

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K01477

研究課題名(和文) Gut microbiotaの制御が脳虚血病巣進展および神経機能に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of Gut Microbiota Regulation on Cerebral Ischemic Lesion Expansion and Neurological Function

研究代表者

西山 康裕 (Nishiyama, Yasuhiro)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20350077

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)：脳梗塞は神経系のみならず消化器系の合併症を引き起こすが、このメカニズムの一つとして脳梗塞後の腸内細菌叢の変化が関与すると言われている。本研究期間において、新型コロナウイルス感染による研究環境の変化により、脳梗塞マウスモデル作成が中断、再開後も死亡率が高いなどの問題が生じ、モデルの計画を変更せざるを得なくなった。

こうした中、兵庫医大の松山知弘教授により開発されたSCID及びCB-17マウスのMCAに直接電気凝固を施し、結紮を行う脳梗塞モデルを用いた。計画の変更を伴ったものの、梗塞群、sham群で脳、腸管、血液を採取し、各種サイトカイン、HMGB1などの測定を行い共同研究にて実験は継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞患者の半数以上が便秘、便失禁、消化管出血などを呈するが、そのメカニズムの詳細は不明である。脳卒中患者は4-5倍排便困難症に罹患しやすく、また、約30-60%と高頻度で起こることが知られているが、このメカニズムの一つとして脳卒中後の腸内細菌叢の変化が関与すると考えられている。我々は未だ検討途中であるものの、脳梗塞病変部位組織および盲腸組織のRNAシーケンシングにより脳梗塞部位の細胞死と炎症の特徴について調べる。また、血中に放出されるエクソソーム中のシーケンシングも行い、腸管機能に変化を及ぼす可能性のあるmiRNAを検討し、これらのメカニズムを解明していく。

研究成果の概要(英文)：Cerebral infarction causes complications in the nervous and digestive systems, and one of the mechanisms is thought to involve changes in the intestinal microbiota after cerebral infarction. During the period of this study, due to changes in the research environment caused by the new coronavirus infection, the setting up of a mouse model of cerebral infarction was interrupted, and even after it was resumed, problems such as a high mortality rate emerged, forcing a change in the model plan.

Under these circumstances, they used the cerebral infarction model developed by Professor Tomohiro Matsuyama of Hyogo Medical University, in which the MCAs of SCID and CB-17 mice were directly electrocoagulation and ligated. Although the plan has been changed, the experiment is still ongoing in collaboration with other researchers by collecting brain, intestinal tract, and blood samples from the infarction and sham groups and measuring various cytokines, HMGB1, etc.

研究分野：虚血性脳卒中の免疫と炎症

キーワード：gut microbiota ischemic stroke mice

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 脳梗塞は罹患死亡率が高いだけでなく、その後遺症は患者の身体機能予後を著しく制限し、高齢化社会の進むわが国の医療経済的負担の最重要因子となっている。脳梗塞の後遺症を軽減するための病態解明の期待は増しているが、十分とはいえない。
- (2) 脳梗塞が炎症に関与するという報告が相次ぎ、申請者は、これまで抗炎症作用の薬剤により神経機能が軽減する報告[1]や、mast cell が脳梗塞体積や機能予後を変化させる報告[2]を行ってきた。近年、脳梗塞と腸内細菌叢との関連が指摘されてきており、脳梗塞への応用が期待されてきた。こうした中で、申請者らは、C57BL/6 マウスに抗生物質を組み合わせた水を2週間経口投与し、腸管免疫細胞の遺伝子パターンが変化することを報告している(2022年12月、第51回日本免疫学会学術集会)。

2. 研究の目的

脳卒中は神経系のみならず消化器系の合併症を引き起こし、患者の半数以上が便秘、便失禁、消化管出血などを呈するが、そのメカニズムの詳細は不明である。コントロール群と比べて脳卒中患者は4-5倍、排便困難症に罹患しやすく、また、約30-60%と高頻度で起こることが知られているが、このメカニズムの一つとして脳卒中後の腸内細菌叢の変化が関与すると考えられている。我々は、マウス脳梗塞モデルにおいて脳組織、腸管組織、血液中の変化を解析する。本研究では、脳梗塞病変部由来のエクソソーム中 miRNA が盲腸組織に与える影響を明らかにし、脳梗塞時の消化器系合併症のメカニズムを解明することを目的とする。さらに、抗生物質投与マウスとコントロール群(生理食塩水投与群)で、同様に比較を行うことにより、腸内細菌叢の影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス C.B-17/lcr-+/+Jcl 7週齢に脳梗塞処置または偽処置 C.B-17 マウスの盲腸を摘出し、RNA later で処理した盲腸組織より RNA を抽出、ライブラリー調整、シーケンシングを行い、2群間の発現変動遺伝子について網羅的に解析する。

(2) 同上マウスの脳(梗塞側大脳半球)を摘出、RNA later で処理した組織より RNA を抽出、ライブラリー調整、シーケンシングを行い、発現変動遺伝子解析する。

(3) 同上マウスの血清を採取し、血清を超遠心分離することにより得られるエクソソーム中の miRNA をシーケンシングし、2群間で比較解析する。

なお、抗生物質含有水として Ampicillin (1g/L), Neomycin (1g/L), Vancomycin (0.5g/L), Metronidazole (0.25g/L) を飲料水に溶解し、14日間投与を続けた。コロナ禍にて脳梗塞モデルマウス作成が滞っている間に、抗生物質の傾向投与と実験を進めることが可能であった。この結果、抗生物質投与マウスの腸管上皮細胞(intestinal epithelial cells; IEC)において、硫酸アルミニウムアンモニウム投与4時間後に、切断型カスパーゼ1 p20、カスパーゼ4 p20、IL-18 p18が増加したが、抗生物質未投与マウスのIECでは、アルミニウム投与後、活性型カスパーゼは検出されなかった。また、正常マウスの腸内で優勢であったムリバキュラ科などのグラム陰性菌は、抗生物質投与マウスでは減少していた。このため、グラム陽性菌が優勢なIECにおいて、抗生物質投与により、カスパーゼ6活性化によるアポトーシスを誘導する可能性を示唆している結果を得た。このことから、抗生物質投与による脳梗塞マウスに対する変化を検討することとした。

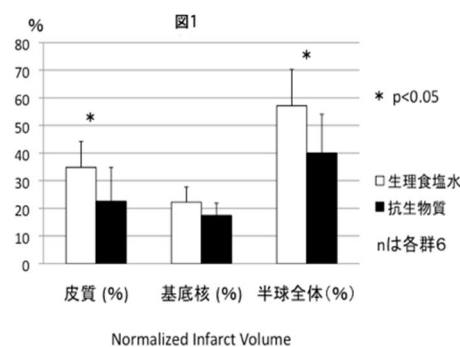


図1 脳梗塞72時間後において、抗生物質投与群は生理食塩水投与群と比較して、大脳皮質および半球全体で有意に脳梗塞サイズの縮小を認めた。

4. 研究成果

当初、脳梗塞マウスモデルは 60 分間の中大脳動脈閉塞 suture モデルとし、2 週間の抗生物質経口投与を行った。抗生物質の投与により、マウスの体調（下痢・食思不振・体重低下等）に変化は認めず、死亡例はないことを確認した。梗塞サイズの測定は、TTC 染色を行い、TTC 染色で染色されない梗塞巣を両群間で比較した。このとき、皮質領域、基底核領域については各々測定した。結果として、抗生物質投与群は生理食塩水投与群と比して、皮質および半球全体において、脳梗塞サイズの縮小を認めた（図 1）。モデルが安定したため、実験継続を予定していたが、新型コロナウイルス感染症が蔓延し、脳梗塞マウスモデル作成を行っていたスタッフのサポートが困難となった。このため、共同研究である新潟大学から脳梗塞マウスモデルの輸送などを検討していたが、感染状況などの問題から頓挫していた。環境を一部整え、再開後もモデル作成後の死亡率が高いなどの問題が生じた。このため、残念ながら、モデルの計画を変更せざるを得なくなった。この間、マウスに抗生物質を組み合わせた水分を継続投与することにより、腸管上皮細胞のパイロプシスとアポトーシスに関連する遺伝子の変化を報告した（図 2）[学会発表の項]。

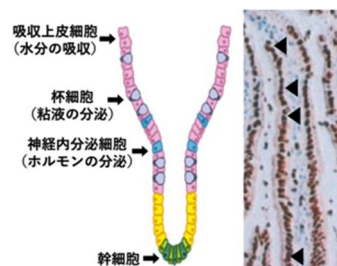


図2 腸管上皮細胞 (IEC; ◀) はcrypt部分に存在する幹細胞の分裂により発生し、分化しながら絨毛の先端に向かって移動して剥がれ落ちるといふ、体内で最も速いターンオーバーを持つ細胞の一つであり、数日間で完全に新しいIECと入れかわる。各種上皮細胞により、様々な侵入物から体内を守る免疫機構が存在する。

こうした中、兵庫医科大学の松山知弘教授によって開発された改良 Tamura 法を用いて SCID 及び CB-17 マウスの MCA に直接電気凝固を施し、結紮を行う脳梗塞モデルを用いることとした。梗塞体積の測定は行わず、腸管においても免疫担当細胞の構成割合の追跡などは困難となったが、梗塞群、sham 群で脳、腸管、血液を採取し、網羅的な遺伝子発現変動の確認を行っている（図 3）。各種サイトカイン、HMGB1 などを標的とし、本学免疫学教室との共同研究にて実験は継続している。

脳組織 梗塞 vs SHAM up/down

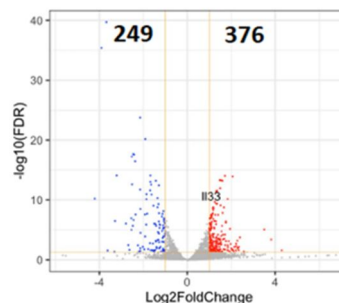


図3 脳梗塞処置及び偽処置マウス群を網羅的に遺伝子比較を行った際のvolcano plot。up (赤) 及びdown (青) を示している各遺伝子で発現変動を確認し、エンリッチメント解析を行う。

[引用文献]

1. Sakata H, Niizuma K, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Katsu M, Narasimhan P, Maier CM, Nishiyama Y, Chan PH. Minocycline-preconditioned neural stem cells enhance neuroprotection after ischemic stroke in rats. *J Neurosci.* 2012;32(10):3462-73.
2. Arac A, Grimbaldston MA, Nepomuceno AR, Olayiwola O, Pereira MP, Nishiyama Y, Tsykin A, Goodall GJ, Schlecht U, Vogel H, Tsai M, Galli SJ, Bliss TM, Steinberg GK. Evidence that meningeal mast cells can worsen stroke pathology in mice. *Am J Pathol.* 2014;184:2493-504.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nito Chikako, Sowa Kota, Nakajima Masataka, Sakamoto Yuki, Suda Satoshi, Nishiyama Yasuhiro, Nakamura-Takahashi Aki, Nitahara-Kasahara Yuko, Ueda Masayuki, Okada Takashi, Kimura Kazumi	4. 巻 108
2. 論文標題 Transplantation of human dental pulp stem cells ameliorates brain damage following acute cerebral ischemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 1005 ~ 1014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2018.09.084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sowa Kota, Nito Chikako, Nakajima Masataka, Suda Satoshi, Nishiyama Yasuhiro, Sakamoto Yuki, Nitahara-Kasahara Yuko, Nakamura-Takahashi Aki, Ueda Masayuki, Kimura Kazumi, Okada Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Impact of Dental Pulp Stem Cells Overexpressing Hepatocyte Growth Factor after Cerebral Ischemia/Reperfusion in Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development	6. 最初と最後の頁 281 ~ 290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2018.07.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西山康裕
2. 発表標題 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19)に 脳卒中を発症した患者100例の特徴
3. 学会等名 第47回日本脳卒中学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayako Wakabayashi, Atsuko Owaki, Ken Iwatsuki, Keisuke Tanaka, Soichiro Kumamoto, Yuuichi Koshiishi, Yasutaka Osada, Yasuhiro Nishiyama, Shoji Matsune, Rimpei Morita
2. 発表標題 An aluminum-containing food additive causes pyroptosis and IL-18 production in intestinal epithelial cells under antibiotic treatment
3. 学会等名 The 72nd Annual Meeting of the Japanese Society for Allergology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayako Wakabayashi, Atsuko Owaki, Ken Iwatsuki, Yasuhiro Nishiyama, Shoji Matsune, Rimpei Morita
2. 発表標題 Antibiotics promote epithelial cell death and eosinophilic infiltration in the gut caused by an aluminum-containing food additive
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayako Wakabayashi, Atsuko Owaki, Ken Iwatsuki, Yasuhiro Nishiyama, Shoji Matsune, Rimpei Morita
2. 発表標題 An aluminum-containing food additive upregulates gene expression involved in inflammatory cell death in intestinal epithelial cells
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021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	五十嵐 博中 (Igarashi Hironaka) (20231128)	新潟大学・脳研究所・教授 (13101)	
研究 分担者	若林 あや子 (Wakabayashi Ayako) (30328851)	日本医科大学・医学部・講師 (32666)	

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