

平成30年 6月19日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14742

研究課題名(和文) 精神的ストレスによる腸内細菌叢の変動はうつ様症状の原因となるか？

研究課題名(英文) The effect of intestinal microbiota on behavior in social defeat mouse

研究代表者

青木 綾子 (Aoki, Ayako)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：60610368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに社会的敗北ストレスマウスにおいて、腸内の胆汁酸濃度が増加すること、および腸内細菌叢が変動することを見出している。本研究では、これら腸内の変動がマウスのうつ様行動に影響を及ぼすかどうか検討した。胆汁酸吸着レジンの投与および胆汁酸の投与試験の結果から、予想外に胆汁酸が社会性行動を向上させる可能性があることを見出した。また、社会的敗北ストレスマウスの糞便を移植した実験から、マウスの腸内細菌叢が社会性行動に影響していることを示唆する結果を得た。以上、本研究により、社会的敗北ストレスマウスにおいて胆汁酸および腸内細菌叢が社会性行動に影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that social defeat stress increased the bile acid concentration in cecum and altered the intestinal microbiota. In this study, we investigated whether these alterations in intestine affect mouse behavior. Administration of cholestyramine which can adsorb bile acids, tended to suppress social behavior. In addition, administration of bile acid enhanced gene expression of neurotropic factor in mouse brain. These results suggest that bile acids may have antidepressant effect. Furthermore, transfer of fecal microbiota from social defeat mice affected social behavior of recipient mice, suggesting that alteration of intestinal microbiota may affect social behavior in social defeat mice.

研究分野：食品免疫学

キーワード：腸内細菌 精神的ストレス 胆汁酸

1. 研究開始当初の背景

近年、腸内細菌叢と精神疾患の関係に高い関心が払われるようになってきた。精神状態が腸内細菌叢によって制御されていることを示唆する結果が多数報告されており、例えば Collins らは行動が異なるマウスの系統から腸内細菌叢をそれぞれ移植することでその行動パターンが移植されることを明らかにしている (Collins ら、*Curr. Opin. Microbiol.*, 2013)。またプロバイオティクスを用いて腸内細菌叢を改善することでうつや自閉症といった精神疾患が治療できる可能性も報告されている (Michael ら、*Br. J. Nutr.*, 2011、Elaine ら、*Cell*, 2013)。これらの知見は腸内細菌叢が精神状態に影響を与えることを端的に示している。一方で、精神的ストレスが腸内細菌叢を変動させることもわかってきている。例えば、サルにおける母子分離ストレスは腸内細菌の中で *Lactobacillus* を減少させることが報告されている (Michael ら、*Dev. Psychobiol.*, 1999)。また、我々は、ヒトのうつ病に近いと考えられている社会的敗北ストレスモデルを用いた検討を行い、慢性的な精神的ストレスによりマウスの腸内細菌叢が変動することを明らかにしている (Aoki-yoshida ら、*J. Proteome Research*, 2016)。

2. 研究の目的

近年、腸内細菌 腸 脳 (MGB) 軸の存在が注目を集めている。MGB 軸は腸内細菌叢が宿主の精神状態に影響を与える一方、精神的ストレスにより腸内細菌叢が変動するという双方向の関係のことであり、MGB 軸の存在は慢性的な精神ストレスによる腸内細菌叢の変動が、うつ様症状などを引き起こす原因となることを示唆する。本研究ではうつ様モデルとして有用な社会的敗北ストレスモデルマウスを用いて、社会的敗北ストレス負荷により生じた腸内代謝物や腸内細菌叢の変動が不安行動の原因となるかを明らかにすることを目的とした。本研究によりこれが明らかになれば、腸内細菌叢や腸内細菌叢を変動させる要因をターゲットとする新しい治療方法の開発に繋がると期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、社会的敗北ストレス負荷による胆汁酸の増加がうつ様行動の原因になっているかどうか調べるため、胆汁酸吸着レジンの投与試験を行うとともに胆汁酸投与マウスの脳内遺伝子発現を評価した。また、社会的敗北ストレス負荷による腸内細菌叢の変動がうつ様症状の原因となっているかを明らかにするため、腸内細菌叢の移植実験を行い、移植したマウスの行動を評価した。

4. 研究成果

胆汁酸吸着レジンであるコレステラミンの投与がマウスの行動に与える影響を調べ

た。C57BL/6J マウスにコレステラミンを含む AIN-93G 固形飼料を自由摂取させた。その後、オープンフィールドテストおよび高架式十字迷路により不安行動を評価し、social interaction test により社会性を評価した。さらに、強制水泳テストおよび tail suspension test により、うつ様行動を評価した。コレステラミンの投与は、マウスの不安行動に影響を与えなかったが、社会性を低下させる傾向を認めた (図1)。我々は、胆汁酸の主要成分であるコール酸の投与がマウスの社会性行動を向上させることを明らかにしていることから、胆汁酸が脳腸相関を形成する一つの有力な因子である可能性が示唆された。

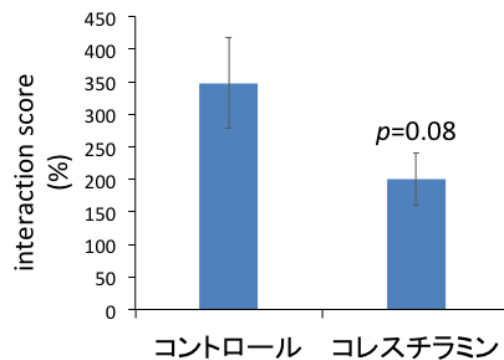


図1. コレステラミンの経口投与が C57BL/6Jマウスの社会性に与える影響

コントロール、2.5%コレステラミン含有飼料を12日間自由摂取したマウスにsocial interaction testを行った。social interaction score (%)は $100 \times (\text{ターゲット存在時のインタラクションゾーン滞在時間}) / (\text{ターゲット不在時のインタラクションゾーン滞在時間})$ で算出した。グラフは全て平均値 \pm 標準偏差で表した (n=12)。有意差検定はStudent's t検定を用いた。

次に、胆汁酸の経口投与および腹腔投与が、記憶と情動に関係する海馬や自律神経機能を調節している視床下部における遺伝子発現に与える影響を解析した。C57BL/6J マウスに0.1%のコール酸を含む AIN93G 飼料を10日間自由摂取させた。マウスの脳から海馬および視床下部を摘出し、セロトニン需要亭、神経栄養因子 (BDNF、GDNF、FGF2、NGF)、消化管ホルモン (CCK)、胆汁酸受容体 (TGR5、FXR、VDR) の mRNA 発現量を real time RT-PCR で解析した。その結果、視床下部において2回の試験でそれぞれ BDNF もしくは GDNF の発現量の増加が観察されたが、海馬においては有意な差は認められなかった。次に、胆汁酸の腹腔投与効果を検討した。C57BL/6J マウスにケノデオキシコール酸 (CDCA) 溶液とリトコール酸 (LCA) 溶液をそれぞれ 100 μ l ずつ腹腔投与し、マウスの脳から海馬および視床下部を摘出し神経栄養因子の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR により解析した。その結果、LCA の投与は視床下部の BDNF の発現量を増加させ、CDCA の投与も、視床下部における

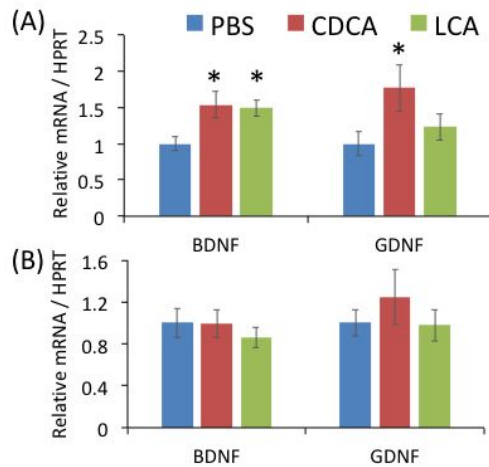


図2. 胆汁酸の腹腔投与がC57BL/6Jマウスの脳の遺伝子発現に与える影響

ケノデオキシコール酸(CDCA)、リトコール酸(LCA)を腹腔投与した後、マウスの脳の視床下部(A)および海馬(B)を摘出し、RNA抽出、cDNA合成を行い、Real time RT-PCRにより、神経栄養因子のBDNF、GDNFの発現量を測定した。それぞれの発現量は全てHPRTで補正し、コントロールを1としたときの相対値で示した。グラフは全て平均値±標準偏差で表した(n=18)。有意差検定はDunnnett法を用い、危険率5%以下のものを*で表した。

BDNF および GDNF を有意に増加させた(図2)。一方で、これらの投与は海馬の遺伝子発現においては有意な影響を与えなかった。これらの結果から、胆汁酸の生体内への直接の投与により、視床下部の BDNF を上昇させることが示された。

続いて、社会的敗北ストレスにより変動する腸内細菌がマウスの行動に及ぼす影響を調べるため、糞移植試験を行った。C57BL/6JマウスをICRマウスの居住スペースにいれることで10分間攻撃を受けさせた後、同じケージでICRマウスとしきりを挟んで隣り合わせて飼育した。これを10日間繰り返し、C57BL/6Jマウスに社会的敗北ストレスを負荷した。高架式十字迷路とsocial interaction testを実施し、social interaction testにおいて社会性行動が低下した個体をsusceptible、社会性行動が低下しなかった個体をresilienceとし、2群に分けた。社会的敗北ストレスを負荷しなかった対照マウスを含め3群のマウスから糞便を採取し、10%グリセロールに懸濁後、-80で保存した。移植先のマウスを準備するため、C57BL/6Jマウスに抗生物質水溶液を20日間自由飲水させ、腸内細菌を殺菌した。滅菌水に切り換えた後、マウスを3群に分け、control、susceptible、resilienceの糞便懸濁液を3日間強制投与した。10日後、高架式十字迷路とsocial interaction testを実施した。その結果、高架式十字迷路に関しては各糞移植群で差を認めなかったが、社会性行動に関しては有意ではないものの、resilienceの糞便投与群で社会性行動が高まる傾向が見られた(図3)。また、興味深いことにsusceptibleの糞便を移植したマウスでは社会性行動が大きく低下する個体が生

じた、以上の結果から、社会的敗北ストレスにより変動する腸内細菌がマウスの行動に影響を与えている可能性が示唆された。

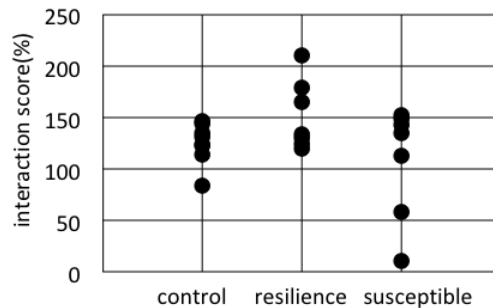


図3. 社会的敗北ストレスにより変動する腸内細菌がマウスの行動に及ぼす影響

社会的敗北ストレスを負荷したC57BL/6Jマウスにおいて社会性行動が低下した個体をsusceptible、社会性行動が低下しなかった個体をresilienceとし、社会的敗北ストレスを負荷しなかったcontrolを含め3群のマウスから糞便を採取した。抗生物質水溶液を投与して腸内細菌を殺菌したC57BL/6Jマウスを3群に分け、それぞれにcontrol、resilience、susceptibleの糞便懸濁液を強制投与した。10日後にsocial interaction testを実施した(n=7~8)。

以上、本研究により、社会的敗北ストレスにより変動する腸内の胆汁酸および腸内細菌叢が社会性行動に影響を及ぼしている可能性があることが明らかになった。

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0件)

なし

〔学会発表〕(計1件)

伊藤誠晃¹、青木綾子¹、山岸直子²、青木玲二²、鈴木チセ²、高山喜晴²、戸塚護^{1,1}、東京大学農学生命科学研究科、²農研機構・畜産草地研究所「コール酸の経口投与がC57BL/6Jマウスの社会性行動および不安行動に与える影響」日本農芸化学会、平成28年3月27-30日、札幌

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 綾子 (AOKI, Ayako)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
特任助教
研究者番号：60610368

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山岸 直子 (YAMAGISHI, Naoko)
農研機構・畜産草地研究所・特別研究員
研究者番号：40646840

(4) 研究協力者

なし