

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09763

研究課題名(和文) 虚血性脳損傷に対する腸内細菌叢制御による新規脳保護療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel brain protection therapy by regulating intestinal flora for ischemic brain injury

研究代表者

卜部 貴夫 (Urabe, Takao)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60291663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、慢性の脳虚血負荷により糖尿病の病態下では腸内細菌叢異常による腸管バリアー機能の破綻によってLipopolysaccharide (LPS)が血中に流出し代謝性エンドトキシン血症となることが明らかになった。さらに脳虚血による血液脳関門機能の破綻で血中のLPSが脳内で発現が増加している。Toll like receptor 4 (TLR4)に作用して、免疫担当細胞を活性化し炎症性サイトカインが増加し炎症反応が進展することで脳白質損傷が発症・進展することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腸内細菌叢異常による炎症反応が虚血性脳損傷の進展に関与するメカニズムを明らかにした内容であり、学術的に意義のある成果である。さらに、超高齢化を迎えている我が国において、脳梗塞発症のみならず認知症発症の病態に腸内細菌叢変化による炎症や酸化ストレスが関与することを示せたことは社会的にも意義が深いことである。

研究成果の概要(英文)：In the present study, it was revealed that LPS is effluxed into the blood due to disruption of intestinal barrier function due to dysbiosis in the pathophysiology of diabetes mellitus due to chronic cerebral ischemia, resulting in metabolic endotoxemia. In addition, lipopolysaccharide (LPS) in blood acts on toll like receptor 4 (TLR4) whose expression is increased in the brain due to disruption of blood-brain barrier function due to cerebral ischemia. Moreover, activated immunocompetent cells produce inflammatory cytokines, and progresses inflammatory response. We have proved that the development of inflammatory reaction derived from dysbiosis causes onset and development of brain white matter damage.

研究分野：神経内科学

キーワード：腸内細菌叢 虚血性大脳白質損傷 酸化ストレス 炎症 認知障害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界一の超長寿社会を迎えているわが国において、長期にわたる老年期をいかに健全に過ごすかが問われる世の中になっている。さらに、今後も脳血管障害患者数は増加の一步をたどり、2025年には330万人とピークを迎えることが予測されている。このような中で重大な社会問題として、様々の原因による寝たきり介護者の増加が挙げられるが、寝たきり状態となる原因疾患としては脳血管障害後遺症が約4割を占め、その中でも認知症の合併が重要な位置を占めている。本邦における認知障害性疾患は、近年アルツハイマー病の頻度が増加しているが、脳血管障害後の発症や脳血管性認知症との合併さらには糖尿病の関与が問題となっている。申請者はこれまでに脳梗塞の病態と防御機構に関する研究を一貫して推進し、日本人の脳梗塞患者に新規糖代謝異常が高頻度に診断されることを世界で初めて報告し(Urabe T et al. Stroke 2009)、糖尿病を有することが脳梗塞患者の短期予後を悪化させることを明にした(Tanaka R et al. J Neurol Sci 2013)。

基礎研究では大脳白質の虚血性損傷が認知機能障害の責任病巣であることを報告し(Watanabe T et al. Stroke 2006)、糖尿病モデルマウスではオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖と生存が抑制され白質障害が進展・増悪することを見出している(Yatomi Y et al. Neuroscience 2015)。急性虚血性脳損傷と慢性脳低灌流での大脳白質障害の病態に高血糖による酸化ストレスと炎症反応が強く関連し、抗酸化ペプチドのアドレノメデュリンが虚血性脳損傷に対して防御的に作用することを証明した(Miyamoto N et al. J Cereb Blood Flow Metab 2009、Mitome-Mishima Y et al. Biomed Res Int 2014)。さらに、糖尿病治療薬であるGLP-1受容体作動薬が酸化ストレスと炎症を抑制し急性虚血性脳損傷の進展を抑制し、脳保護効果を発揮することを発見した(Teramoto S et al. J Cereb Blood Flow Metab 2011)。以上の多くの研究成果から、糖尿病による高血糖が虚血性脳損傷を増悪させ、その病態には酸化ストレスが強く関与して傷害を進展させることにより認知機能障害が発症・進行するという分子機構を明らかにしている。それと共に酸化ストレスを抑制するペプチドが脳保護効果を発揮して認知機能障害の進行抑制に有効性を示すことを見出している。

近年において腸内細菌叢の異常は、がん、糖尿病、肥満、アレルギー疾患、および神経疾患などの様々な疾患と関連性することが次々に明らかにされ、世界的に注目を集めているホットな領域である。腸内細菌叢は食生活や加齢によっても変化をきたし、この観点からも生活習慣病と強く関連し脳血管障害発症にかかわる重要なリスク因子となることが考えられる。腸内細菌叢の異常による疾患発症の分子メカニズムとしては炎症や酸化ストレスによる損傷機転が関与することが知られている。腸内細菌は、人間の生命維持に関わる物質を産生しており、いわゆる善玉菌、悪玉菌、日和見菌のバランスである腸内環境が重要とされている。ビフィズス菌や乳酸菌などの善玉菌が産生する乳酸や酢酸は、腸内を酸性にすることで悪玉菌の増殖と有害物質の産生を抑え、感染や発ガン物質の産生を抑制し、血清コレステロールを低下させる物質も産生することが知られている。

何らかの理由での腸内環境のバランスの乱れが疾患の発症や増悪に関連するため、脳梗塞患者や虚血侵襲による腸内細菌叢の変化を捉えることは、病態解明のみならず防御法を究明するうえでも重要なことである。申請者は虚血性脳損傷の病態に酸化ストレスと炎症反応が強く関連し、これら傷害因子を抑制することで脳保護効果が得られる研究成果を数多く上げていることから(Zhang N et al. Stroke 2007、Komine-Kobayashi M et al. J Cereb Blood Flow Metab 2006、Watanabe T et al. Stroke 2006、Ueno Y et al. Neuroscience 2009、Miyamoto N et al. J Cereb Blood Flow Metab 2009、Teramoto S et al. J Cereb Blood Flow Metab 2011、Teramoto S et al. PLoS One 2013、Mitome-Mishima Y et al. Biomed Res Int 2014、Shimada Y et al. Neuroscience 2014)腸内細菌叢の乱れによる酸化ストレスが虚血性脳損傷に関連する可能性に着目し本研究の発想に至った。

### 2. 研究の目的

以上の学術的背景に基づき、申請者らは既に先行研究として脳梗塞患者の糞便中の腸内細菌叢の解析を実施しており、善玉菌の産生する乳酸が脳梗塞患者の腸内では減少していることを見出している(Yamashiro K et al. PLoS One 2017)。このことから、脳梗塞に腸内細菌叢の乱れが関与することは立証されたといえよう。本研究では、臨床的検討から得られた知見を元にして、虚血性脳損傷およびそれに伴う認知障害のメカニズムに関して腸内細菌叢の関与に着目し、腸内細菌叢の変化が脳虚血に与える傷害性の病態を解明し、新たな視点での治療法の確立を目的とした。虚血性脳損傷における腸内細菌叢の異常による炎症や酸化ストレスの関与を分子病態の面から明らかにし、ペプチド療法、プロバイオティクス、および腸内細菌移植による防御メカニズム解明を進めていく。本研究の目標達成により脳梗塞発症抑制ならびに新たな視点での脳保護療法の開発、さらには脳梗塞並びに脳血管性認知症の発症予防に寄与することを確信している。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脳虚血モデルの作製と酸化ストレスの評価

急性脳虚血モデル:

ナイロン糸を使用した中大脳動脈閉塞・再灌流モデルは急性脳虚血モデルとして広く用いら

れており、本モデルにおける酸化ストレスの関与を酸化的 DNA 障害( 8-Hydroxy-deoxyguanosine: 8-OHdG )と脂質過酸化代謝産物( 4-hydroxy hexenal: 4-HHE )の抗体を用い免疫組織化学的に評価し、電子顕微鏡レベルでの詳細な検討を加える。

マウス慢性脳低灌流モデル:

マウスの白質障害は両側総頸動脈狭窄による慢性脳低灌流により作成することが可能である。マウスモデルに関しては Shibata M ら (Stroke 38: 2826-2832, 2007) により特殊なマイクロコイルによる確実な両側総頸動脈狭窄の作成により確立されている。本モデルを用いて酸化的 DNA 障害と脂質過酸化代謝産物の脳内分布と経時的蓄積変化を免疫組織化学的に評価し、電子顕微鏡レベルでの詳細な検討を加える。

糖尿病モデルマウス:

急性脳虚血モデルでの糖尿病動物モデルとしては、*db/db* マウスを使用した。慢性脳低灌流モデルでの糖尿病の動物モデルとして高脂肪食 (high fat diet: HFD) を 12 週間摂取させたマウスと、対照として低脂肪食 (low fat diet: LFD) を同様に摂取させたマウスを作製した、

## ( 2 ) 腸内細菌叢の解析

マウスの糞便を腸内細菌のリボソーム RNA を解析対象として定量的 RT-PCR により解析し、腸内細菌叢の変化を検討する。研究分担者の山城は既に糖尿病モデルマウスにおいて糞便中のエンテロバクター科の腸内細菌が増加しており、炎症関連分子の増加と関係していることを見出している。本研究では、腸内細菌叢の変化を正常群、急性脳虚血群、慢性脳低灌流群において比較検討する。

## ( 3 ) 炎症と酸化ストレスの検討

炎症の解析: 糖尿病はアルツハイマー病のリスクとなることが知られて、最近ではアルツハイマー病でみられるアミロイドプラーク内でグラム陰性桿菌細胞壁外膜の構成成分である LPS (Lipopolysaccharide) が検出される報告があり、認知症の患者も血中 LPS が高いことが報告されている。慢性脳低灌流マウスの HFD 群と LFD 群において、炎症反応と関連する活性化ミクログリアの脳内分布と経時的変化の免疫組織化学的評価、および血中 LPS 値の経時的変化を検証する。さらに LPS の受容体である Toll 様受容体 4 (Toll like receptor 4: TLR4) と LPS および炎症性サイトカインの脳内での変化を検討した。

酸化ストレスの解析: マウス尿中および血中の 8-OHdG を測定し、酸化ストレスとの関連性について検討を行う。申請者はこれまでの研究で、抗酸化ペプチドのアドレノメデュリン (AM) が虚血性脳損傷に対して保護的作用を有することを明らかにしてきた (Miyamoto N et al. J Cereb Blood Flow Metab 29: 1769-1779, 2009, Mitome-Mishima Y et al. Biomed Res Int 2014: 861632, 2014)。この研究成果を基にして、ELISA により AM の血中濃度を測定し腸内細菌叢の変化と比較検討する。以上のごとく酸化傷害と抗酸化の対峙する病態面からの評価を行う。

## 4. 研究成果

### ( 1 ) 虚血性脳損傷と酸化ストレスの関連

マウス中大脳動脈閉塞・再灌流モデルおよびマウス慢性脳低灌流モデルにおける酸化的 DNA 障害と脂質過酸化代謝産物の脳内分布と経時的蓄積変化の免疫組織化学的評価を実施した。その結果、急性期モデルでは梗塞巣周辺に酸化ストレスマーカーの蓄積を確認した。また、慢性期モデルでは大脳白質において酸化ストレスマーカーが経時的に蓄積することを確認した。急性モデルでは、*db/db* マウスでの急性脳虚血において梗塞巣周辺により多くの酸化ストレスマーカーの蓄積が確認された。

### ( 2 ) 急性脳虚血における腸内細菌叢の変化

急性脳虚血モデルの糞便中腸内細菌のリボソーム RNA 解析を定量的 RT-PCR を用いて実施した。その結果、糖尿病モデルマウスにおいて非糖尿病マウスに比べ *Atopobium cluster*、*Enterobacteriaceae*、および *Enterococcus* が多く、*Clostridium perfringens* が少ないことが明らかになった。

### ( 3 ) 虚血性脳損傷と炎症の関連

慢性脳低灌流モデルの HFD 群と LFD 群において、炎症反応と関連する活性化ミクログリアの脳内分布と経時的変化の免疫組織化学的評価、および血中 LPS 値の経時的変化を検証した。その結果、虚血負荷後 2 週目、4 週目において HFD 群では LFD 群に比較して大脳白質障害が強く、活性化ミクログリアが有意に増加し、血中 LPS 値が有意に高くなることを確認した。さらに LPS の受容体である TLR4 と LPS の脳内での変化を検討した。HFD 群では LFD 群に比較して脳内 LPS と TLR4 発現量が有意に多く、炎症性サイトカインの IL-1 の産生が増加して炎症が惹起されることが確認できた。

また、腸管のバリアー機能についての評価を行い、HFD 群ではバリアー機能破綻が著明であることが明らかになった。以上のことから、糖尿病の病態下では腸内細菌叢異常による腸管バリアー機能の破綻によって LPS が血中に流出し代謝性エンドトキシン血症となっている。そこに脳虚血による血液脳関門機能の破綻で血中の LPS が脳内の TLR4 に作用して、免疫担当細胞を活性化

し炎症性サイトカインが増加し炎症反応が進展することで脳損傷をきたしていることを証明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 栗田尚英, 山城一雄, 黒木卓馬, 田中亮太, 上野祐司, 卜部貴夫, 野本康二, 松本 敏, 高橋琢也, 辻 浩和, 朝原 崇, 山城雄一郎, 服部信孝
2. 発表標題 Gut dysbiosis causes lipopolysaccharide-mediate inflammation in cerebral ischemia in diabetic mice.
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗田尚英, 山城一雄, 黒木卓馬, 田中亮太, 上野祐司, 宮元伸和, 卜部貴夫, 山城雄一郎, 服部信孝
2. 発表標題 腸内細菌異常による腸管透過性の亢進はLPSを介した急性期脳梗塞の組織障害進展に関与する.
3. 学会等名 第61回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 3. 栗田尚英, 山城一雄, 黒木卓馬, 田中亮太, 上野祐司, 宮元伸和, 卜部貴夫, 山城雄一郎, 服部信孝
2. 発表標題 腸内細菌叢の異常と脳虚血急性期におけるLPSを介した炎症
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 13. 栗田尚英, 山城一雄, 黒木卓馬, 田中亮太, 上野祐司, 宮元伸和, 卜部貴夫, 服部信孝
2. 発表標題 Gut dysbiosis promotes LPS-induced neuroinflammation after acute cerebral ischemia in diabetic mice.
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 26. N. Kurita, K. Yamashiro, R. Tanaka, Y. Ueno, N. Miyamoto, S. Nakajima, T. Urabe, Y. Yamashiro, N. Hattori
2. 発表標題 Gut dysbiosis promotes lipopolysaccharide-induced neuroinflammation after stroke
3. 学会等名 The 29th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function (Brain & Brain PET 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----