

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：11101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K08036
研究課題名(和文) 内視鏡を用いた自閉スペクトラム症の腸内細菌叢を明らかにすることによる病態解明

研究課題名(英文) ASD

研究代表者
久保 一利 (Kubo, Kazutoshi)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80716910
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：岩木健康増進プロジェクト・プロジェクト健診が令和3年6月5日-14日に開催の予定であったがコロナによって延期となり令和3年11月15日-23日に開催された。参加した約800人に対して、自記式のAQ-J-10(広汎性発達障害の診断を識別する能力の高い10項目を抽出したもので、社会的スキル、注意の切り替え、コミュニケーション、想像力の4つの下位尺度から構成される)を施行した。さらに住民に対して糞便の採取が行われ腸内細菌叢を同定するためDNA配列の解析が行われた。旧年度の腸内細菌叢のデータの一部を使って、16SメタゲノムデータをSHIROKANE上でQIIME2を用いて細菌叢の組成割合を推測した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
一般集団の中で、自閉症傾向のある人と、腸内細菌の分布との関係を明らかにする初めての報告になる。今後腸内細菌の分布と、心が状態が解明され、心が落ち着く腸内細菌についての研究が進んでいくことが期待され、さらに自閉症臨床群においても、消化器症状が続く人が何割かの確率であり、従来の消化管治療は効果のないことがあり、自閉症の方の好ましい腸内細菌の分布についても今後明らかになっていき、症状緩和の治療法開発のきっかけとなる研究で社会的意義は大きいと考えた。

研究成果の概要(英文)：The project medical examination of Iwaki Health Promotion Project was scheduled to be held from June 5th to 14th in 3rd year of Reiwa, but it was postponed by COVID19 and held from 15th to 23rd November in 3rd year of Reiwa. A self-administered AQ-J-10 (10 items with high ability to identify the diagnosis of pervasive developmental disorder) was pursued to about 800 participants, and these items were consisted of 4 subscales for social skills, attention switching, communication, and imagination. In addition, feces were collected from the inhabitants. DNA sequences were analyzed to identify the intestinal flora. Using a part of the data of the intestinal flora including the previous year's data, 16S metagenomic data was analyzed by QIIME2 on SHIROKANE. We assumed the composition ratio of the bacterial flora.

研究分野：精神医学

キーワード：自閉スペクトラム症

1. 研究開始当初の背景

人の消化管内には、500種類、100兆個を超える腸内細菌があり、宿主の健康や生理機能の維持に大きく関与している。そして近年、腸内細菌が脳や行動に影響を与えているとの様々な報告があり注目されている (Nature Reviews Neuroscience, 2012; Biological Psychiatry, 2018)。腸内細菌と、宿主との関係は ASD、不安障害、うつ病などの精神疾患に関係があると報告され (Biological Psychiatry, 2017)、腸内細菌と中枢神経系のパスウェイ (腸脳相関) は、自律神経系、内分泌系、免疫系に関係し、腸内細菌が産出する代謝産物や神経伝達物質により、神経伝達系の障害を起こしていると考えられているが詳細はまだ明らかでない。

私たちは腸内相関と関連が報告されている精神疾患の中で ASD に注目した。ASD はコミュニケーション障害やこだわり症状を主体とする疾患であるが、治療法がない。治療法の確立は急務である。ASD は様々な消化管症状を持ち腸内細菌叢との関連が報告されている (Biological Psychiatry, 2016)。動物実験では劣悪な環境下で育った人の腸内細菌叢を、正常マウスの腸に移植すると、発育が悪くなるとの報告がある (Science, 2016)。しかしながらある種のミルクを与えることで発育が促される (Cell, 2016)。MIA マウス (maternal immuneactivation) は、ASD 様の症状を示すことが報告されているが、ある種の細菌 (Bacteroides fragilis) を摂取することで、ASD 様の症状が改善した (Cell, 2013)。ゆえに我々は ASD 固有の腸内細菌叢を明らかにすることで、その腸内細菌叢を変化させることで、ASD の症状の改善を図るような治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

ASD の病態解明を、腸内細菌叢に注目して行い、治療法の可能性を探ることを目的とする。

- 1) 下部消化管内視鏡を用いて腸の内容物を採取することで腸の各部位における、生菌のメタゲノム解析を行い、ASD 群と正常群を比較し、ASD の腸内細菌叢を明らかにする。
- 2) ASD の腸内細菌叢の各種菌種を培養する、それに対してどの菌種が、ASD の消化管の粘膜組織に対して抗原となっているかを明らかにし、ASD 特有の菌種を明らかにする。
- 3) ASD 死後脳の腸内細菌に関する抗原とミクログリアとの関係を明らかにする。
- 4) ASD の幼児期の腸内細菌叢を明らかにし、治療法を探る。

3. 研究の方法

ASD 者の腸内細菌叢を明らかにする。

1) 対象者のリクルート

研究対象者

研究対象者は DSM5 の自閉スペクトラム症 (ASD) の診断基準をみたし、20 歳以上、IQ が 85 以上、てんかん、その他の神経疾患の既往がない。条件をマッチさせた健常者を対照とする。対象者数は ASD 10 名、健常者 10 名である。ASD の診断は、ASD 研究の国際水準となっている ADI-R (Autism Diagnostic Interview Revised) と ADOS (Autism Diagnostic Observation Scale) により行う。対象者の選択は弘前大学医学部附属病院神経科精神科、弘前愛成会病院に通院している外来患者から行う。

2) 内視鏡による腸内内容物採取

対象者に対しては文章による十分な説明を行い同意取得する。下部消化管内視鏡挿入、偶発症として出血、穿孔が報告されているが、極めてまれであり、止血を十分に確認する。

当日は、下剤など前処置をせず、下部消化管内視鏡を回腸末端まで挿入する。直腸 S 状結腸、下行結腸、横行結腸、上行結腸、盲腸および回腸末端において、無菌的に各部位の内容物、粘膜組織 (鉗子生検による)、粘液 (ブラッシングによる) をそれぞれ採取する。ただちに各検体を 2 つに分ける、嫌気的条件下で 4℃ 保存の群と、DNA 解析用の群である。

3) 腸内細菌叢の細菌分布や関連遺伝子の同定

メタゲノム解析: 凍結保存した腸内内容物から DNA を抽出し、ショットガンライブラリーを作成し、HiSeq/MiSeq を用いてシーケンスを実施する。取得した塩基配列のアセンブルを行い、遺伝子領域を予測して、COG (Clusters of Orthologous Groups) や KEGG データベースに対する相対性検索を行う。そしてクラスタリング、代表配列抽出、Blast 検索、系統分類を行い、各種サンプルの菌叢を同定する。ASD 群、正常群に対して、グループ間の菌叢の違いを、主成分分析およびクラスタ解析により解析し、ASD の特定の菌叢を明らかにする。さらに、ASD 群と対照群の機能組成解析をグループ間で比較することで、ASD 特有の cell cycle、replication、transcriptionなどを同定する。

ASD の腸内細菌叢の各種菌種を培養し、どの菌種が、ASD の消化管の粘膜組織に対して抗原となっているかを明らかにする。

1) ASD 群の特定の菌叢に対する、ASD の粘膜細胞における抗体反応を特定する

ASD 群の嫌気保存システムで保存された腸内内容物から、ASD 有意の菌叢群を培養する の結果から同定された ASD 特定の菌体に対して、1;非選択培地 ,2;選択的に利用される物質を含有した培地 ,3;目的菌以外の菌の発育を阻害する物質を含有した培地 ,4;集落の鑑別を容易にする物質を含有した培地などを用いて、特定の菌種を培養する。

ASD 群で特定された各菌種に対して、抗体を作成する。各菌種を加熱死菌、アジュバントを含めてウサギに筋肉注射をして抗体を作成する。血清の硫酸沈殿を行い、カラムクロマトグラフィーで IgG 分画を抽出し、クロマトグラフィーでポリクローナル抗体を溶出する。

鉗子生検により摘出した粘膜組織をホルマリン固定し、包埋装置でパラフィン固定をする。ミクロトームで薄切り切片にして、ガラス版に張り付ける。脱パラフィンした後、上記のポリクローナル抗体を使って、ABC 法で、粘膜細胞における各種菌群由来の抗原を同定する。

ASD 死後脳の腸内細菌に関する抗原とミクログリアとの関係を明らかにする。

1) ASD 死後脳における、ASD 特定細菌群の抗原の検出と、ミクログリア活性との関連の検索
米国の Autism Tissue Project より得た ASD 死後脳サンプル 10 検体、正常群 10 検体を使用し上記の抗体を用い抗原の発現を比較する。我々の PET 研究で、ミクログリア活性が高く ASD の病態に関連する部位である前帯状回、皮質運動野、視床で行う (JAMA Psychiatry. 2013)。上記と同様に死後脳からパラフィン切片を作成し上記の抗体と活性型ミクログリアの抗体として抗 Iba1 を用い二重染色で特定の菌叢の抗原局在とミクログリアとの関連を明らかにする。

ASD の幼児期の腸内細菌叢を明らかにする。

1) 5 歳児自閉症の糞便における菌叢と治療法の探索

我々は毎年弘前市内在住の 5 歳児発達健診を行い、ASD を診断している。5 歳児の ASD 群 10 例、正常群 10 例の糞便を採取し、上記と同様のメタゲノム解析をして、腸内細菌叢を同定する。内視鏡で採取した腸内細菌叢群と比較検討し、5 歳児 ASD 群の腸内細菌叢で疾患特異性のある菌叢を同定する。それらの菌叢に対して、選択的な抗生剤による除菌、栄養素または生菌摂取による他の菌が繁殖しやすい腸内環境などを検討し、ASD の腸内細菌叢コントロールによる ASD の症状を緩和する治療法を模索する。

4 . 研究成果

研究対象者は DSM5 の自閉スペクトラム症 (ASD) の診断基準をみたし、20 歳以上、IQ が 85 以上、てんかん、その他の神経疾患の既往がない、といった条件をマッチさせた者を対象とした。対象者数は ASD10 名を目標とした。ASD の診断は、ASD 研究の国際水準となっている ADOS (Autism Diagnostic Observation Scale) により行った。対象者のリクルートは弘前大学医学部附属病院神経科精神科で 1 年かけて行った。特に注意欠如多動性障害、統合失調症、うつ病、不安障害などの他の精神疾患との鑑別診断や内科的疾患の既往歴、例えば、アレルギー性疾患などを確認した。そして、医学的な検査が受けられるかどうかの有無も確認した。その中で ASD の診断基準をみたしたのは、男性 7 人、女性 3 人で、平均年齢は 24 歳、IQ は平均 106.8 である。彼らに対して内視鏡による糞便採取を行う予定であったが、COVID19 の流行のため、2 年ほど臨床的研究が制限され施行できなかった。

基礎的研究については、炎症性腸疾患モデルマウスにおいて、黄色ブドウ球菌感染が、体重減少、腸管縮小、下痢、腸管出血を促進することを明らかにした。

研究対象を、一般住民として研究を施行した。自閉症者における腸内細菌研究は、高齢者についても年を取るにつれて、頑固で偏屈となり、自閉症様症状が出現するのではという仮説が報告されている。健常者の分布においても自閉症傾向と腸内細菌叢の分布に相関があるのではと推測した。ゆえに 2 年目は、一般住民の方の自閉症傾向と腸内細菌の関連の研究を行う準備を行った。自閉症傾向は住民の方約 1000 人に自記式の AQ-J-10 (広汎性発達障害の診断を識別する能力の高い 10 項目を抽出したもので、社会的スキル、注意の切り替え、コミュニケーション、想像力の 4 つの下位尺度から構成される、Kurita et al., 2005) を施行する。住民に対して糞便を採取し、次世代シーケンス解析によって DNA 配列の全てを解析し、細菌のデータベースを元に腸内細菌叢を同定する。そして自閉症傾向との相関を明らかにする準備を行った。

最終年度は岩木健康増進プロジェクト・プロジェクト健診が令和 3 年 6 月 5 日-14 日に開催される予定であったがコロナによって延期となり令和 3 年 11 月 15 日-23 日に開催された。参加した約 800 人に対して、自記式の AQ-J-10 (広汎性発達障害の診断を識別する能力の高い 10 項目を抽出したもので、社会的スキル、注意の切り替え、コミュニケーション、想像力の 4 つの下位尺度から構成される) を施行した。さらに住民に対して糞便の採取が行われ腸内細菌叢を同定するため DNA 配列の解析が行われた。その他として、旧年度の腸内細菌叢のデータの一部を使って、16S メタゲノムデータ (Fastq ファイル) を SHIROKANE 上で QIIME2 を用いて細菌叢の組成割合 (コンポジション) のデータに変換し、オンラインツールを使って可視化し、このコンポジションデータから PICRUST を用いて予測メタゲノム解析を実施した。コロナの影響で令和 3 年度のプロジェクト実施が遅れた。研究自体は終了しているが、データ付与が遅れている。付与され次第データ解析をし、論文発表を行い報告する。

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 5件）

1. 著者名 Narita K., Asano K., Naito K., Ohashi H., Sasaki M., Morimoto Y., Igarashi T., Nakane A.	4. 巻 105(3)
2. 論文標題 Ultraviolet C light with wavelength of 222 nm inactivates a wide spectrum of microbial pathogens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hospital Infection	6. 最初と最後の頁 459 ~ 467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhin.2020.03.030	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 Suzuki Yasunori, Ono Hisaya K., Shimojima Yukako, Kubota Hiroaki, Kato Rei, Kakuda Tsutomu, Hirose Shouhei, Hu Dong-Liang, Nakane Akio, Takai Shinji, Sadamasu Kenji	4. 巻 92
2. 論文標題 A novel staphylococcal enterotoxin SE02 involved in a staphylococcal food poisoning outbreak that occurred in Tokyo in 2004	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food Microbiology	6. 最初と最後の頁 103588 ~ 103588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fm.2020.103588	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 Ono HK, Hirose S, Narita K, Sugiyama M, Asano K, Hu D-L, Nakane A.	4. 巻 15(5)
2. 論文標題 Histamine release from intestinal mast cells induced by staphylococcal enterotoxin A (SEA) evokes vomiting reflex in common marmoset.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS Pathog	6. 最初と最後の頁 e1007803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1007803.	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 該当する
1. 著者名 Narita Kouji, Hu Dong-Liang, Asano Krisana, Nakane Akio	4. 巻 87(10)
2. 論文標題 Interleukin-10 (IL-10) Produced by Mutant Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Vaccine-Induced Memory T Cells Downregulates IL-17 Production and Abrogates the Protective Effect against Staphylococcus aureus Infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00494-19.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00494-19	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 該当する

1. 著者名 Aziz Fatkhanuddin, Hisatsune Junzo, Yu Liansheng, Kajimura Junko, Sato 'o Yusuke, Ono Hisaya K., Masuda Kanako, Yamaoka Mika, Salasia Siti Isrina Oktavia, Nakane Akio, Ohge Hiroki, Kusunoki Yoichiro, Sugai Motoyuki	4. 巻 88(2)
2. 論文標題 Staphylococcus aureus Isolated from Skin from Atopic-Dermatitis Patients Produces Staphylococcal Enterotoxin Y, Which Predominantly Induces T-Cell Receptor V _β -Specific Expansion of T Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00360-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00360-19	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 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Asano K, Hirose S, Subsomwong P, Nakane A.
2. 発表標題 Membrane vesicles released from Staphylococcus aureus induce inflammatory response and host cell death.
3. 学会等名 IUMS 2020 Daejeon International Union of Microbiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Asano K, Hirose S, Narita K, Nakane A.
2. 発表標題 MRSA-derived membrane vesicles act as an IgE-mediated stimulant to induce hypersensitivity.
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Narita K, Morimoto Y, Ohashi H, Igarashi T, Asano K, Nakane A.
2. 発表標題 Interfering effect of wound exudates on 222 nm-UVC light protects fibroblast in dermal damaged site.
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Asano K, Hirose S, Narita K, Nakane A
2. 発表標題 Pathogenesis of extracellular vesicles derived from Staphylococcus aureus
3. 学会等名 第64回日本ブドウ球菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asano K, Yoshimura S, Narita K, Hirose S, Takahashi T, Ito K, Iddamalgoda A, Nakane A
2. 発表標題 Alteration of intestinal microbiota in mice orally administered with salmon cartilage proteoglycan, a prophylactic agent
3. 学会等名 11th International Conference on Proteoglycans (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirose S, Ono HK, Hu D-L, Yamamoto Y, Asano K, Nakane A
2. 発表標題 Goblet cells are involved in translocation of staphylococcal enterotoxin A in the intestinal tissue of house musk shrew (Suncus Murinus)
3. 学会等名 第1回弘前メディカルサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanaka N, Hiraga H, Sauraba H, Higuchi N, Ariake C, Maeda T, Murai Y, Watanabe R, Ota S, Akemoto Y, Hasui K, Yoshida S, Asano K, Nakane A, Fukuda S.
2. 発表標題 Vitamin A deficiency impairs host resistance to Listeria monocytogenes through excessive apoptosis of macrophages
3. 学会等名 第1回弘前メディカルサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅野クリスナ、廣瀬昌平、成田浩司、中根明夫
2. 発表標題 Microvesicles released from <i>Staphylococcus aureus</i> induce inflammatory response and pyroptosis
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣瀬昌平、浅野クリスナ、小野久弥、成田浩司、胡 東良、中根明夫
2. 発表標題 Staphylococcal enterotoxin A evokes diarrhea after vomiting reflex in common marmoset
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野久弥、茂木遼介、岡村雅史、浅野クリスナ、中根明夫、胡 東良
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌感染が炎症性腸疾患モデルマウスに与える影響の解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成田浩司、浅野クリスナ、佐々木正裕、森本幸裕、五十嵐龍志、中根明夫
2. 発表標題 222 nm-UVCの病原細菌、真菌、ウイルスに対する滅菌効果
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
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	中村 和彦 (Nakamura Kazuhiko) (80263911)	弘前大学・医学研究科・教授 (11101)	
研究分担者	三上 達也 (Mikami Tatsuya) (70344611)	弘前大学・医学部附属病院・准教授 (11101)	
研究分担者	中根 明夫 (Nakane Akio) (30164239)	弘前医療福祉大学・保健学部・教授 (31107)	
研究分担者	下山 修司 (Shimoyama Shuji) (60736370)	弘前大学・医学研究科・助教 (11101)	
研究分担者	坂本 由唯 (Sakamoto Yui) (60770386)	弘前大学・医学部附属病院・助教 (11101)	

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
---------	---------