

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05492

研究課題名(和文)急性期脳梗塞における腸管T細胞の影響とプロバイオティクス治療応用の検討

研究課題名(英文)Intestinal T cells and probiotics treatment in acute ischemic stroke

研究代表者

山城 一雄 (Yamashiro, Kazuo)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：00348921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は糖尿病マウスを用いた先行研究において、腸内細菌叢の異常が急性期虚血性脳卒中の転帰に関連することを報告した。近年の研究により、腸内細菌叢は腸管の免疫細胞の分化制御に重要な役割を担うことが指摘されている。本研究では低脂肪食を投与した正常対照マウスと比較して高脂肪食を投与した糖尿病マウスでは、小腸の粘膜固有層におけるTh17細胞が増加し、さらに脳梗塞後において重度の神経障害を認めた。これらの結果により、腸管リンパ球が急性期虚血性脳卒中の転帰に関連することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中は運動麻痺などの重篤な後遺症を起こすことが少なくなく、要介護の主要な原因疾患である。急性期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まだまだ不十分である。腸が脳へ影響を及ぼすメカニズムは未だ十分に解明されていないが、本研究により急性期虚血性脳卒中の病態には、腸管リンパ球が関与する可能性が示唆された。さらなる研究の推進により急性期脳梗塞における新たな脳保護治療法を確立することで、脳梗塞患者の予後改善と要介護者の減少、健康寿命の延伸につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that gut microbiota dysbiosis was associated with the outcome of acute ischemic stroke in diabetic mice. Recent studies have shown that the gut microbiota plays an important role in controlling the differentiation of immune cells in the intestinal tract.

In this study, we found that diabetic mice fed a high-fat diet had increased Th17 cells within lamina propria of the small intestine, and had severe neurological dysfunction after ischemic stroke compared to control mice fed a low-fat diet. These findings suggest that intestinal T lymphocytes are associated with the outcome of acute ischemic stroke.

研究分野：神経学

キーワード：脳梗塞 T細胞 糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 脳血管障害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。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。
- (2) 申請者はこれまでの研究から、脳梗塞患者および動物モデルにて、腸内細菌と脳梗塞との関連を見いだしてきた[1]。近年の研究からは腸内細菌が腸管の T 細胞の分化制御に密接に関与することが報告されている[2]。腸管は最大の免疫器官であり、腸内細菌は腸管の制御性 T 細胞や T 細胞、Th17 細胞など免疫細胞の分化制御に密接な関わりを持っている。一方で、これらの T 細胞は急性期脳梗塞巣の組織障害の進展において重要な役割を果たしていることが報告されている。

2. 研究の目的

- (1) 糖尿病は主要な脳梗塞発症リスクであるだけでなく、糖尿病患者は非糖尿病患者と比較して脳梗塞発症後に麻痺が進行しやすく、より重症化しやすいことが知られている。我々は先行研究の解析結果から、糖尿病マウスでも人と同様に腸内細菌叢に異常がみられることを確認しており、これらの変化と腸管の T 細胞との関連、さらには脳梗塞への関わりについて解析を進める。
- (2) さらに本研究では、プロバイオティクス治療の有効性についても検証を計画した。これはプロバイオティクスの投与により、過剰な炎症を抑制する役割を果たす制御性 T 細胞の分化、あるいは炎症を引き起こす T 細胞や Th17 細胞の制御を通して、脳梗塞巣の組織障害を軽減させることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 5 週齢から 17 週齢までの期間に高脂肪食または低脂肪食を C57BL/6 マウスに投与し、糖尿病マウスと正常対照マウスを作成。17 週齢のこれら 2 群のマウスを用いて、大腸および小腸の粘膜固有層のリンパ球を採取し、フローサイトメトリーを用いて T 細胞 (T 細胞、制御性 T 細胞など) の解析を行った。
- (2) 17 週齢の糖尿病マウスと正常対照マウスを用いて、一過性中大脳動脈閉塞 (tMCAO) による脳梗塞を作成。脳梗塞後の神経機能障害について、modified neurological severity score (mNSS)を用いて評価した。また脳梗塞組織におけるサイトカイン、T 細胞について免疫組織化学や ELISA、western blot 法、RT-PCR 法、フローサイトメトリーを用いて解析した。
- (3) 糖尿病マウスに対して 10 週齢よりプロバイオティクス (ビフィズス菌) を投与。17 週齢にて大腸および小腸の粘膜固有層のリンパ球を採取し、フローサイトメトリーを用いて T 細胞 (T 細胞、制御性 T 細胞など) を解析。さらに 17 週齢にて tMCAO により脳梗塞を作成。mNSS による神経機能評価および脳梗塞組織の解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 高脂肪食を投与した糖尿病マウス (HFD 群) は低脂肪食を投与した正常対照マウス (LFD 群) と比較して、17 週齢において体重 (48.4 ± 1.8 g vs 38.1 ± 2.1 g; $p < 0.001$) および空腹時血糖値 (236.0 ± 41.7 mg/dl vs 163.8 ± 6.8 mg/dl; $p < 0.01$) に有意な上昇を認めた。さらに 75g OGTT においても、HFD 群では LFD 群と比較して血糖値の有意な上昇を認めた (図 1)。

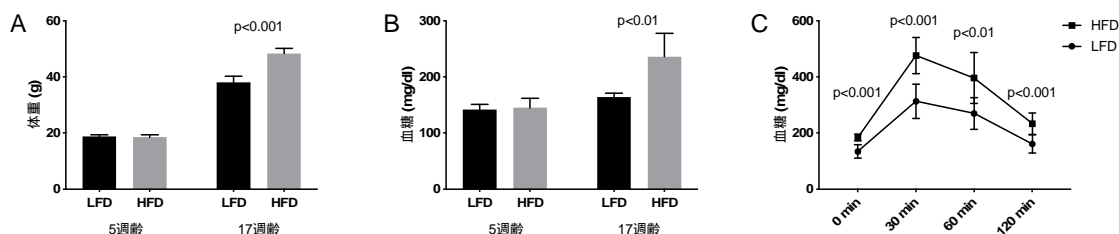


図1. 低脂肪食群 (LFD) と高脂肪食群 (HFD) における (A) 体重、(B) 血糖値および (C) 75g OGTT

- (2) フローサイトメトリーによる 17 週齢マウスにおける腸管の粘膜固有層に存在するリンパ球の解析の結果、HFD 群では LFD 群と比較して、小腸の粘膜固有層において、Th 細胞に占め

るインターロイキン(IL)-17 産生性 CD4 陽性 T リンパ球 (Th17 細胞) の割合が有意に増加していることを確認した。一方で大腸では、Th17 細胞の占める割合に両群間で明らかな差は認めなかった。また小腸および大腸における T 細胞の割合は、両群間において差を認めなかった (図 2)。これらの結果により、高脂肪食を投与した糖尿病マウスでは低脂肪食を投与した正常対照マウスと比較して、小腸における Th17 細胞が増加することが示された。

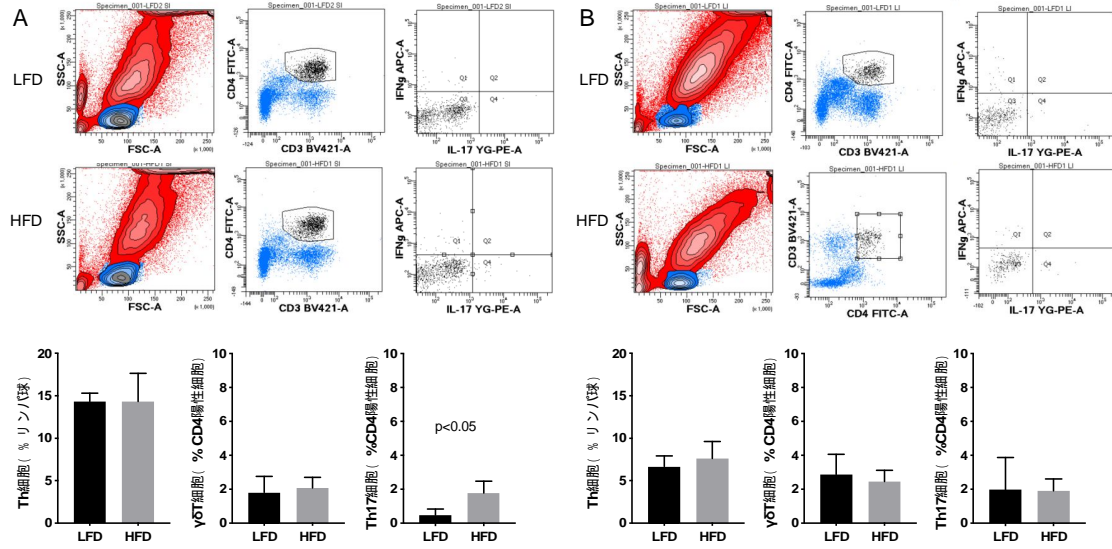


図2. 低脂肪食群 (LFD) と高脂肪食群 (HFD) における (A)小腸、(B)大腸におけるリンパ球

(3) 17 週齢の HFD 群および LFD 群において、tMCAO 施行前、施行中および施行後における脳血流 (rCBF) に両群間で有意差はみられなかった。両群間における tMCAO 後の神経機能は、24 時間後には有意差を認めなかったが、72 時間後の mNSS は LFD 群と比較して HFD 群で有意に高かった (8.4 ± 2.1 vs 10.9 ± 1.4 ; $p < 0.05$) (図 3)。これらの結果により、高脂肪食投与による糖尿病マウスでは、脳梗塞後 72 時間の時点において低脂肪食を投与した正常対照マウスよりも重度の神経機能障害を呈することが示された。

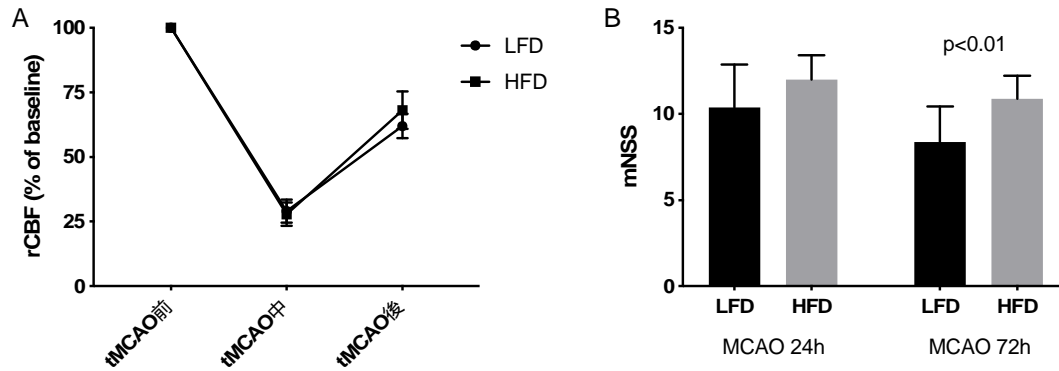


図3. 低脂肪食群 (LFD) と高脂肪食群 (HFD) における (A)tMCAOによる脳血流変化、(B)tMCAO後のmNSS

(4) tMCAO を施行した 17 週齢の正常対照マウスおよび糖尿病マウスの脳梗塞組織におけるサイトカイン、T 細胞について、免疫組織化学、ELISA、western blot 法、RT-PCR 法、フローサイトメトリーを用いて解析を進めている。さらにプロバイオティクスを投与した糖尿病マウスにおいても、腸管のリンパ球と tMCAO 施行後の神経障害と脳梗塞組織の解析が進行中である。またこれらの糖尿病マウスと正常対照マウスから採取した糞便を用いた腸内細菌叢解析を予定している。これらの結果を統合することで、腸内細菌を介した腸管免疫細胞の制御による急性期虚血性脳卒中における新たな脳保護療法の確立を目標に研究を推進している。

< 引用文献 >

1. Kurita N, Yamashiro K, Kuroki T, Tanaka R, Urabe T, Ueno Y, et al. Metabolic endotoxemia promotes neuroinflammation after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2020;40(12):2505-20.
2. Luck H, Tsai S, Chung J, Clemente-Casares X, Ghazarian M, Revelo XS, et al. Regulation of obesity-related insulin resistance with gut anti-inflammatory agents. *Cell Metab.* 2015;21(4):527-42

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurita Naohide, Yamashiro Kazuo, Kuroki Takuma, Tanaka Ryota, Urabe Takao, Ueno Yuji, Miyamoto Nobukazu, Takanashi Masashi, Shimura Hideki, Inaba Toshiki, Yamashiro Yuichiro, Nomoto Koji, Matsumoto Satoshi, Takahashi Takuya, Tsuji Hirokazu, Asahara Takashi, Hattori Nobutaka	4. 巻 40
2. 論文標題 Metabolic endotoxemia promotes neuroinflammation after focal cerebral ischemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism	6. 最初と最後の頁 2505 ~ 2520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0271678X19899577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamashiro Kazuo, Kurita Naohide, Urabe Takao, Hattori Nobutaka	4. 巻 77
2. 論文標題 Role of the Gut Microbiota in Stroke Pathogenesis and Potential Therapeutic Implications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Nutrition and Metabolism	6. 最初と最後の頁 36 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000516398	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 山城一雄、ト部貴夫、服部信孝	4. 巻 34
2. 論文標題 特集「口腔 腸内細菌叢と認知症：腸内細菌と脳血管障害」	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dementia Japan	6. 最初と最後の頁 35 ~ 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山城一雄、服部信孝	4. 巻 40
2. 論文標題 特集「生活習慣病と腸内細菌：脳神経疾患と腸内細菌」	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Progress in Medicine	6. 最初と最後の頁 19 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山城一雄、卜部貴夫	4. 巻 3
2. 論文標題 研究者の最新動向「脳血管障害における腸内細菌の関わり」	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 98～105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山城一雄、栗田尚英、卜部貴夫	4. 巻 4
2. 論文標題 研究者の最新動向「腸内細菌と脳血管障害」	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 74～81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 山城一雄、服部信孝
2. 発表標題 Stroke and Microbiota
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naohide Kurita, Kazuo Yamashiro, Takuma Kuroki, Ryota Tanaka, Yuji Ueno, Takao Urabe, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Gut dysbiosis promotes LPS-induced neuroinflammation after cerebral ischemia in diabetic mice
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naohide Kurita, Kazuo Yamashiro, Ryota Tanaka, Yuji Ueno, Nobukazu Miyamoto, Sho Nakajima Takao Urabe, Yuichiro Yamashiro, Nobutaka Hattori.
2. 発表標題 Gut dysbiosis promotes lipopolysaccharide-induced neuroinflammation after stroke.
3. 学会等名 BRAIN and BRAIN PET 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurita N, Yamashiro K, Kuroki T, Tanaka R, Ueno Y, Urabe T, Yamashiro Y, Hattori N.
2. 発表標題 Modulation of gut microbiota improves outcomes after stroke by reducing lipopolysaccharide-induced inflammation in the ischemic brain in diabetic mice.
3. 学会等名 4th European Stroke Organization Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗田尚英、山城一雄、黒木卓馬、田中亮太、上野祐司、卜部貴夫、野本康二、松本敏、高橋琢也、辻浩和、朝原崇、山城雄一郎、服部信孝
2. 発表標題 糖尿病マウスの腸内細菌叢異常は脳梗塞巣において内毒素に起因する炎症を引き起こす
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kurita N, Yamashiro K, Kuroki K, Tanaka R, Ueno Y, Urabe T, Yamashiro Y, Hattori N.
2. 発表標題 Modulation of gut microbiota improves outcomes after ischemic stroke by reducing lipopolysaccharide-induced inflammation in the ischemic brain of diabetic mice
3. 学会等名 International Stroke Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山城一雄
2. 発表標題 腸内細菌と脳卒中
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗田尚英、山城一雄、黒埴卓馬、田中亮太、上野祐司、宮元伸和、卜部貴夫、山城雄一郎、服部信孝
2. 発表標題 腸内細菌叢の異常と脳虚血急性期におけるLPSを介した炎症
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山城一雄
2. 発表標題 虚血性脳卒中におけるgut dysbiosis
3. 学会等名 第6回心血管脳卒中学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamashiro K, Kurita N, Tanaka R, Urabe T, Hattori N.
2. 発表標題 Metabolic endotoxemia promotes neuroinflammation after focal cerebral ischemia.
3. 学会等名 The joint European Stroke Organisation and World Stroke Organisation Conference (ESO-WSO 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山城一雄、栗田尚英、服部信孝、卜部貴夫
2. 発表標題 脳卒中の病態における腸内細菌の役割
3. 学会等名 第46回日本脳卒中学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関