が示された。

< 引用文献 >

1. Benakis C, et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal gammadelta T cells. *Nat Med.* 2016;22(5):516-523.
2. Houlden A, et al. Brain injury induces specific changes in the caecal microbiota of mice via altered autonomic activity and mucoprotein production. *Brain Behav Immun.* 2016;57:10-20.
3. Stanley D, et al. Translocation and dissemination of commensal bacteria in post-stroke infection. *Nat Med.* 2016;22(11):1277-1284.
4. Cani PD, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut.* 2009;58(8):1091-1103.
5. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-384.
6. Creely SJ, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292(3):E740-747.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 15 件)

1. Yamashiro K, Tanaka R, Urabe T, Ueno Y, Yamashiro Y, Nomoto K, Takahashi T, Tsuji H, Asahara T, Hattori N. Gut dysbiosis is associated with metabolism and systemic inflammation in patients with ischemic stroke. *PLoS One* 2017;12(2):e0171521
2. Shimura H, Tanaka R, Shimada Y, Yamashiro K, Hattori N, Urabe T. Glycyl-alanyl-histidine Protects PC12 Cells Against Hydrogen Peroxide Toxicity. *BMC Biochem* 2017;18:14
3. Matsushima T, Conedera S, Tanaka R, Li Y, Yoshino H, Funayama M, Ikeda A, Hosaka Y, Okuzumi A, Shimada Y, Yamashiro K, Motoi Y, Nishioka K, Hattori N. Genotype-phenotype correlations of cysteine replacement in CADASIL. *Neurobiol Aging.* 2017;50:169.e7-169.e14.
4. Saiki S, Hatano T, Fujimaki M, Ishikawa KI, Mori A, Oji Y, Okuzumi A, Fukuhara T, Koinuma T, Imamichi Y, Nagumo M, Furuya N, Nojiri S, Amo T, Yamashiro K, Hattori N. Decreased long-chain acylcarnitines from insufficient β -oxidation as potential early diagnostic markers for Parkinson's disease. *Sci Rep.* 2017;7(1):7328.
5. Kuroki T, Tanaka R, Shimada Y, Yamashiro K, Ueno Y, Shimura H, Urabe T, Hattori N. Exendin-4 inhibits matrix metalloproteinase-9 activation and reduces infarct growth after Focal cerebral ischemia in hyperglycemic mice. *Stroke* 2016;47:1328-1335

(学会発表) (計 15 件)

1. 栗田尚英 腸内細菌叢の異常に伴う高 LPS 血症と急性期脳梗塞における組織障害の進展 第 43 回日本脳卒中学会学術集会 2018 年
2. 栗田尚英 腸内細菌叢の異常に伴う高 LPS 血症は急性期脳梗塞の組織障害進展に關与する 第 60 回日本脳循環代謝学会学術集会 2017 年
3. Kazuo Yamashiro. Bacterial translocation and fecal organic acids in stroke patients. XXIII World Congress of Neurology. 2017 年
4. Kazuo Yamashiro. MODULATION OF GUT MICROBIOTA REDUCES ACUTE FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY IN TYPE 2 DIABETIC MICE. 3rd European Stroke Organisation Conference. 2017 年
5. 栗田尚英 糖尿病マウスにおける腸

内細菌叢の異常と急性期脳梗塞巣の
組織障害 第 42 回日本脳卒中学会学
術集会 2017 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山城 一雄 (YAMASHIRO, Kazuo)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号 : 00348921

(4)研究協力者

服部信孝 (HATTORI, Nobutaka)

田中亮太 (TANAKA, Ryota)

黒木卓馬 (KUROKI, Takuma)

栗田尚英 (KURITA Naohide)

野本康二 (NOMOTO, Koji)

高橋琢也 (TAKAHASHI, Takuya)

山城雄一郎 (YAMASHIRO, Yuichiro)