

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15132

研究課題名(和文) 認知症と腸内フローラ 腸内細菌叢を改善する生薬由来認知症治療薬の探索

研究課題名(英文) Dementia and gut microbiota

研究代表者

富山 貴美 (TOMIYAMA, Takami)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：10305633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、認知症モデルマウスと抗認知症作用を示す生薬抽出物Ekc-1を用いて、認知症と腸内フローラの関係性を明らかにすることである。認知症マウスに抗生物質を1カ月間飲ませる、あるいは認知症マウスと野生型マウスの糞抽出液(腸内細菌)を互いに移植することで認知機能が変化するかどうか、認知症マウスにEkc-1を1カ月間経口投与して腸内細菌が変化するかどうかを調べた。この結果、認知症マウスの認知機能は腸内細菌の影響を受けていること、Ekc-1の抗認知症作用の少なくとも一部は腸内細菌を介したものであることが示唆された。将来は、腸内環境を改善することで作用を示す抗認知症薬の開発につなげたい。

研究成果の概要(英文)：To investigate possible relationship between dementia and gut microbiota, we examined cognitive function of our model mice (OSK-KI mice) after 1-month oral administration of antibiotics, fecal extracts, and anti-dementia herb extract Ekc-1. Antibiotic treatment and fecal transplantation influenced mouse memory, suggesting cognition is affected by gut microbiota. The beneficial effects of Ekc-1 on memory was partially cancelled by simultaneous antibiotic treatment, implying anti-dementia effects of Ekc-1 is, at least in part, mediated by gut microbiota. We analyzed gut microbiota in our different model mice (APP x tau double Tg mice) after 1-month Ekc-1 oral treatment. We found some differences between Tg and non-Tg mice, and Ekc-1 appeared to shift the balance of microbiota toward non-Tg mice. Subcutaneous administration of Ekc-1 little improved mouse memory. Our findings suggest that gut microbiota affects cognitive function, and its modification could be a treatment for dementia.

研究分野：神経科学

キーワード：Gut microbiota Dementia Alzheimer's disease Antibiotic Fecal transplantation Herb extract Model mouse Memory

1. 研究開始当初の背景

動物の腸には様々な細菌が住みつき、宿主と共生関係にある。腸内で多様な細菌が住み分けている様子を腸内フローラと呼ぶ。腸内フローラはストレス、食生活、加齢、遺伝的背景などにより変化することが知られている。近年、腸内フローラがガン、肥満、糖尿病、アレルギー性疾患、自己免疫疾患、炎症性腸疾患など様々な病気に関与していることが明らかになってきた。腸内フローラはまた、抑うつや不安、自閉症など精神状態・精神疾患にも関与していることが示されている。しかし、同じ脳の病気である認知症との関連についてはあまり知られていなかった。認知症も腸内フローラと同様、ストレス、食生活、加齢、遺伝的背景などの影響を受ける。このことから、申請者は、認知症の発症・進行にも腸内フローラが関与しているとの仮説を立てた。

申請者らはこれまで、認知症、特にアルツハイマー病を研究対象として、数種類のモデルマウスを作製し (Tomiyama et al. 2010; Umeda, Tomiyama et al. 2013; Umeda, Tomiyama et al. 2014; Umeda, Tomiyama et al. 2017) それらを用いて治療薬の探索を進めてきた (例えば、Umeda, Tomiyama et al. 2015; Umeda, Tomiyama et al. 2016)。最近、申請者らは、ある生薬抽出物 (Ekc-1 と呼ぶ) がモデルマウスの認知機能を改善し、脳病理を減少させることを見出した (未発表)。申請者は、この生薬抽出物は、腸内環境を改善することにより抗認知症作用を発揮しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者らの認知症モデルマウスと抗認知症作用を示す生薬抽出物 Ekc-1 を用いて、認知症と腸内フローラの間を明らかにすることである。具体的には、

- 認知症モデルマウスと野生型マウスと

で腸内細菌を分析・比較する。

- 認知症モデルマウスに抗生物質を飲水として1カ月間飲ませ、認知機能が変化するかどうかを調べる。
- 認知症モデルマウスと野生型マウスの糞抽出液 (腸内細菌) を互いに移植することで認知機能が変化するかどうかを調べる。
- 認知症モデルマウスに Ekc-1 を1カ月間経口投与して腸内細菌が変化するかどうかを調べる。

3. 研究の方法

(1) OSK-KI マウスを用いた研究

本研究で用いた認知症モデルマウスは、申請者らが家族性アルツハイマー病患者で同定したアミロイド前駆体蛋白質 (APP) の新しい変異 (E693 変異、Osaka 変異と呼ぶ) を有するノックイン (KI) マウス (Umeda, Tomiyama et al. 2017) である。この変異をホモで持つ KI マウスは、4カ月齢から記憶障害を示す。

抗生物質投与がマウスの認知機能に与える影響

18-21 カ月齢のホモ KI マウスと野生型の Non-KI マウス (KI マウスの littermate) をそれぞれ2群 (1群 8~15匹) に分け、1群には水を、もう1群には抗生物質 (アンピシリン 1 g/L、バンコマイシン 0.5 g/L、ネオマイシンサルフェート 1 g/L、メトロニダゾール 1 g/L) を飲水として1カ月間与えた。マウスは互いの糞を食べるので、腸内細菌の相互干渉を避けるために、実験中は基本的に1ケージに1匹だけを入れて飼育した。投与終了後、1日分の糞を回収し、凍結した。マウスの認知機能をモリス水迷路により測定した。その後、マウスの脳を取り出し、病理切片を作製した。

糞の移植がマウスの認知機能に与える影

響

15 カ月齢のホモ KI マウスと Non-KI マウスをそれぞれ 2 群 (1 群 11 ~ 12 匹) に分け、1 群には生理食塩水を、もう 1 群にはその日に回収したマウスの糞を生理食塩水で抽出したものを 1 カ月間経口投与した。投与終了後、1 日分の糞を回収し、凍結した。マウスの認知機能をモリス水迷路により測定した。その後、マウスの脳を取り出し、病理切片を作製した。

Ekc-1 および抗生物質投与がマウスの認知機能に与える影響

Ekc-1 を水に 10 mg/mL で溶かして投与液とし、これを経口ゾンデを用いて毎日 300 μ L ずつ (= 3 mg/day) 1 カ月間経口投与した。対照群には水を 300 μ L ずつ経口投与した。19-22 カ月齢のホモ KI マウスを 3 群 (1 群 7 ~ 9 匹) に分け、2 群 (A, B) には水を、もう 1 群 (C) には で用いた抗生物質を飲水として 1 カ月間与えた。20 カ月齢の Non-KI マウス (10 匹) には水を飲水として 1 カ月間与えた。同時に、B, C 群には Ekc-1 を毎日経口投与した。投与終了後、1 日分の糞を回収し、凍結した。マウスの認知機能をモリス水迷路により測定した。その後、マウスの脳を取り出し、病理切片を作製した。

(2) ダブル Tg マウスを用いた研究

本研究で用いる認知症モデルマウスは、Osaka 変異 APP を発現するトランスジェニック (Tg) マウス (Tomiyama et al. 2010) と野生型ヒトタウを発現する Tg マウス (Umeda, Tomiyama et al. 2013) を交配して作ったダブル Tg マウス (Umeda, Tomiyama et al. 2014) である。このマウスは、6 カ月齢から記憶障害を示す。

Ekc-1 投与がマウスの認知機能と腸内細菌に与える影響

15 カ月齢のダブル Tg マウスを 2 群 (1 群 10 匹) に分け、1 群には水を、もう 1 群には Ekc-1 を 1 カ月間毎日経口投与した。同月齢の Non-Tg マウス (10 匹) には水を経口投与した。投与終了後、1 日分の糞を回収し、凍結した。マウスの認知機能をモリス水迷路により測定した。その後、盲腸内容物を取り出し、凍結して、腸内細菌解析のため共同研究者に送付した。マウスの脳を取り出し、病理切片を作製した。

Ekc-1 の皮下投与がマウスの認知機能に与える影響

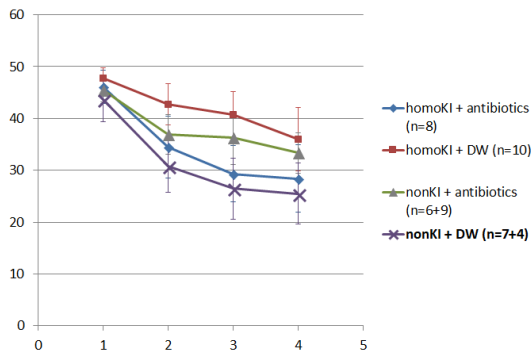
16 カ月齢のダブル Tg マウスを 4 群 (1 群 10 匹) に分け、1 群には水を、他の 3 群 (A-C) には Ekc-1 を 1 カ月間毎日投与した。A には Ekc-1 を 1 mg/day で経口投与、B には Ekc-1 を 0.3 mg/day で経口投与、C には Ekc-1 を 3 mg/day で皮下投与した。同月齢の Non-Tg マウス (10 匹) には水を経口投与した。投与終了後、1 日分の糞を回収し、凍結した。マウスの認知機能をモリス水迷路により測定した。その後、マウスの脳を取り出し、病理切片を作製した。

4 . 研究成果

(1)

抗生物質投与が OSK-KI マウスの認知機能に与える影響

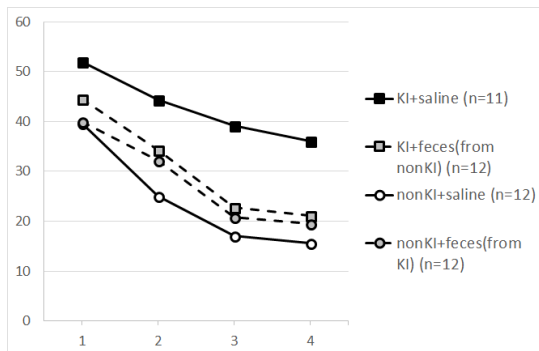
モリス水迷路の結果を以下に示す。縦軸はプラットホームにたどり着くまでの時間 (秒)、横軸はトレーニング期間 (日) を表す。



OSK-KI マウスに抗生物質を与えると、記憶障害は Non-KI マウスに近いレベルまで改善した。一方、Non-KI マウスに抗生物質を与えると、認知機能は悪化した。これらのことから、マウスの認知機能は腸内細菌の影響を受けていることが示唆された。

糞の移植が OSK-KI マウスの認知機能に与える影響

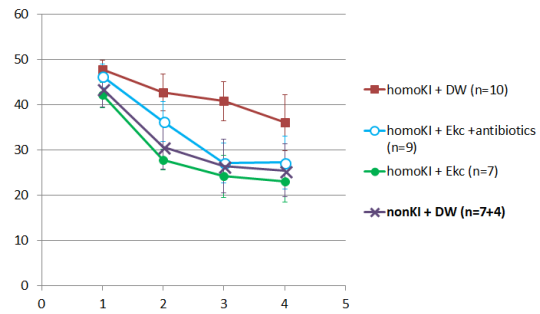
モリス水迷路の結果を以下に示す。



OSK-KI マウスに Non-KI マウスの糞を移植すると、記憶障害が改善された。逆に、Non-KI マウスに OSK-KI マウスの糞を移植すると、認知機能はわずかに悪化した。この結果は、マウスの認知機能が腸内細菌の影響を受けていることを強く示唆している。

Ekc-1 および抗生物質投与が OSK-KI マウスの認知機能に与える影響

モリス水迷路の結果を以下に示す。

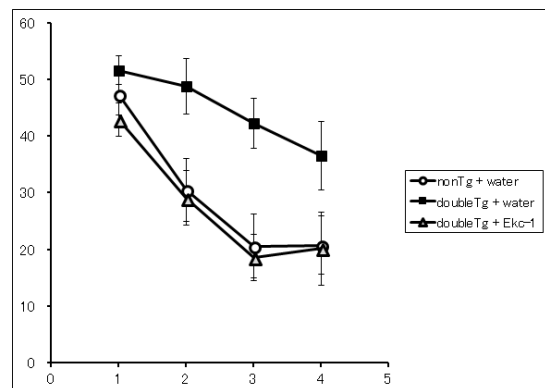


OSK-KI マウスに Ekc-1 を経口投与すると、記憶障害は Non-KI マウス以上のレベルにまで改善した。Ekc-1 の経口投与と同時に抗生物質を飲水として与えると、Ekc-1 の効果は減弱した。これらのことから、Ekc-1 の抗認知症作用の少なくとも一部は腸内細菌を介したものであることが示唆された。

(2)

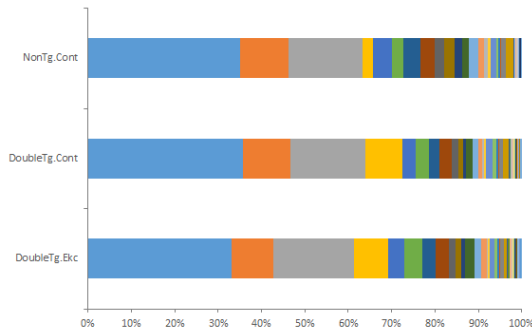
Ekc-1 投与がダブルTg マウスの認知機能と腸内細菌に与える影響

モリス水迷路の結果を以下に示す。



ダブル Tg マウスに Ekc-1 を経口投与すると、記憶障害が Non-Tg マウスと同レベルまで改善した。

このときの盲腸内容物における腸内細菌の解析結果（属 genus のレベルで分類）は以下の通り。

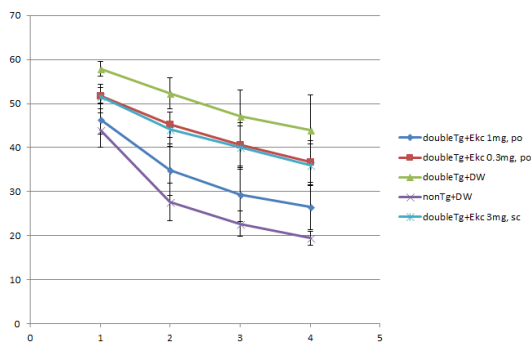


■ k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__g__
 ■ k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__
 ■ k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__S24-7g__
 ■ k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;p__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus
 ■ k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Oscillospira
 ■ k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Bacteroides
 ■ k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__
 ■ k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Prevotellaceae;g__

ダブル Tg マウスと Non-Tg マウスとで、腸内細菌のバランスに若干の差があり、Ekc-1 投与により、この差が小さくなっているように思える。

Ekc-1 の皮下投与がダブル Tg マウスの認知機能に与える影響

モリス水迷路の結果を以下に示す。



Ekc-1 の経口投与 (p.o.) の効果は用量依存的であった。また、Ekc-1 の皮下投与 (s.c.) は、経口投与に比べ、1/10 程度の効果しかなかった。この結果は、Ekc-1 の抗認知症作用の少なくとも一部は腸内細菌を介したものであることを強く示唆している。

以上の結果から、認知症モデルマウスの認知機能は腸内細菌の影響を受けていること、Ekc-1 の抗認知症作用の少なくとも一部は腸内細菌を介したものであることが示唆され

た。この結果をもとに、将来は、腸内環境を改善することで作用を示す抗認知症薬の開発につなげたい。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富山 貴美 (TOMIYAMA, Takami)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：10305633

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

梅田 知宙 (UMEDA, Tomohiro)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：70549790

(4) 研究協力者

()