

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：20104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00859

研究課題名(和文)大腸水素の脳への供給が神経変性に与える影響

研究課題名(英文)Colonic hydrogen influences neurodegeneration in the brain

研究代表者

山本 達朗 (Yamamoto, Tatsuro)

名寄市立大学・保健福祉学部・准教授

研究者番号：90379389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、食物繊維等を摂取した際に大腸内の細菌叢により生成される水素が脳の酸化ストレス軽減および健全化に寄与することを明らかにすることである。本研究では、フラクトオリゴ糖などを摂取させたラットを大腸水素生成モデルとした。我々は、その動物を外傷性脳損傷モデルとして用いて、脳内のミクログリアとアストロサイトの活性変化を観察した。さらに、我々は、脳疾患発症予防を目指して食物繊維の質的および量的条件について解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、神経変性疾患の患者数は、その前段階の症状を含めると4人に1人と言われ、今後も増加することが予想されている。また、脳梗塞は予後にその多くが介護を必要とする状態になるなど、発症前の状態に戻すことは難しい。本研究は、食事の質を考え、大腸発酵を利用した水素生成によって、継続的に脳に水素を供給し、神経変性疾患や脳内炎症の拡大を予防・改善するという新規の概念に基づくものであり、必ず神経変性疾患の発症抑制、また脳挫傷などの予後の改善に寄与できるものと考えられる。本研究を実施は、栄養学的側面から新しい神経科学の基盤を構築し、栄養学の発展に大きく貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify that hydrogen, which is produced by the bacterial flora in the colon when dietary fibers are ingested, contributes to the reduction of oxidative stress in the brain. In this study, rats fed with fructo-oligosaccharides were used as a model for colon hydrogen production. We used the animal as a model of traumatic brain injury to observe changes in the activity of microglia and astrocytes in the brain. In addition, we analyzed the qualitative and quantitative conditions of dietary fiber with the aim of preventing the development of brain diseases.

研究分野：神経解剖学

キーワード：大腸水素 酸化ストレス 食物繊維 脳損傷モデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

安静時心拍出量の15%が脳に供給されていることは、それに伴って多くの酸素が脳に供給されていることを示している。酸素は、脳神経細胞の活動エネルギーの産生に大きく寄与している反面、その一部は活性酸素種となり、脳内の細胞を構成するタンパク質や脂質などに傷害的に作用する。このような酸化ストレスに曝された神経細胞は、変性などにより機能が低下することが知られており、アルツハイマー病やパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患の発症要因と考えられている。また酸化ストレスは、くも膜下出血や頭部外傷に伴う脳損傷を受けた部位において生じる炎症部位にも観察され、損傷部位の近傍にある細胞の挙動に影響を与えている。

申請者は、食と脳の関係について明らかにするために、脂質や食物繊維の摂取が脳の発生や発達に与える影響について動物実験により解析してきた(「研究業績」欄および「これまでに受けた研究費とその成果」欄を参照)。その過程で申請者は、食物繊維摂取時に腸内細菌の発酵を介して生じる大腸水素が脳の酸化ストレス軽減に寄与する可能性に着目し、そのことを通じて脳を中心としたヒトの健康増進および疾病予防を図ることができると考えるに至った。実際、水素ガスを用いた研究では、呼吸を介した水素吸入は脳梗塞モデルマウスの脳梗塞部位減少に寄与することが報告され(Ohsawa et al., 2007, Nature Medicine. 688, Fujita et al. 2009, Plos one, e7247)、このことは体内に水素を供給し、肺におけるガス交換後の血流に乗せて脳へ送ることが、脳内の炎症に関与する酸化ストレスの軽減に寄与することを示唆している。しかしながら、水素ガスの呼吸を介した供給は、水素供給装置を必要とし、さらに水素供給時に一時的に体内の水素濃度が上昇するために、脳梗塞発症時の炎症の拡大抑制を目的とした使用には適していると考えられるが、アルツハイマー病やパーキンソン病など症状が現れるまでに長くゆっくりとした神経変性を示す神経変性疾患の予防には有効的ではないと考えられる。申請者は、西村らとの共同研究の中で、酸化ストレスに対抗するために体内に恒常的に水素を供給する方法として、ハイアミロースコーンスターチを摂取すると、それが大腸内の腸内細菌叢の発酵基質となり、その産物として大腸水素が生成されることを見いだした(Nishimura et al., 2012 British Journal of Nutrition, 485)。しかし、現在までに大腸水素の脳に対する作用やその役割に関するアプローチは、国内外ともに行われていない。

申請者は、これまでに行ってきた予備的検討の結果、5%フラクトオリゴ糖含有食をラットに摂取させた場合、左心室内の動脈血が含有する水素量がコントロール食摂取時に比べて約15倍程度有意に高いことを確認した(図1)。申請者は、この現象の確認により冒頭に述べた仮説を証明することができると考え、本研究課題の申請に至った。

図2は、本研究の想定している大腸水素のポテンシャルである。「大腸から恒常的に供給される水素が、神経細胞またはその周囲の神経膠細胞に作用し、酸化ストレスを軽減する結果、アルツハイマー病などの神経変性疾患

の発症や脳梗塞または外傷による脳挫傷などの外傷性脳損傷時の炎症拡大を抑制する」という機序を想定し研究を進めることとした。

2. 研究の目的

申請者の研究の目的は、『「食物繊維等を摂取した際に大腸内の細菌叢により生成される水素は脳の酸化ストレス軽減および健全化に寄与する」という仮説を証明し、さらにその作用を強化する食物繊維摂取の量的・質的条件について研究すること』である。その端緒として本申請課題では、フラクトオリゴ糖などを摂取させたマウス等を大腸水素生成モデルとし、外傷性脳損傷モデルや内因性の神経変性疾患モデルにおけるミクログリアとアストロサイトの活性変化に対する大腸水素の効果について形態学的手法を用いて明らかにする。また同時に、急性・慢性脳疾患および脳疾患発症予防を目指した最良の食物繊維等摂取の質

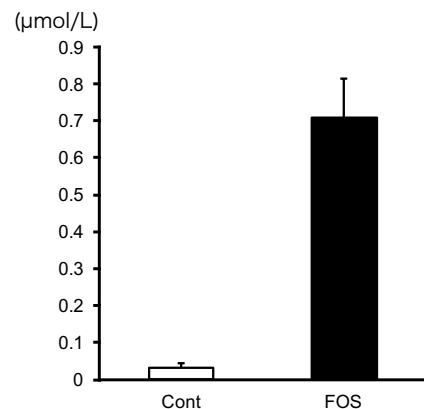


図1: 5%FOS摂食時の左心室動脈血水素量

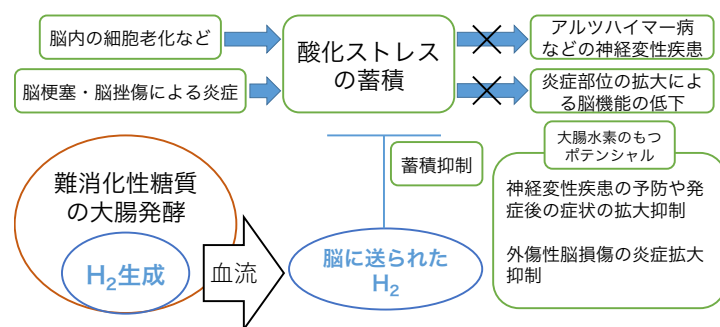


図2: 想定している大腸水素の脳に対する作用機序

的・量的条件について解析を行う。

3. 研究の方法

1) 大腸水素生成動物の作出

実験動物には、Wistar rat (雄、8 週齢、初期体重 160-180g) 12 匹を平均体重が等しくなるように 6 匹ずつ 2 群に分け使用した。一方の群にはコントロール食 (C)、もう一方の群には 5% フラクトオリゴ糖添加食 (FOS) を 14 日間与えた。使用した食餌組成は以下の通りである。C 食、FOS 食の詳細は右表の通りである。

Ingredient	Control	FOS
	g/kg	
Casein	250	250
Cornstarch	482.5	432.5
FOS*	—	50
Sucrose	100	100
Soybean oil	70	70
Mineral mix**	35	35
Vitamin mix***	10	10
Cellulose	50	50
Choline bitartrate	2.5	2.5

2) 脳穿刺モデル動物の作成

上記の食餌にて飼育したラットをペントバルビタールナトリウムで麻酔させた。脳固定装置 (成茂) を使用し頭蓋を固定したのち、頭蓋の正中に沿って切開し、頭蓋骨を露出した。ブレグマを基準点として、ブレグマより 2mm 後方、中央線より 2mm 右側の頭蓋骨に歯科用ドリルで穴を開け、太さ 400 μ m の針を深さ 2mm 挿入し脳穿刺傷モデルを作成した (Figure 1)。その後、帽状腱膜を 2 針縫い、処置終了とした。

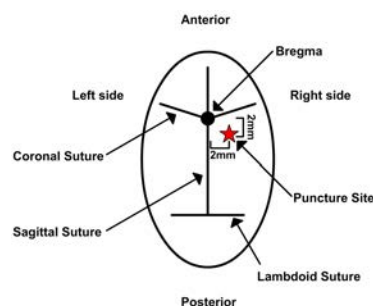


Figure 1 頭頂部より見た穿刺位置

3) 呼気放屁水素量の測定

ラットを専用密閉容器に入れ 5 分間放置後、容器内の空気をシリンジで一定量採取した。採取した空気を H₂ アナライザーに注入し、サンプルピークの高さを測定した。標準ガスピークの高さをもとに検量線を作成し、得られたサンプルピークの高さより呼気放屁水素量を求めた。なお、標準水素ガスピークは標準水素ガス (9.99ppm) を 0.1、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5ml 注入し測定した。

4) 左心室血水素含有量測定

ラットを解剖する際に、左心室より動脈血を 1ml 採取し、ヘパリン入りのバイアルに入れた。バイアル中の気体部分をシリンジで一定量採取し、採取した空気を H₂ アナライザーに注入し、サンプルピークの高さを測定した。標準ガスピークの高さをもとに検量線を作成し、得られたサンプルピークの高さより呼気放屁水素量を求めた。なお、標準水素ガスピークは標準水素ガス (9.99ppm) を 0.1、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5ml 注入し測定した。

全ての実験動物の飼育は、飼育環境が温度 23 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度 40~60%、12 時間明暗サイクル (明期 7:00~19:00、暗期 19:00~翌 7:00) 制御されている実験動物飼育室で行った。飼料、水は自由飲水とし、体重、摂食量を毎日測定した。すべての動物実験は名寄市立大学動物実験に関する規定に基づき、名寄市立大学動物実験委員会における承認を得て行った。

4. 研究成果

1) 飼料による体重変化の比較

14 日間の試験飼育中の体重および摂食量の記録を行った。体重と摂食量に関しては C 食群と FOS 食群の間に有意な差は見られなかった (データ未掲載)。

2) FOS 食摂取による呼気放屁および左心室大腸水素量の増加

呼気放屁水素量に関して、試験飼育1日目はC食群、FOS食群に有意差は見られなかったが、7日目、14日目ではC食群に比べFOS食群で有意に高くなった (Figure 2)。肺におけるガス交換後の血液中水素含量を調べるために、左心室内の動脈血中水素含量を測定した。その結果、C食群に比べFOS食群で有意に高いことが分かった (Figure 3)。

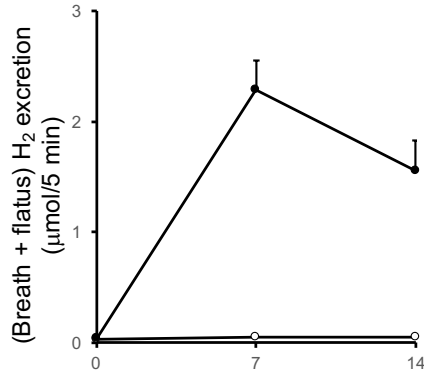


Figure 2 呼気放屁水素排出量

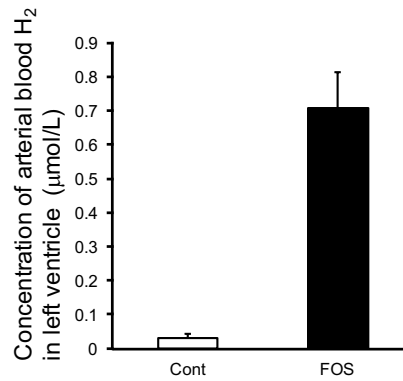


Figure 3 左心室血水素含有量

3) 大腸水素によるミクログリア活性抑制と新生細胞の増加

解剖時に脳組織を採取し、パラフィン包埋後、抗ミクログリア抗体である Iba1 (Wako) を用いて免疫組織化学を行った。損傷部位では、ミクログリアの形態が鋭い形状をしており、活性型を示しています。この形状はコントロールでも FOS 群でも見られますが、FOS 群の方が形状としては球形のもの (非活性型) が多数見られます。この写真は、手術後 1 週間経過した像であることから、FOS 群の方がコントロールに比べて早期に炎症反応が沈静化していることが示唆された (Figure 4)。

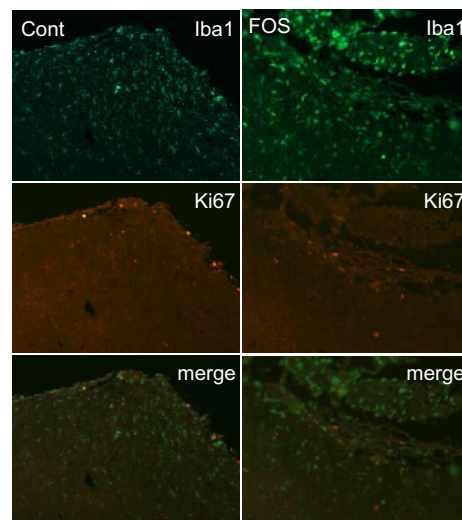


Figure 4 脳損傷部位のIba1およびKi67による免疫組織化学

このような状態の損傷部位では、Ki67 の発現が観察されることが報告されている。損傷部位における Ki67 陽性細胞の数を計測したところ、FOS 食群で優位に高くなっていた (Figure 5A)。また、このような新生細胞が炎症部位におけるミクログリアの増殖を示しているのか調べるために、2 つの写真をマージして、2 つの抗体に陽性である細胞の数を計測した。その結果、両抗体に陽性である細胞の割合は、FOS 食群で優位に低く、FOS 食群の多くの新生細胞がミクログリアではないことが明らかとなった (Figure 5B)。

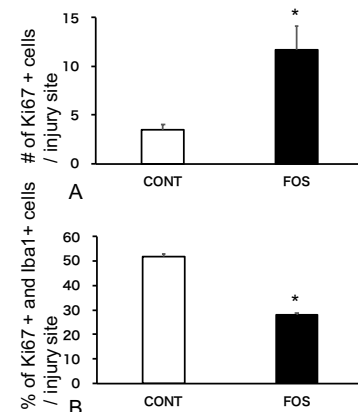


Figure 5 (A)損傷部位におけるIba1陽性細胞数, (B)Iba1陽性細胞とKi67が同時に陽性を示している細胞数

4) ミクログリア活性の低減によるアストロサイト活性抑制

脳の炎症部位では、ミクログリアの活性の後にそのシグナルを受けてアストロサイトが活性化することが知られている。本研究では、術後1週目の炎症部位におけるアストロサイトの状態を観察した (Figure 6)。その結果、アストロサイトの発現面積がFOS食群で低下しており、FOS食群の方が早期に炎症反応が抑制されていることが示唆された (Figure 7)。

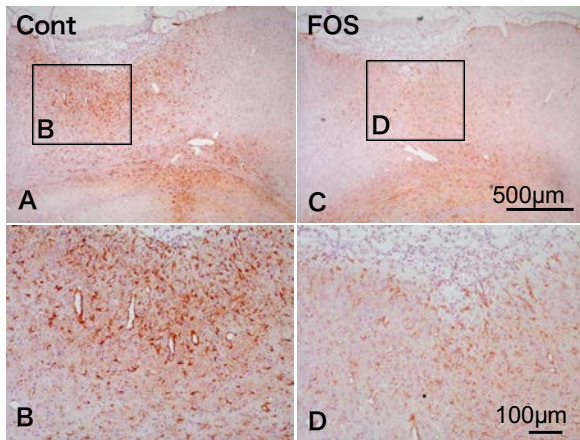


Figure 6 Fos食群におけるアストロサイト活性の抑制

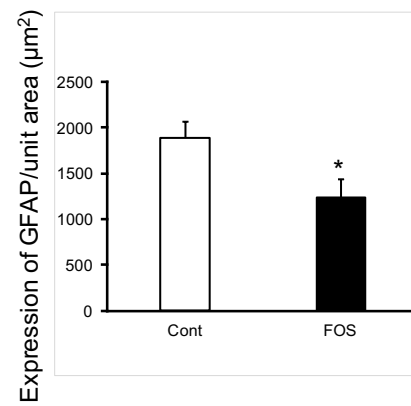


Figure 7 アストロサイト陽性細胞面積の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 山本達朗、鈴木美沙、田邊宏基、西村直道
2. 発表標題 大腸水素による脳炎症部位におけるミクログリアの増殖抑制と新生細胞の増加
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本達朗、鈴木美沙、田邊宏基、西村直道
2. 発表標題 大腸水素は脳損傷後のミクログリアとアストロサイトの活性化に影響を与える
3. 学会等名 第71回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2017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