

令和 5 年 5 月 14 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03796

研究課題名(和文) 体内微生物の脳動脈瘤の発生・破裂への影響の解明と新しい予防医療の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the effect of Microorganism of the body on the origin and rupture of the intracranial aneurysms and development of preventive measure of the subarachnoid hemorrhage

研究代表者

森田 明夫 (Morita, Akio)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：60302725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：2020年より6病院から症例を集積し175例(くも膜下出血：86例、未破裂頭蓋内動脈瘤：59例、脳血管障害のない対照患者：30例)から食習慣を含む臨床データ、唾液、便、血液検体を収集した。唾液検体から*S. Mutans*は43%で検出され、そのうち*cnm*陽性株の検出は未破裂脳動脈瘤、くも膜下出血で対照患者より多い傾向があったが、有意差は認められなかった。SAHの便検体では*Prevotella intermedia*, *Corynebacterium mycetoides*, 等が優占し、これらの中に細菌性心内膜炎などの起炎菌も含まれる。今後細かいBioinformatics解析を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では脳動脈瘤の発生及び破裂に関与する体内細菌を検出し、予防医療の構築を目指した。未だ解析が中途であるが、口腔内細菌では*S. Mutans cnm+*株が脳動脈瘤群に多いことが発見され、この菌が脳動脈瘤の発生に関与している可能性が示唆された。一方腸内細菌では特殊な心内膜炎などの発症に関与する特殊な口腔内細菌がくも膜下出血症例で多く見出され、破裂にはこのような菌による動脈瘤壁の炎症が関与している可能性が明らかとなった。今後さらに精細な解析を実施し、この研究から重篤な脳血管障害であるくも膜下出血を予防できる治療法の開発につなげたい。

研究成果の概要(英文)：Clinical data including dietary habits, and specimen of saliva, stool, and blood samples were collected from 175 cases (subarachnoid hemorrhage: 86 cases, unruptured intracranial aneurysm: 59 cases, control patients without cerebrovascular disease: 30 cases) at 6 hospitals since 2020. *S. mutans* was detected in 43% of saliva samples, of which *cnm*-positive strains tended to be detected more frequently in unruptured cerebral aneurysms and subarachnoid hemorrhage than in control patients, but no significant differences were observed. *Prevotella intermedia*, *Corynebacterium mycetoides*, and others, including some causative organisms such as bacterial endocarditis were detected from stool bacteria analysis in SAH patients. Detailed bioinformatics analysis will be performed in the future.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳動脈瘤 口腔内細菌 腸内細菌 破裂 発生 *Streptococcus mutans* 細菌性心内膜炎 炎症

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は日本人の要介護原因の1位であり死因としても4位に位置する重要疾患である。中でもくも膜下出血はその発症年齢が比較的若くまた予後が最も重篤である。現在日本では年間3万例が発症する。一旦発症するとその約半数は治療に至らず死亡するか治療をしても重篤な意識・身体障害を残すため、予防的医療の拡充が求められている。現在非侵襲的に脳血管を画像化する機器の進歩や健診の普及により成人の3%強に破裂前の脳動脈瘤が多く発見されているが、予防的治療も合併症リスクを伴うため、この対応をどうするかは社会的に大きな課題となっている。脳動脈瘤の発生や破裂の原因を解明し、合併症リスクの少ない薬剤等による制御ができれば、大きな脳卒中医療の進歩となる。

脳動脈瘤の発生原因は遺伝や生活習慣など様々な可能性が示唆されている。一方で破裂に関しては解剖学的要素や血行力学的な素因、血管壁の慢性炎症反応などの関与が示唆されている。本研究分担研究者の仲野らによって破裂脳動脈瘤の患者には特殊な齲歯菌が多く存在することが発見され、本菌が炎症反応を介し脳動脈瘤破裂に関与している可能性が示唆されている。一方で腸内微生物叢は体内で最も影響力の強い微生物叢であり、その産生物や代謝物と動脈硬化や脳内血管腫等との関与も指摘されている。また Hashimoto T.らのグループによって動物モデルで腸内細菌と脳動脈瘤の関連が示唆される結果が報告された(Shikata F, et al. Hypertension 76:491-496,2019)。しかし脳動脈瘤と腸内微生物との臨床例による体系的研究は少ない。一方でくも膜下出血の発生には人種差も指摘されており、欧米では未破裂で発見される脳動脈瘤の頻度は日本と同等であるにも関わらずくも膜下出血の頻度は約3分の1である。この原因は明らかとなっておらず、フランスのグループはこれが脳動脈瘤壁の細菌の検出率の差によるものではないかという報告をしている。

そこで本研究では口腔内細菌及び腸内細菌等の微生物とくも膜下出血との関与と機序を明らかとするために、脳動脈瘤患者バイオバンクを構築し、くも膜下出血や脳動脈瘤に特有の微生物の同定を行う。当該バイオバンクで検証されたくも膜下出血症例に特有の体内微生物やその代謝産物の脳動脈瘤発生・増大への関与を動物モデルで検証し、その機序を解明する。さら実際に臨床例においても微生物の影響を実証できるかを、病変部標本で確認する。最終的にはくも膜下出血予防のための脳動脈瘤に対する本邦発の新しい治療方法の確立、予防・先制医療の拡充のための症例の階層化を可能とする診断手法(唾液・血液・便中バイオマーカー簡易検出キットの開発など)の確立を推進したい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、体内微生物叢とくも膜下出血の発症・病態との関連を臨床的、基礎的手法により明らかとし、体内微生物やそのバイオプロダクトを制御することによる新しい脳卒中医療に繋げることである。

くも膜下出血患者と未破裂脳動脈瘤患者を対象とし口腔内や腸内微生物叢ないしそのバイオプロダクトがどのように脳動脈瘤の形成、くも膜下出血の発症に影響を与えるかを臨床的に検証する。次いでこれらの微生物叢やバイオプロ

ダクトを操作することにより病態を制御し脳動脈瘤の発生や破裂を予防するための新規の治療を創造したい。さらに、微生物叢の口腔や便での構成要素やそのバイオプロダクトを脳動脈瘤破裂危険度を示すバイオマーカーとして症例治療の層別化に利用できないかを検討したい。

3．研究の方法

脳動脈瘤症例(くも膜下出血および未破裂脳動脈瘤)及び非脳血管障害対照患者(脳動脈瘤を持たない良性脳腫瘍患者など)の対象において採血、口腔内スワブ法による唾液採取、大便採取によりバイオバンクを構築する。併せて生活習慣歴も集積する。抗生剤使用履歴のある患者は抗生剤最終使用より6ヶ月経た段階で試料を採取する。

バイオインフォマティクス手法により、脳動脈瘤の発症または破裂に有意差を持ち高く検出される腸内微生物、微生物産物を解明する。主任研究グループでは糞便中の微生物のうちどの微生物由来か(菌叢組成の概略:系統組成解析)、微生物集合体がもつ遺伝子群かの特定(機能組成解析)について、16Sr(リボソーム)RNA 遺伝子の配列データを用いて菌叢組成の概略について健常者や疾患群間での相違をスクリーニングする。唾液に関しては、大阪大学の仲野らにより菌の培養・同定を進める。一部症例では上記遺伝子解析も実施する。

4．研究成果

2020年より日本医科大学付属病院、日本医科大学千葉北総病院、日本医科大学多摩永山病院、日本医科大学武蔵小杉病院、島根県立中央病院、聖隷浜松病院；6病院から症例を集積し175例(くも膜下出血:86例、未破裂頭蓋内動脈瘤:59例、脳血管障害のない対照患者:30例)から食習慣を含む臨床データ、唾液、便、血液検体を収集した。

唾液検体から一般的う蝕源性細菌である *Streptococcus Mutans*(以下 *S. Mutans*)を培養し、*cnm+* *S. Mutans* の発生率を確認した。便検体については、DNAを抽出し16sRNA法とRDB、DB(テクノスルガ株式会社、日本)ライブラリーを用いて細菌種を解析した。

171名の唾液培養・PCR検査の結果、*S. Mutans* は74例(43%)で検出され検体患者群別では差がなかった。うち *cnm+* *S. Mutans* は18例(24.3%)で陽性であった。*cnm* 陽性は未破裂脳動脈瘤、くも膜下出血で対照患者より多い傾向があったが、有意差は認められなかった。有意差は認められなかったが、*S. Mutans cnm+*株は動脈瘤の発生に関与している可能性がある。

便のフローラ分析は119例(SAH68、UCA:29、REF:22)で行われ、SAHの便検体は *Prevotella intermedia*, *Peptacetobacter hiranonis*, *Corynebacterium mycetoides*, 等が多く認められた。これらの菌の中に細菌性心内膜炎などの起炎菌も含まれる。したがって、脳動脈瘤の破裂にはこのよう菌による動脈瘤壁の炎症が関与していることが示唆された。

今後Bioinformatics解析を用いた細かい群や患者背景との検証を行い、血液の代謝産物の解析も含めて脳動脈瘤破裂への細菌叢の関与を検証し、予防医療の確立を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 van der Kamp LT, Rinkel GJE, Morita A, et al. | 4. 巻 78 |
| 2. 論文標題 Risk of Rupture After Intracranial Aneurysm Growth. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 JAMA Neurol. | 6. 最初と最後の頁 1228-1235 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1001/jamaneurol.2021.2915. | 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 該当する |
| 1. 著者名 Zuurbier CCM, Mensing LA, Morita A, et al. | 4. 巻 97 |
| 2. 論文標題 Difference in Rupture Risk Between Familial and Sporadic Intracranial Aneurysms: An Individual Patient Data Meta-analysis. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Neurology | 6. 最初と最後の頁 e2195-e2203 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1212/WNL.0000000000012885. | 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 該当する |
| 1. 著者名 Zuurbier CCM, Molenberg R, Morita A, et al. | 4. 巻 53 |
| 2. 論文標題 Sex Difference and Rupture Rate of Intracranial Aneurysms: An Individual Patient Data Meta-Analysis. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Stroke | 6. 最初と最後の頁 362-369 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/STROKEAHA.121.035187. | 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 該当する |
| 1. 著者名 Nakatomi H, Kiyofuji S, Morita A, Flemming KD, Link MJ. et al. | 4. 巻 88 |
| 2. 論文標題 Giant Fusiform and Dolichoectatic Aneurysms of the Basilar Trunk and Vertebrobasilar Junction- Clinicopathological and Surgical Outcome. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Neurosurgery | 6. 最初と最後の頁 82095 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/neuros/nyaa317. | 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 Ikawa F, Morita A, Nakayama T, Goto Y, Sakai N, Iihara K, Shiokawa Y, Arai H. et al. | 4. 巻 134 |
| 2. 論文標題 A register-based SAH study in Japan: high incidence rate and recent decline trend based on lifestyle. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 J Neurosurg | 6. 最初と最後の頁 983-991 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2020.1.JNS192848. | 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 - |

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|---------------------------|
| 1. 発表者名 森田明夫 |
| 2. 発表標題 未破裂脳動脈瘤の自然歴 |
| 3. 学会等名 第30回日本脳ドック学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------|
| 1. 発表者名 森田明夫 |
| 2. 発表標題 脳動脈瘤発生及び破裂の危険因子 |
| 3. 学会等名 Stroke 2020 |
| 4. 発表年 2020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 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 仲野 和彦 (Nakano Kazuhiko) (00379083) | 大阪大学・歯学研究科・教授 (14401) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 清水 則夫 (Shimizu Norio) (30226245) | 東京医科歯科大学・統合研究機構・准教授 (12602) | |
| 研究分担者 | 村井 保夫 (Murai Yasuo) (30287750) | 日本医科大学・医学部・准教授 (32666) | |
| 研究分担者 | 筋野 智久 (Sujino Tomohisa) (40464862) | 慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612) | |
| 研究分担者 | 青木 友浩 (Aoki Tomohiro) (40633144) | 国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404) | |
| 研究分担者 | 塩澤 裕介 (Shiozawa Yuusuke) (60801511) | 日本医科大学・医学部・助教 (32666) | |
| 研究分担者 | 野崎 和彦 (Nozaki Kazuhiko) (90252452) | 滋賀医科大学・医学部・教授 (14202) | |

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 |
|---------|---------|