

令和元年9月19日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08540

研究課題名(和文)ナルコレプシーの誘因としてのマイクロビオータを動物モデルで検証する

研究課題名(英文)Microbiota as a trigger factor for narcolepsy

研究代表者

児玉 亨(KODAMA, Tohru)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・シニア研究員

研究者番号：20195746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はナルコレプシー患者において腸内細菌叢がその発現基盤を形作っている可能性について検討した。ナルコレプシー群24例、発達障害群32例(内ADHD10例、その他睡眠障害18例)、と正常群17例の腸内細菌叢の解析を行った。クラスター解析を用いてナルコレプシー7症例とコントロール群(13例)の腸内細菌叢の違いを検討したところナルコレプシー群とコントロール群の2群に分かれる傾向が見られた。おもにBifidobacterium、Clostridium cluster IV群、XIVa群が主成分となり分類される傾向にあった。ナルコレプシー群ではビフィズス菌群が安定して多い傾向が観測されている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナルコレプシーの病態であるオレキシン細胞の機能不全を引き起こす要因に関して多くの研究が進められているが、全体像を説明するには至っていない。我々は腸内細菌叢が免疫・代謝と密接に関連することに着目、ナルコレプシー患者においても腸内細菌叢がその発現基盤を形作っている可能性について検討した。本研究に於いてナルコレプシー患者群で特異的な腸内細菌群が明らかになり、今後のナルコレプシーの病態解明と治療への足がかりになるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Many researches have been conducted on factors that cause dysfunction of orexin cells, but, it has not succeeded to explain the whole picture. Focusing on the close association of the intestinal flora with immunity and metabolism, we examined the possibility that the intestinal flora might form the basic condition for expression of narcolepsy. We analyzed the bacterial flora from 74 outpatients at Seiwa Hospital. [24 cases of narcolepsy group; 32 cases of developmental disorder group (10 cases of ADHD); 18 cases of other sleep disorder]. Cluster analysis was used to investigate differences in intestinal flora between 7 cases of narcolepsy and 13 controls. The Narcolepsy group and the control group tended to be divided into two different clusters. Principal component analysis indicated that Bifidobacterium, Clostridium cluster IV and XIVa groups are the main contributing factors. It was found that the narcolepsy group tends to have abundant bifidobacteria.

研究分野：睡眠科学

キーワード：腸内細菌 ナルコレプシー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

典型的な過眠症であるナルコレプシーは日本人集団において罹患率 1/600 人を示し、日中の強い眠気と情動脱力発作を主徴とする。柳沢らにより「ナルコレプシーは神経伝達物質オレキシンの機能異常に基づく疾患」であることが報告され、治療目的でオレキシン関連薬剤も精力的に開発されている。一方で、オレキシン細胞の機能不全を引き起こす直接の原因は未だ明らかになっていない。

組織適合性抗原 HLA の DQB1*0602 アリルおよび T 細胞受容体 (TCR) との強い関連の報告、ならびに情動脱力発作が大量の IgG 静注により改善された症例からナルコレプシーの病態における自己免疫機序の関与が常に検討されてきた。我々のグループ (宮川ら) による網羅的遺伝子解析 (GWAS) では TCR や、ケモカイン受容体 (CCR) 近傍に変異が見られ、免疫との関連が示唆されている。しかし、我々の検討では有力視されていた TRIB2 ペプチドによる自己免疫仮説はペプチド特異性が低いことが判明し、オレキシン活性の低下は見られるが、ナルコレプシー症状の発現には至っていない。ナルコレプシー発症には免疫賦活に加え何らかの外部環境要因の検討が必要である。

免疫との関連性に加えて代謝に関連する知見も得られている。我々のグループの GWAS 研究から Carnitine palmitoyltransferase I-like protein (CPT1B) 変異が報告され、脂質代謝やエネルギー代謝の関連が示唆された。我々はこの経路に関わるカルニチンの投与を試み、過眠症症例の一部で睡眠維持作用を改善することを見つけた。カルニチンは腸内細菌の種類によって、分解吸収過程が変わることが知られており、カルニチン有効例は特別なフローラを持っている可能性も考えられる。またオレキシン細胞分化に関わる N アセチルマンノサミンも腸内細菌によりシアル酸に分解利用されることから、睡眠改善に関わる候補物質が何らかの形で腸内細菌の影響下にあることがわかる。

ナルコレプシーは上記のように免疫、代謝機構が深く関連することが示唆されている。さらに近年、腸内細菌叢が免疫・代謝と密接に関連するという報告が相次いでいる。そこでナルコレプシーの病態基盤を腸内細菌叢の検討に求めた。

2. 研究の目的

オレキシン神経の発見後の精力的な研究において、ナルコレプシーの病態であるオレキシン細胞の機能不全を引き起こす要因が検討・検証されているが、全体像を説明するには至っていない。われわれは腸内細菌叢が免疫・代謝と密接に関連することに着目。ナルコレプシー患者においても腸内細菌叢がその発現基盤を形作っている可能性について検討した。本研究では、ナルコレプシー患者に共通の HLA 型による腸内環境形成、あるいは食事摂取や全身の健康状態が腸内細菌叢に干渉することで、直接間接に腸内免疫系や腸内細菌による代謝・産生物質の取り込みを変化させ、オレキシン活動に影響を与え睡眠覚醒に作用、さらに他の誘因と重なることでオレキシン細胞障害性を引き起こすという作業仮説の検証を目的とする。

3. 研究の方法

1) 臨床献体の採取と解析

清和病院にて PSG 検査入院をした 74 症例およびコントロール群 14 例に関して腸内細菌叢解析を行った。PSG/睡眠脳波検査を行った翌朝に約 20mL の採血を行い、血清およびリンパ球を分離・凍結保存する。また PSG 検査/睡眠脳波の翌日、便を採取。患者便および対照群から DNA を抽出し、遺伝子解析によってヒト腸内細菌の網羅的解析を行った。検査対象と手順：清和病院睡眠外来にて終夜脳波記録のために入院した 74 症例 (ナルコレプシー群 24 例、発達障害群 32 例 (内 ADHD 10 例)、その他睡眠障害 18 例) とボランティアとして参加した正常群 17 例に対して研究参加に先立ち研究についての説明と参加への同意を得られたものを研究対象とした。夜間検査中の間食は代謝物の変動をもたらすため無しとし、PSG/睡眠脳波検査を行った翌朝に約 20mL の採血を行い、血清およびリンパ球を分離・凍結保存する。また PSG 検査/睡眠脳波の翌日、採便

キットで便を採取する(通常の健診で用いられる検便と操作は同様。細菌叢を維持できる安定化剤入り)。便採取が翌日できない場合は、睡眠検査後初回の排便時に採取で可とする。(倫理審査、および患者さんの同意は取得済み)

腸内細菌叢の分析：患者便からDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析によってヒト腸内細菌の16S rRNAの網羅的解析を行う(受託検査：テクノスルガラボ；T-RLFPフロー解析)。DNA抽出とメタゲノム解析は受託検査(イルミナMiSeq)。また血清および脊髄液はメタボローム解析(HMT社のCE質量分析による解析)に用いた。

2) ナルコレプシーモデルマウスと睡眠への影響

細菌叢移植マウスの作製：クレアから導入した無菌マウスあるいは抗生物質投与により一時的に無菌化。その後フロー解析により代表的フローラを患者群と正常群から選択。無菌マウスに移植、ノトバイオート化する。

睡眠・行動の計測：睡眠段階判定用の電極、体温行動量測定用プローブを麻酔下に装着する。ナルコレプシー発症群と未発症群で行動変化、睡眠段階変化を計測する。

ナルコレプシーモデルマウスへの介入：行動に変化が見られたマウス群に対して部分断眠の影響を見るときに、睡眠改善効果のある物質(カルニチン、N-アセチルマンノサミン)の投与を行い効果判定した。

4. 研究成果

腸内細菌叢の解析：清和病院睡眠外来にて終夜脳波記録のために入院した74症例を対象とした。内訳はナルコレプシー群24例；発達障害群32例(内ADHD10例)；その他睡眠障害18例、とボランティアとして参加した正常群17例を用いて腸内細菌叢の解析を行った。図1に全例の腸内細菌叢代表9群と同定できない菌群の割合を示している。腸内細菌叢は年齢、投薬、睡眠、ストレスなど多くの要因の影響を受けている事が知られており、それらのファクターを調整後の検討が必要となる。ナルコレプシー群における検討は交互要素の調整後に行った。

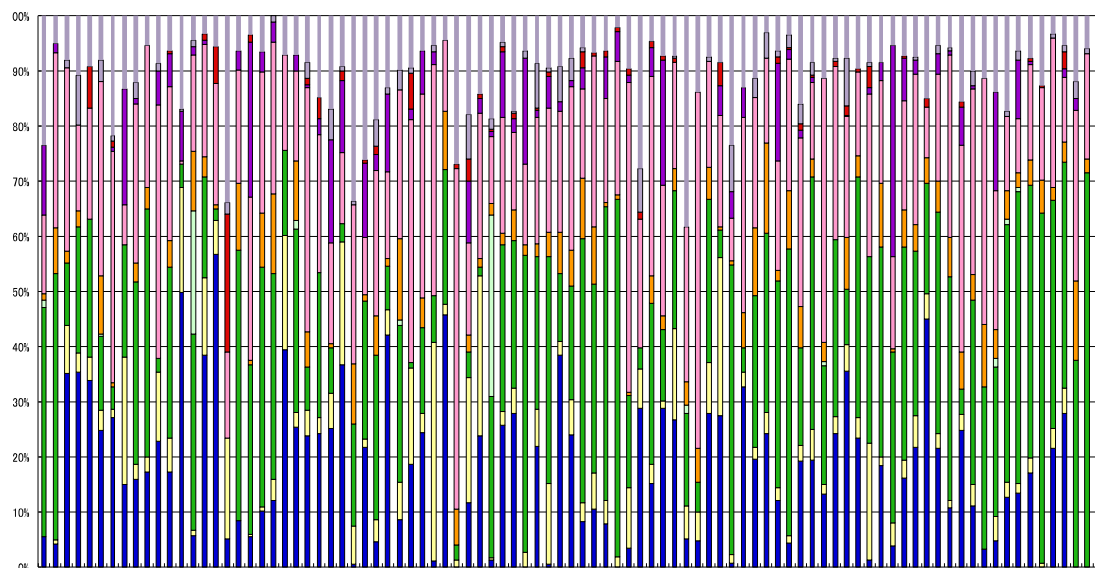


図1 91例の腸内細菌叢分布

横軸に患者群74例と対照群17例をしめす。縦軸は腸内細菌叢の9群と未分類1群を全体を100%として表示している。腸内細菌叢は下から上へBifidobacterium、Lactobacillales目、BacteroidesPrevotella、Clostridium cluster IV、Clostridium subcluster XIVa、Clostridium cluster IX、Clostridium cluster XI、Clostridium cluster XVIII、othersの順序に占有率として表記。

患者検体の分析：PSG/睡眠脳波検査を行った翌朝に採取、凍結保存した血清およびリンパ球と睡眠外来にて採取した脳脊髄液を一部用いてメタボローム解析を行っている。これまでの成果としてグルタミン酸、セリンなどの代謝亢進が観察されている。またリンパ球からは mRNA を抽出してメチル化部位の検討をすすめており、関連研究として CCR3 の特異的メチル化に関する知見を得てマウスでの検討を合わせて進めている。

ナルコレプシー群におけるクラスター解析：クラスター解析を用いてナルコレプシー7症例とコントロール群（13例）との間の腸内細菌叢の違いを検討した。交互作用を調整して検討したところナルコレプシー群とコントロール群の2群に分かれる傾向が見られた（図2）おもに Bifidobacterium、Clostridium cluster IV 群、XIVa 群が主成分となり分類される傾向にあった。ナルコレプシー群ではビフィズス菌群が安定して多い傾向が観測されている。

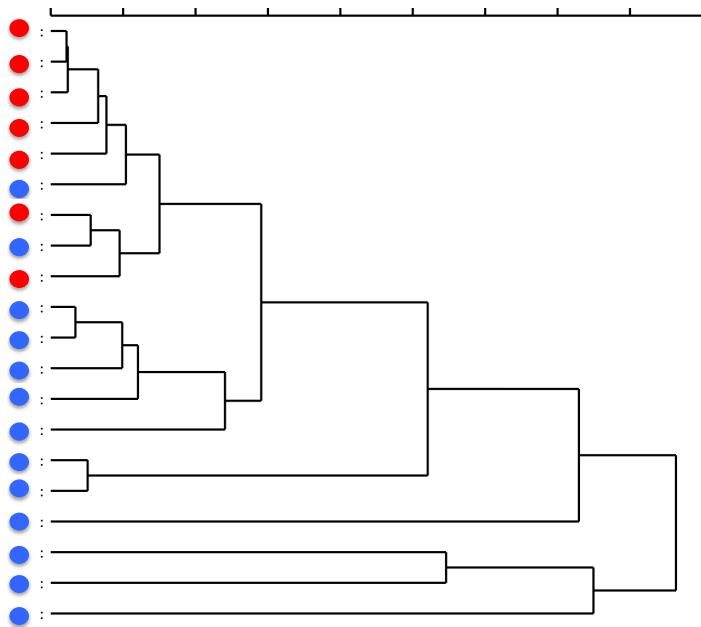


図2 ナルコレプシー群のクラスター分析

代表的 20 例（ナルコレプシー7例、対照群 13例）のクラスター解析によるデンドログラム。赤丸：ナルコレプシー群、青丸：対照群。ナルコレプシー群は対照群に比べ腸内細菌叢が近い関係にある事がわかる。

発達障害と腸内細菌叢：睡眠障害を高い頻度で併発する発達障害症例でも睡眠傾向と腸内細菌分布に関連が見られた。しかしナルコレプシー群に比べると多様性が大きいため正常群とかなり重なる部分が見られ、サンプル数を増やす事でより厳密なグループ化のもとでの検討が必要とされる。

動物モデルへの睡眠改善薬の投与（カルニチン、N-アセチルマンノサミン）：ノトバイオート動物において睡眠改善薬物の投与群と非投与群により腸内細菌叢の安定的違いが確認された。さらに、妊娠マウスに睡眠改善薬を飲水中に混ぜて管理、出産後も母乳、飲水から摂取できるように管理する事で、ノトバイオート動物で得られた動物と同じ効果が確認された。今後の実験の簡略化を図るためこの手法も有効であると考えられる。

動物モデルへの便移植への検討：ナルコレプシー群での特徴的腸内細菌叢が選択できなかったため代表的細菌叢の経口投与による検討を行った。行動記録と日内変化、脳波記録による睡眠覚醒サイクルの変化、断眠によるオレキシン細胞の活動性の変化などを調べたが、優位な違いは観察されなかった。今後 CCR マウスなどナルコレプシー発現に関係するマウスを用いて複合的影響を検討する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Toyoda H, Honda Y, Tanaka S, Miyagawa T, Honda M, Honda K, Tokunaga K, Kodama T. Narcolepsy susceptibility gene CCR3 modulates sleep-wake patterns in mice. PLoS ONE (2007)12(11): 1-17 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187888>.

Ito W, Honda M, Ueno T, Kato N. Hypersomnia with ADHD: a possible subtype of narcolepsy type2. Sleep Biol Rhythms (2018) 16(2) : 205-210. doi.org/10.1007/s41105-017-0139-1

〔図書〕(計1件)

本多真: 多彩なレム関連症状と共存するナルコレプシーの症例 In: 睡眠の診かた 千葉茂編 (2019) pp46-47, 新興医学出版社

〔学会発表〕(計2件)

Kodama T, Honda Y, Takaku S, Takahara D, Honda M, Watanabe M
Marmoset as a primate sleep research model animal
ESRS 2016 (国際学会)

本多真、児玉亨、伊東若子
過眠を合併する ASD 症例の腸内細菌叢の特徴
昭和大学発達障害医療研究所文理融合型共同研究
2018 年

〔その他〕

ホームページ等

公益財団法人東京都医学総合研究所・睡眠プロジェクト

<http://www.igakuken.or.jp/sleep/>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：渡邊 正孝

ローマ字氏名：(WATANABE, masataka)

所属研究機関名：公益財団法人東京都医学総合研究所

部局名：精神行動医学研究分野

職名：研究員

研究者番号(8桁): 50092383

研究分担者氏名：本多 真

ローマ字氏名：(HONDA, makoto)

所属研究機関名：公益財団法人東京都医学総合研究所

部局名：精神行動医学研究分野

職名：副参事研究員

研究者番号(8桁): 50370979