

令和 2 年 11 月 22 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10974

研究課題名(和文) 腸内細菌叢制御による脳動脈瘤破裂予防の研究

研究課題名(英文) Intracranial aneurysm rupture prevention by modulating gut microbiota

研究代表者

牧野 洋 (Makino, Hiroshi)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10397408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳動脈瘤の発生及び破裂には、炎症が重要な役割を果たしている事が明らかになってきており、炎症をターゲットとした薬物による脳動脈瘤治療法の研究が進められている。近年、赤肉を多く摂取すると、血管に炎症を起こす物質が産生される事が明らかになった。また、乳酸菌には腸管のみならず、全身の炎症を抑える可能性が示されている。本研究は、腸内細菌叢を制御する事で炎症を抑制し、脳動脈瘤破裂を予防する事を目的とした。今回の研究では、腸内細菌を抑制するためにマウスに4種の抗生物質を投与したうえで、脳動脈瘤を誘導したところ、脳血管における炎症を抑制する事で、脳動脈瘤の発生頻度を低下させることができたため論文発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳動脈瘤破裂は社会復帰率約3割という悲惨な結末を招く。近年、画像診断の進歩により、未破裂脳動脈瘤の発見が増加しているが、発見された脳動脈瘤の破裂を予防するためには、開頭クリッピングやコイル塞栓術が行われている。手術療法は合併症も多いため、より非侵襲的な薬物などによる代替療法の開発が待たれているが、薬物により、脳動脈瘤の発生を抑制し破裂を予防することは、未だに実現されていない。今回我々は、マウスに4種の抗生物質を投与し、腸内細菌叢を抑制する事で脳血管における炎症を抑制し、脳動脈瘤の発生頻度を低下させることができた。動物実験ではあるが今後、薬物療法の確立に向けた一歩となる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Intracranial aneurysm rupture causes poor outcome. For the rupture prevention, open surgery and intra-vascular coiling has been performed. However, more noninvasive methods such as pharmacological prevention has been required. One of the main targets of the rupture prevention is inflammation. Recent study reports that gut microbiota changes red meat ingredients into inflammation inducing substance. The substance causes arterial inflammation. Also, lactic acid bacteria have anti-inflammatory action. In this study, we could reduce intracranial aneurysm incidence by modulating gut microbiota using four antibiotics. We reported our results on international peer reviewed journal.

研究分野：救急医学

キーワード：脳動脈瘤 くも膜下出血 腸内細菌 マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

近年画像診断の進歩により未破裂脳動脈瘤の発見が増加している。脳動脈瘤の破裂は社会復帰率約3割という悲惨な結末を招くため、現在では、未破裂脳動脈瘤に対し、破裂予防法としてクリッピング術やコイル塞栓術が行われているが、薬物などの非侵襲的な方法による脳動脈瘤の発生及び破裂予防法の開発が待たれている。

研究代表者は、研究代表者自身がその確立に関与したマウス脳動脈瘤モデルを用い、薬物による脳動脈瘤破裂予防法の研究を行ってきた。

**脳動脈瘤と血管炎症：**脳動脈瘤の発生及び破裂のプロセスには、血管の炎症が重要な役割を果たす事が解ってきている。研究代表者も、マウス脳動脈瘤モデルにおいて、抗炎症作用のあるミノサイクリン及びドキシサイクリンが未破裂脳動脈瘤の破裂率を低下させる事を明らかにしている。

**腸内細菌と血管炎症：**心血管系の疾患を引き起こす、肥満や2型糖尿病の発症に腸内細菌が密接に関与する事はこの10年ほど数多くの研究者により指摘され続けてきた。特に近年、微小梗塞を起こす動脈硬化病変を持つ患者と、性別・年齢等をマッチさせた健常者では、腸内細菌叢を構成する細菌の性状に大きな違いがある事が明らかにされた。

クリーブランドクリニックの Hazen らのグループは肉の赤身に多く含まれるコリン及びL-カルニチンが血管炎症・動脈硬化に関与する事を示した。Hazenらによると、コリン及びカルニチンは腸内細菌叢の働きにより TMA (trimethylamine) に変換される。TMA は、さらに肝臓において酸化されて TMAO (trimethylamine-N-oxide) と

なる。この TMAO が直接アテローム性動脈硬化を促進する事に加え、TMAO が胆汁の合成量を減少させることでコレステロール逆輸送系を抑制し、抗動脈硬化作用を減弱することが示された。同論文では更に、低コリン食者である菜食主義者では雑食者に比べ血漿 TMAO レベルが低く、腸内細菌叢を構成する細菌の性状に違いがあったことを示している。

動脈瘤の発生原因のうち、動脈硬化はその首座を占める為、腸内細菌叢の制御および TMAO 産生を抑制する事が、動脈硬化の発生を防ぐ事で、動脈瘤の発生および破裂を予防する可能性がある。

また、乳酸菌は腸内細菌叢を構成する代表的な細菌であるが、乳酸菌に含まれる2本鎖 RNA が小腸の樹状細胞を活性化しインターフェロン $\gamma$  を産生させることにより抗炎症効果を発揮し、腸炎の予防など腸管における免疫恒常性の維持に直接に関与することが近年明らかになった。また、乳酸菌の経口投与はコントロールに比べ、リウマチ性関節炎の改善と炎症性サイトカインの減少を起こすというダブルブラインド臨床試験の結果が公表された。乳酸菌が腸管のみならず、全身の炎症に抑制的に関与する可能性が注目されつつある。

このように、腸内細菌叢は腸管のみならず全身の炎症に関与しているため、脳動脈瘤発生・破裂にに影響を与えている可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者が開発に関与したマウス脳動脈瘤モデルを用い、脳動脈瘤の発生及び破裂に対する腸内細菌叢の役割を検証し、腸内細菌叢の制御による非侵襲的な脳動脈瘤の発生及び破裂予防法の開発を目

指す

### 3 . 研究の方法

#### マウス脳動脈瘤モデルの作成

C57/BL6 雄性マウス 8 週齢を使用する。片腎を摘出したマウスの皮下に Deoxycorticosterone (DOCA) を投与し、1% 食塩水を飲料水として与えることで高血圧を発症させると共に、脳脊髄液中への豚膀胱エラストーゼ一回注入により作成する。これにより、自然経過で約 70% のマウスに脳動脈瘤を発生させ、そのうちの約 80% が破裂する。

抗生物質カクテルを用いて腸内細菌叢を抑制する事が、脳動脈瘤の発生及び破裂を予防するか否かを検討する。

脳動脈瘤誘導 3 週間前よりマウスに抗生物質カクテルを自由飲水させ、腸内細菌を抑制する。腸内細菌を抑制したマウスと、抗生物質を投与しないコントロール群に脳動脈瘤を誘導し、脳動脈瘤の発生及び破裂率を検討する。

### 4 . 研究成果

研究の方法 に対し、マウス脳動脈瘤及びくも膜下出血の診断能力を向上する為の実験を行った。

#### マウス脳動脈瘤破裂の神経学的診断を客観化する研究

脳動脈瘤破裂時には、突然起こる、今まで経験したことがないような強烈な痛みが起こる事が知られているが、マウスは症状を訴える事が出来ない。そのため、マウス脳動脈瘤モデルにおいては、マウスを連日観察し、 前日比体重の 10% 以上減少、

部分麻痺や、異常行動などの神経所見の出現、をもって有症とし、解剖して出血を確認してきた。しかし、この方法においては、一日おきの観察となるために、脳動脈瘤破裂の時間を特定する事はできない。脳動脈瘤破裂の時間を特定する事は、くも膜下出血発症後の治療法開発の研究等にも役立つことから、我々は行動学的に脳動脈瘤の破裂を診断するための、トラッキングシステムの開発を行った。我々の開発したトラッキングシステムは、マウスの体表に着けた小型のマーカを画像認識してマーカの軌跡を自動的に記録する。従来のビデオトラッキングシステムは夜間にマーカが視認できなくなると観察不能となる為、我々は蛍光マーカに対し、微量の紫外線を照射する事で夜間でもビデオトラッキングできるシステムを開発した(学会発表 1)。

#### マウス脳動脈瘤の発生及び破裂を画像診断する研究

前述の神経学的診断に加え、脳動脈瘤臨床においては脳動脈瘤の存在や、その破裂の有無の確認には通常、画像診断が行われる。しかし、マウスの脳動脈瘤は、その小ささゆえに、現在まで画像診断は困難とされてきた。

造影剤を注入し、マウスの脳血管系を描出した先行研究があるが、脳動脈瘤やくも膜下出血を経時的に評価する為には非侵襲的な画像診断法の開発が望まれる。我々の研究グループは、3 テスラの臨床用 MRI に小型サドルコイルを用い、撮像法を工夫する事で、MRA にて脳動脈瘤を、MRIT2 強調画像でくも膜下出血を非侵襲的に描出する事に成功した。これは世界初の研究結果であるために、J Cereb Blood Flow Metab 誌に論文発表(論文発表 3)した。また、本法の技術的側面を詳説する為の論文発表も行った(論文発表 2)。学会発表も

複数回行った(学会発表 2,3,5)

#### 研究の方法 に対する成果

抗生物質の投与により、腸内細菌を制御する事を目的とし、vancomycin, metronidazole, ampicillin, neomycin の4種抗生物質を3週間経口飲水摂取させたところ、腸内細菌叢を抑制する事ができた。抗生物質の効果については便培養を行い確認した。

抗生物質カクテル投与により、腸内細菌叢を抑制したマウスに従来通りの方法で脳動脈瘤を誘導したところ、腸内細菌叢が抑制された群においては、有意に脳動脈瘤の発生・破裂が少なく、生存率が向上した。研究結果は査読付き英文誌に発表した(論文発表4)

#### 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4件)

1. Suzuki T, Kamio Y, Makino H, Hokamura K, Kimura T, Yamasaki T, Hiramatsu H, Umemura K, Namba H. Prevention Effect of Antiplatelets on Aneurysm Rupture in a Mouse Intracranial Aneurysm Model. Cerebrovasc Dis. 3;45(3-4):180-186, 2018

2. 夏目貴弘, 外村和也, 牧野洋, 木村哲朗, 梅村和夫. 臨床用3T-MRIを用いたマウス脳イメージング環境の構築. 脳循環代謝 27巻2号 Page235-241. 2016

3. Makino H, Hokamura K, Natsume T, Kimura T, Kamio Y, Magata Y, Namba H,

Katoh T, Sato S, Hashimoto T, Umemura K. Successful serial imaging of the mouse cerebral arteries using conventional 3-T magnetic resonance imaging. J Cereb Blood Flow Metab. 35: 1523-7, 2015

4. Fumiaki Shikata, Kenji Shimada, Hiroki Sato, Taichi Ikedo, Atsushi Kuwabara, Hajime Furukawa, Masaaki Korai, Masakazu Kotoda, Kimihiko Yokosuka, Hiroshi Makino, Emma A. Ziegler, Daisuke Kudo, Michael T. Lawton, Tomoki Hashimoto. Potential Influences of Gut Microbiota on the Formation of Intracranial Aneurysm. Hypertension. 2019;73(2):491-496.

[学会発表](計5件)

1. 外村和也, 加藤孝澄, 牧野洋, 木村哲朗, 鈴木智, 難波宏樹, 中島芳樹, 梅村和夫. マウス脳梗塞モデルによる運動量測定アプリケーションの評価. 第59回日本脳循環代謝学会学術集会 徳島市 2016年11月

2. 外村和也, 牧野洋, 夏目貴弘, 木村哲朗, 梅村和夫. 臨床用3テスラMRIを用いたマウス脳動脈瘤の可視化を成功させた. 第27回日本脳循環代謝学会総会 富山市 2015年10月

3. Kazuya Hokamura, Hiroshi Makino, Takahiro Natsume, Tetsuro Kimura, Yoshinobu Kamio, Yasuhiro Magata, Hiroki Namba, Takasumi Katoh, Shigehito Sato, Tomoki Hashimoto and Kazuo Umemura. Visualizing cerebral aneurysms in mice by a conventional three tesla MRI BRAIN & BRAIN PET

2015. Vancouver. 2015 年 6 月

4.木村哲朗、牧野洋、加藤孝澄、佐藤重仁.  
マウス脳動脈瘤モデルにおいてくも膜下出血の発症はイソフルランの最小肺胞濃度を減少させる 第 62 回日本麻酔科学会学術集会 神戸市 2015 年 5 月

5.外村和也, 梅村和夫, 牧野洋, 木村哲朗, 加藤孝澄, 神尾佳宣, 難波宏樹. 臨床用 3 テスラ MRI を用いたマウス脳動脈瘤可視化の試み. 第 8 回静岡県血栓と血管フォーラム 浜松市 2015 年 4 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

牧野 洋 (MAKINO, Hiroshi)  
浜松医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 10397408

### (4) 研究協力者

橋本 友紀 (HASHIMOTO, Tomoki)  
Barrow Neurology Institute, Research  
Director