

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17863

研究課題名（和文）腸内細菌叢の変化を用いたくも膜下出血後早期脳損傷の新規予防法と治療法の開発

研究課題名（英文）Role of the gut microbiota in early brain injury after subarachnoid hemorrhage

研究代表者

川端 修平（Kawabata, Shuhei）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：20764062

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：早期脳損傷（EBI）はくも膜下出血（SAH）発症後早期に発生し、SAHの予後に大きな影響を与えている。今回、我々は腸内細菌叢を事前に変化させることでSAH後のEBIを予防できるかを検証した。多剤抗生剤を投与し、腸内細菌叢を変化させたラット（抗生剤群）と正常群にSAHを導入し、両群のEBIを比較したところ抗生剤群で有意な軽減を認めた。さらに抗生剤群では炎症細胞の脳内への浸潤が阻止されていた。これらの予防効果は、正常な細菌叢を再コロニー化することで消失した。以上の結果から、腸内細菌叢が炎症細胞を制御することでSAH後のEBIに影響を与えることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EBIはSAHの予後に大きな影響を与えているものの、有効な治療法が未だ確立していない。本研究では、腸内細菌叢が炎症細胞を制御することでSAH後のEBIに影響を与えることを明らかにした。今後、EBIを予防するために腸内細菌叢を調整することが新たな治療戦略となる可能性が示唆され、SAHの予後を改善させる上で意義のある研究と考える。

研究成果の概要（英文）：Early brain injury (EBI), which occurs promptly following subarachnoid hemorrhage (SAH), is crucial for the prognosis of SAH. Here, we evaluated whether prior gut microbiome (GM) alteration could prevent EBI following SAH. EBI was significantly averted by the GM alteration using antibiotics. The altered GM significantly prevented the inflammatory cells infiltration. These protective effects against EBI disappeared when the GM was recolonized with normal flora into the altered GM. Our findings demonstrated that the GM affects EBI following SAH by inflammatory cells regulation.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：くも膜下出血 早期脳損傷 腸内細菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 医療が発達した現在でも、重症くも膜下出血(SAH)は治療によらず予後不良である。重症化の主因である早期脳損傷 (Early Brain Injury; EBI) は、出血、頭蓋内圧亢進に続く一連の病態が解明されつつあるが、治療方法は未だ確立されておらず、新しい視点での病態解明、治療手段の確立が急務である。一方、早期脳損傷により、治療介入時点で既に不可逆的損傷を負っている場合も多く、治療法の開発だけでなく重症化を防ぐ(軽症化する)予防法の開発も予後改善には重要である。

(2) 腸内細菌叢の変化は、腸脳相関という言葉もあるように脳梗塞やてんかんなどの多くの脳疾患を改善させることが示されたが、SAHを対象とした研究成果の報告はない。申請者は、両者に、血液脳関門障害、酸化ストレス、炎症・免疫反応、血管内皮細胞障害、脳浮腫、皮質拡張抑制、その改善、抑制など多くの共通した病態があることに着目し、新たな腸脳相関として腸内細菌叢がSAH後脳損傷の病態とも関連する可能性があるかと仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、治療法のない EBI と腸内細菌との関係を明らかにし、腸内細菌を標的とした新しい治療法を見出すことである。破裂しても重症化を防ぐことは、SAH 全体の予後改善には治療とともに重要である。

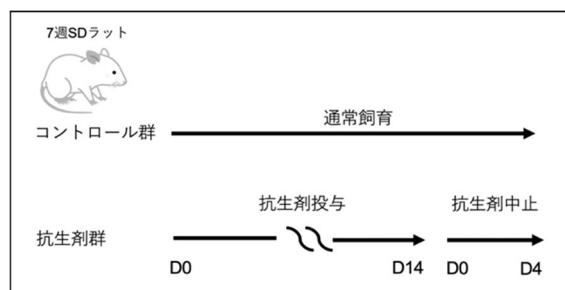
### 3. 研究の方法

#### (1) モデル作成

くも膜下出血モデルは、定位脳固定装置を用いて視交叉前槽に自家動脈血を注入し作成した。

#### (2) 腸内細菌叢の操作、解析

2 週間多剤抗生剤を用いて腸内細菌叢を消失させたラットを作成した(抗生剤群)。抗生剤自体の影響を除外するため、投与中止後 4 日目に腸内細菌叢の確認をした上で SAH を導入した。また、さらに抗生剤自体の影響の可能性を否定するため、抗生剤を用いて腸内細菌叢を消失させた後、通常飼育されたラットの腸内細菌叢を移植したラットも作成した(FMT 群)。



実験 1: 腸内細菌叢が変化したか検証するため、通常飼育した群(通常飼育群)と抗生剤群の SAH 導入前の新鮮便から DNA を抽出して、16SrRNA 解析を行った。

実験 2: 腸内細菌叢が EBI に関連するか検証するために、通常飼育群と抗生剤群に SAH を導入し、24 時間後に EBI の評価を行った。EBI の指標として、神経症状 (Garcia scale)、血液脳関門損傷 (Evan-blue extravasation) を評価した。

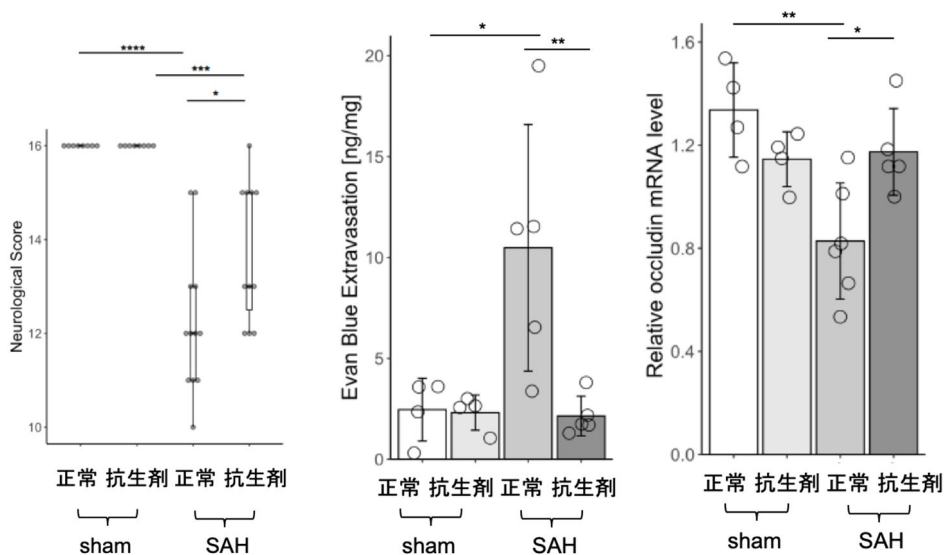
実験 3: 腸内細菌叢と EBI の関連において、炎症が関連するか検証した。SAH 導入 24 時間後に免疫染色を行い評価した。この実験では、抗生剤自体の影響をさらに除外するために通常群と抗生剤群に加えて、FMT 群についても評価した。

### 4. 研究成果

実験 1: 通常飼育群と抗生剤群の腸内細菌叢は 多様性、多様性において有意な差を認めた。抗生剤群においては通常飼育群と比較して、Bacteroidetes や Firmicutes が減少し、Proteobacterium が増加した(通常群 vs 抗生剤群,  $44.6 \pm 6.6\%$  vs  $0.023 \pm 0.0047\%$ ,  $53.2 \pm 3.7\%$  vs  $17.0 \pm 20.2\%$ ,  $2.7 \pm 1.9\%$  vs  $82.9 \pm 20.2\%$ )。

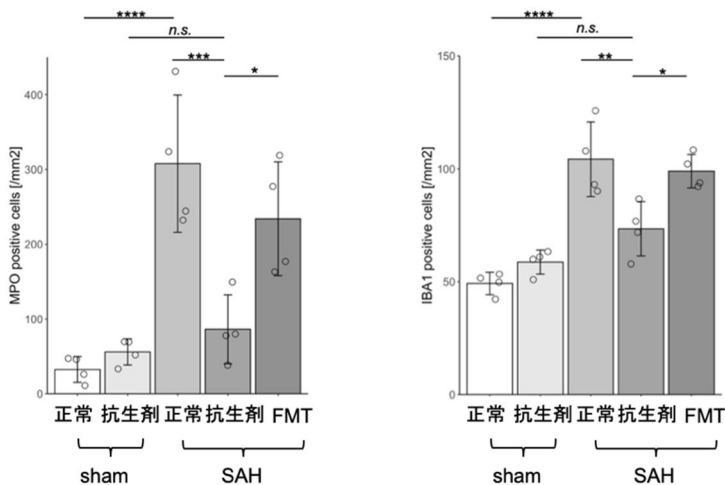
実験 2: 神経症状や BBB 損傷については SAH 導入によって増悪することを示した。また、抗生

剤群では通常飼育群と比べて EBI の改善を認めた。



実験 3：まず FMT モデルでは、腸内細菌叢が通常群に回復していることを確認した。また、免疫染色では、正常群では SAH 導入後通常群では MPO 陽性細胞が増加したが、抗生剤群では減少した。また、Iba1 陽性細胞についても同様に、SAH 導入後通常群では Iba1 陽性細胞が増加したが、抗生剤群では減少した。腸内細菌叢を通常群に戻した FMT 群では、この予防効果は消失した。

以上の結果から、腸内細菌叢が炎症を介して EBI に関与する可能性を示した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kawabata Shuhei, Takagaki Masatoshi, Nakamura Hajime, Nishida Takeo, Terada Eisaku, Kadono Yoshinori, Izutsu Nobuyuki, Takenaka Tomofumi, Matsui Yuichi, Yamada Shuhei, Fukuda Tatsumaru, Nakagawa Ryota, Kishima Haruhiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Association of Gut Microbiome with Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage: an Experimental Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Stroke Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12975-022-01112-6	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川端修平、高垣匡寿、中村元、西田武生、井筒伸之、竹中朋文、松井雄一、山田修平、寺田栄作、中川僚太、貴島晴彦
2. 発表標題 ラットくも膜下出血モデルを用いた腸内細菌叢と早期脳損傷の関連性の検討
3. 学会等名 第64回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川端修平、高垣匡寿、中村元、西田武生、井筒伸之、竹中朋文、松井雄一、山田修平、寺田栄作、中川僚太、貴島晴彦
2. 発表標題 ラットくも膜下出血モデルを用いた腸内細菌叢と早期脳損傷の関連性の検討
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川端修平、高垣匡寿、中村元、西田武生、井筒伸之、竹中朋文、松井雄一、山田修平、寺田栄作、福田竜丸、中川僚太、貴島晴彦
2. 発表標題 腸内細菌叢は好中球を制御することでくも膜下出血後の早期脳損傷に影響する
3. 学会等名 第47回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuhei Kawabata , Masatoshi Takagaki , Hajime Nakamura , Takeo Nishida , Nobuyuki Izutsu , Tomofumi Takenaka , Yuichi Matsui , Shuhei Yamada , Eisaku Terada , Ryota Nakagawa and Haruhiko Kishima
2. 発表標題 The Gut Microbiome Is Associated With Early Brain Injury After Experimental Subarachnoid Hemorrhage Via Regulation Of Neutrophils
3. 学会等名 International Stroke Conference 2022 ( 国際学会 )
4. 発表年 2022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

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