

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15061

研究課題名(和文) ノトバイオート技術を基盤としたアルツハイマー型認知症の細菌叢異常が示す生体影響

研究課題名(英文) Effect of gut microbiota of Alzheimer's disease by using gnotobiotic technique

研究代表者

森田 英利 (Morita, Hidetoshi)

岡山大学・環境生命科学研究所・教授

研究者番号：70257294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー型認知症と診断され認知障害のある患者17名、その同じ年齢層で認知障害のみられない健常者17名の腸内細菌叢を比較した。主座標分析法であるUniFrac解析の結果、その両者は異なっていた。その理由は、健常者に比べてアルツハイマー病患者ではBacteroidetes門の有意な減少が確認された。網羅的16S解析により腸内細菌叢を明らかにしたアルツハイマー型認知症患者1名の腸内細菌叢(糞便)をC57BL/6系統の無菌マウスに経口投与し、ノトバイオートマウスを作製した。その結果、認知症患者腸内細菌叢によるノトバイオートマウスでは場所認知行動実験において認知能力低下傾向が確認された。

研究成果の概要(英文)：The gut microbiota of 17 patients of Alzheimer's disease were compared to that of 17 persons as a healthy control. The gut microbiota of Alzheimer's disease was different from that of healthy control by UniFrac analysis. For the reason, the decrease of the phylum Bacteroidetes in microbiota of the Alzheimer's disease patients was confirmed in comparison with healthy persons. Germ-free mice (C57BL/6) were orally administrated the feces of one Alzheimer's patient. The cognitive ability of the gnotobiotic mice due to the gut microbiota (feces) of the Alzheimer's disease patient was decreased.

研究分野：応用微生物学

キーワード：アルツハイマー型認知症 ノトバイオート技術 腸内細菌叢 認知行動

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト腸内細菌叢は約 1,000 種の細菌から構成されており、細菌叢全体として宿主の様々な生理機能に重要な役割を果たしている。種々の疾病・病態において、網羅的な腸内細菌叢解析から、種々の疾患で“dysbiosis (腸内細菌叢の全体として保有する遺伝子の数が減少し、全体として機能的に劣った)”細菌叢の構成が明らかにされてきた。一方で、脳腸相関 (Brain-gut axis) の視点から多くの知見が蓄積されてきたが、最近では、腸内細菌 (叢) が脳腸相関を通じて中枢神経系に影響を及ぼす因子として注目され、脳-腸-微生物相関 (Brain-gut-microbe axis) という概念が提唱されている。これは、ホルモンやサイトカインなどの液性因子が共通の情報伝達物質や受容体を介して中枢神経と末梢器官の相互作用に寄与し、その主なメカニズムとして 1) 免疫系を介する経路、2) 迷走神経、脊髄求心性神経を介する経路、そして 3) 腸内細菌 (叢) の代謝産物を介した経路が確認されたからである。脳をキーワードとする自閉症患者において腸内細菌叢の dysbiosis が報告され (Carabotti et al, Ann Gastroenterol, 2015)、また、Nature 誌に脳-腸-微生物相関の研究におけるノトバイオート技術の妥当性と有用性がコメントされている (Schmidt, 2015)。

アルツハイマー型認知症は、今後、高齢化社会となる日本社会において着目していかねばならない病態である。最近、海外において、アルツハイマー型認知症患者の腸内細菌叢が健常者と異なる報告がなされてきた。本研究においては、特にアルツハイマー型認知症患者の腸内細菌叢の移植により無菌マウスの認知行動の異常や低下が起こるかどうかについては興味深い。

### 2. 研究の目的

日本人アルツハイマー型認知症患者の腸内細菌叢についての知見はほとんどなかったことから、本研究では、日本人アルツハイマー型認知症と診断されている患者 17 名の糞便と唾液を採取し、腸内細菌叢において健常者との腸内細菌叢との違いについて検討した。健常者との違いが見出された後、日本人アルツハイマー型認知症患者の糞便を、無菌マウスに経口投与し、行動学的分析から認知症を示唆する結果が得られるかどうかについて検討した。また、継時的にノトバイオートマウスの糞便を採取し、その腸内細菌叢について解析した。

### 3. 研究の方法

1) アルツハイマー型認知症患者の腸内フローラを構成する菌種の特定と組成の決定

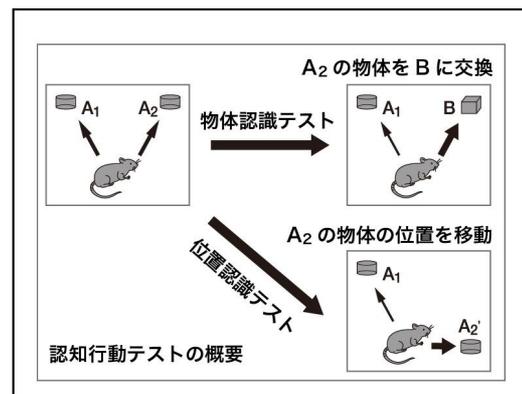
本学ヒト生命倫理委員会の承認に基づいて、アルツハイマー型認知症患者と高齢 (アルツハイマー型認知症患者とほぼ同年齢) 健常者の糞便を採取し、溶菌酵素、アクロモペ

プチターゼ、クロロホルム・フェノールを用いた DNA 精製法 (Microbes Environ, 2007) により、採取した糞便から細菌のゲノム DNA を高収率で回収した。次世代シーケンサー MiSeq (イルミナ社、岡大バイオバンク所有) を用いて、精製した DNA 中の 16S rRNA 遺伝子の可変領域 (V3-V4) の塩基配列決定を行う。次に、QIIME (<http://www.qiime.org/>) というツールを使って、得られた塩基配列群をその配列の類似度に基づいてグループ分けした。各グループの代表配列をデータベース上の配列と照合して、各グループの属レベルでの菌種を特定し、各糞便のフローラを構成する菌種の組成を決定する。続けて、UniFrac 解析を行い、各糞便のフローラ構造間の類似度を数値化する。これにより、アルツハイマー型認知症患者の腸内フローラに特有に見られる菌種とその組成を明らかにする。

2) ノトバイオートマウスの作出と認知行動テスト

ノトバイオートマウスを作成するために、無菌マウス C57BL/6 を日本クレアから購入した。アルツハイマー型認知症患者の糞便を無菌マウスに経口投与して、ノトバイオートマウスを作出した。また、以降の腸内フローラ解析とメタボローム解析のために、ノトバイオートマウスの糞便を 2 週間ごとに採取し、メタボローム解析の網羅的な代謝産物の抽出は糞便サンプルの凍結前に行った。

本研究では、図に示した通り、位置認識と物体認識のテストを行った。この認知行動にかかる時間により、ノトバイオートマウスの記憶能力を評価した。



対照群と有意差のある認知行動が得られた時点で剖検を行い、それらのノトバイオートマウスの糞便、脳・腸管上皮・血液のメタボローム解析のためのサンプリングを行った。

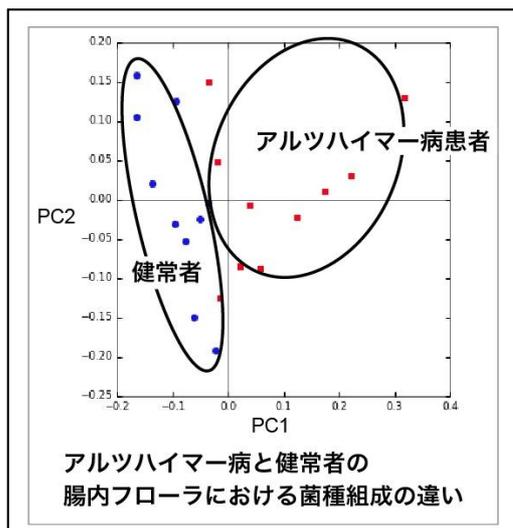
3) アルツハイマー型認知症患者の糞便からの酪酸産生菌の生菌分離

BL (blood liver) 寒天培地と YCFA (yeast, casitone, fatty acids) 寒天培地を用いて、アルツハイマー型認知症患者の凍結保存した糞便から生菌分離を行った。分離株については 16S rRNA 遺伝子配列を決定し、菌種を推定した。また、その菌株の酪酸産生能につ

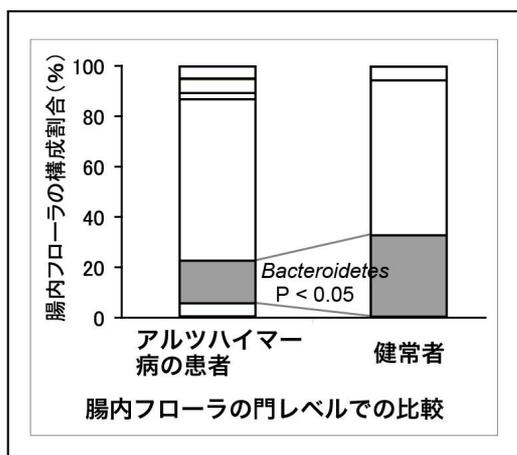
いて検討した。

#### 4. 研究成果

日本人アルツハイマー型認知症と診断された 17 名の糞便を採取し、年齢層が同様の 17 名の健常者（認知行動に異常がなく、特定の薬の摂取や病状のない人）腸内細菌叢を解析した。各サンプルにおいて 16S rRNA 遺伝子の可変領域（V3-V4）の十分な塩基配列が得られた。UniFrac 解析の結果、アルツハイマー型認知症患者と健常者の両群間で腸内細菌叢において、有意な差が認められた。



これら両者の腸内細菌叢の門（phylum）レベルの組成を比較したところ、アルツハイマー型認知症患者の腸内細菌叢では *Bacteroidetes* 門に属する細菌種の占める割合が半減していた。

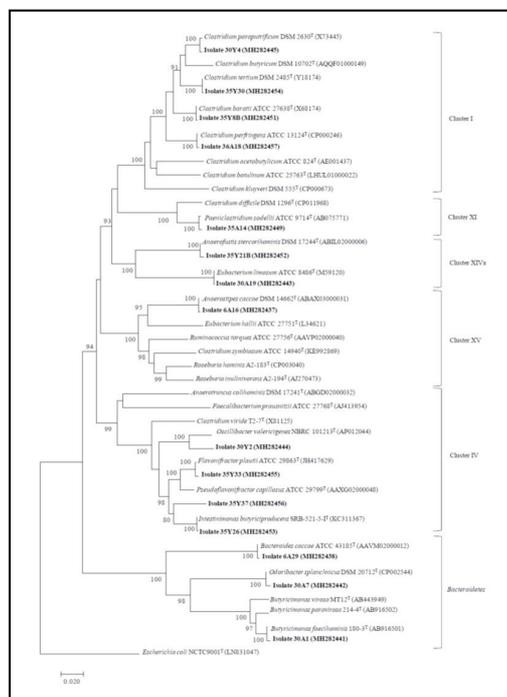


*Bacteroidetes* 門には酪酸などの短鎖脂肪酸を産生する細菌種が多いことが知られている。

日本人アルツハイマー型認知症患者の腸内細菌叢が健常者と異なる結果が得られたことから、日本人アルツハイマー型認知症患者の凍結している糞便を C57BL/6 系統の無菌マウスに経口投与し、ノトバイオマウスを作製した（試験群）。対照群には、同年齢

の健常者の糞便を同無菌マウスに経口投与したノトバイオマウスとした。その後、位置認識試験と物体認識試験を継時的に行った結果、位置認識と物体認識において、対照群と試験群で有意差が認められてきた。継時的にマウス糞便を採取しており、網羅的な細菌叢解析の結果を導いていく。行動試験が十分にできたので、今後、両群のマウスを剖検し、マウス各部位ごとのサンプリングを行い、各分析に供する予定である。

4 名のアルツハイマー型認知症患者の糞便から 240 コロニーを生菌分離した。継代と凍結からの復帰状況から、232 コロニーについて 16S rRNA 遺伝子配列を決定し、67 OTU（菌種に相当）を推定した。その菌種の情報から、酪酸産生菌を選択し、酪酸産生能について確認し、15 菌種を生菌分離し、その系統樹を示した。これら 15 菌種は、*Bacteroidetes* 門と *Clostridial cluster* の I、IV、XI、XV、XIVA に分類される細菌であった。



腸内細菌により産生された宿主消化管での酪酸についての有用に関する知見が蓄積してきている。本研究において、酪酸産生能に着目して生菌を分離し保存できたことで、今後、これら酪酸産生菌による動物実験も可能となると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

この報告書の提出期間までには特になし。現在、学術論文の作成中である。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森田 英利 (MORITA, Hidetoshi)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授  
研究者番号：70257294

(2)研究分担者

村山 洋 (MURAYAMA, Ohoshi)  
麻布大学・生命・環境科学部・准教授  
研究者番号：20301781  
(平成28年11月3日まで)

須田 互 (SUDA, Wataru)  
平成28年まで、慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師  
平成29年から、国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員  
研究者番号：20590847

菊水 健史 (KIKUSUI, Takefumi)  
麻布大学・生命・環境科学部・准教授  
研究者番号：90302596  
(平成28年11月3日まで)