

令和 6 年 9 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02808

研究課題名（和文）腸内細菌による異所性ニューロン新生誘発の分子基盤解明とてんかん治療法創出

研究課題名（英文）Identification of gut microbiota associated with ectopic neurogenesis and development of a strategy for the treatment of neurological disorders

研究代表者

松田 泰斗（Matsuda, Taito）

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：10756993

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトを含む哺乳類成体脳の海馬歯状回顆粒細胞下帯に存在する神経幹細胞は、生涯を通して新たなニューロンを産生している。新生ニューロンの一部が歯状回の門部へ異所性に配置された場合は、てんかん原生となることが、研究代表者その他のグループの研究によりわかってきたものの詳細なメカニズムは不明であった。本研究では、研究代表者独自の、けいれん感受性亢進モデルマウスを用いて、成体海馬の異所性ニューロン新生が、腸内細菌叢の変容によって誘発されることを発見した。さらに、抗菌薬投与により、特定の腸内細菌を除去することで、増加したけいれん感受性を低下させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、同定した善玉菌の投与あるいは抗生物質投与による悪玉菌の除去などにより、「非侵襲的に」異所性ニューロン新生及びけいれん感受性亢進を改善する方法の開発を目指している。特に、てんかん原生獲得を防ぐ治療法はこれまでに確立されておらず、独創的な視点からてんかん治療に貢献できる。

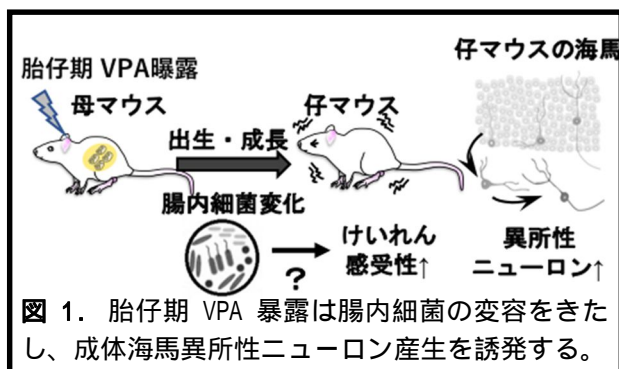
研究成果の概要（英文）：Neural stem cells in the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus of adult mammalian brains, including humans, have been observed to produce new neurons throughout life. However, recent reports have indicated that ectopic placement of some of these newborn neurons into the hilus may be epileptogenic. The detailed mechanism of this phenomenon remains unclear. In this study, we employed our own mouse model of increased seizure susceptibility to investigate the potential role of alterations in the intestinal microbiota in ectopic neurogenesis in the adult hippocampus. They demonstrated that elimination of specific intestinal bacteria through antimicrobial administration can effectively decrease the increased seizure susceptibility.

研究分野：神経科学

キーワード：腸内細菌 神経幹細胞 ニューロン新生 てんかん けいれん感受性 抗菌薬

1. 研究開始当初の背景

てんかん合併妊婦は、てんかん発作により母体が低酸素となり、児へ悪影響をおよぼす場合があるため、抗てんかん薬の服用が必要である。てんかん合併妊婦の約 20%はバルプロ酸 (VPA; valproic acid) による治療を受けており、出生した子どもは、自閉症のリスクが増大する (高頻度でてんかんを合併する) ことが



明らかにになっていた [Tuchman et al., Brain Dev 2010]。代表者は、胎仔期マウスへの VPA の一時的な曝露は、成体期になってから、海馬神経幹細胞において、新生ニューロンの移動に関わる G タンパク受容体 Cxcr4 の発現量低下を招き、異所性ニューロン新生を誘発することで、けいれん発作リスク (けいれん感受性) 増大の原因となることを明らかにした (図 1) [PNAS 2018]。しかし、トランスクリプトーム解析から、成体期における遺伝子発現パターン変化は、VPA の神経幹細胞への直接的影響ではなく、間接的な影響によって形成されたものであると考えられた。

腸内細菌叢の変容は、成体ニューロン新生が深く関わる、うつや自閉症、学習・記憶障害との関連が報告されている。また最近、胎仔期 VPA 曝露マウスでは、出生後、腸内細菌叢の乱れにより自閉症様行動を示すとの報告がなされた [Martina S et al., Neuron 2019]。そのため研究代表者は、胎仔期 VPA 曝露による出生後の腸内細菌叢の変化が、晩発的かつ間接的に神経幹細胞の挙動、特に異所性ニューロン新生へ影響を及ぼすのではないかと考えた (図 1)。仮説検証のための予備的実験の結果、研究代表者は、抗生物質投与による腸内細菌除去は、胎仔期 VPA 曝露マウスの成体海馬異所性ニューロン新生を改善することを発見した (未発表)。

そこで、本研究では、胎仔期 VPA 曝露マウスを用いて、海馬異所性ニューロン新生を誘発する腸内細菌や代謝産物を同定することで、腸内細菌が成体海馬異所性ニューロン新生を誘発する分子基盤を解明するとともに、異所性ニューロン新生を改善することで、てんかん原生獲得を回避する方法の開発を目指すこととした。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者独自の、けいれん感受性亢進モデルマウスを用いて、腸内細菌による異所性ニューロン新生誘発の分子基盤解明とてんかん治療法創出を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、胎仔期 VPA 曝露マウスとコントロールマウスの腸内細菌叢の 16S rRNA 遺伝子解析を実施し、成体海馬における異所性ニューロン新生と有意に相関する腸内細菌を特定した。得られた候補菌を無菌マウスに経口移植し、異所性ニューロン新生及びけいれん感受性増大に関わる責任菌を同定した。改善方法の検討として、単独抗菌薬投与、善玉菌投与、代謝産物合成酵素阻害剤投与を実施した。また、他のけいれん発作モデルマウス (Mecp2 欠損マウス) での改善効果も検討した。

4. 研究成果

(1)成体海馬における異所性ニューロン新生と有意に相関する腸内細菌の特定

胎仔期 VPA 暴露マウス (妊娠 12 日-14 日まで 1 日 1 回 VPA を投与)とコントロールマウスを 12 週齢まで飼育した。これらマウスの腸内細菌叢の 16S rRNA 遺伝子解析を行い、比較解析から成体海馬異所性ニューロン新生と正および負に相関する菌種を特定した。方法論的には、次世代シーケンサーから得られる 16S rRNA 遺伝子あるいはメタゲノムデータを常在菌リファレンスゲノムデータベースにマッピングし、OTU (operational taxonomic unit) レベルでの菌種組成を定量的に求めた。次に、マウス間の比較解析 (UniFrac や random forest 等の統計処理並びに各 OTU の単純組成比較解析) を行うことで、各群のマウス腸内細菌叢の菌種組成の違いに最も寄与する OTUs を特定した。

(2)異所性ニューロン新生及びけいれん感受性増大に関わる責任菌の同定

前述の解析から得られた候補となる菌を、無菌マウスに経口移植し、異所性ニューロン新生が観察されるのかどうかを DCX に対する抗体を用いた免疫染色により調べた。また、定常状態及び低濃度カイニン酸投与後のけいれん発作の程度を、脳波測定や Racine's scale を用いた行動評価により検討した。以上の解析から、研究代表者は研究分担者との共同研究により、無菌マウスに候補菌を移植し、異所性ニューロン新生を制御する菌を同定した (図 2、未発表)。

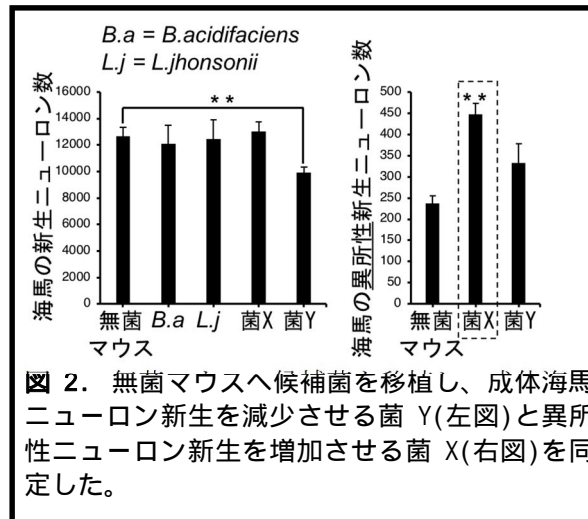


図 2. 無菌マウスへ候補菌を移植し、成体海馬ニューロン新生を減少させる菌 Y (左図)と異所性ニューロン新生を増加させる菌 X (右図)を同定した。

(3)単独抗菌薬投与、善玉菌投与、代謝産物合成酵素阻害剤投与による改善効果の検討

同定した菌 X に対応する単独抗菌薬や、[異所性ニューロン新生を抑制する善玉菌、菌 X の代謝産物合成酵素に対する阻害剤を、VPA 暴露マウスに投与することで、異所性ニューロン新生が抑制され、けいれん感受性亢進が軽減されるかどうかを検討した。その結果、抗菌薬組み合わせ投与により、VPA 暴露マウスの異所性ニューロン新生が抑制される、けいれん感受性が低下することを見出した。

(4)他のけいれん発作モデルマウスでの改善効果の検討

(3)の改善法が、てんかんを合併するレット症候群のモデルマウスである、MeCP2 遺伝子欠損マウス (保有)に対しても有効であるのかどうか検討した。その結果、MeCP2 遺伝子欠損マウスで増加する、成体海馬異所性ニューロン新生が、抗菌薬投与によって減少すること、悪化したけいれん感受性が低下することを発見した。

<研究成果のまとめ>

本研究では、研究代表者独自の、けいれん感受性亢進モデルマウスを用いて、成体海馬の異所性ニューロン新生が、腸内細菌叢の変容によって誘発されることを発見した。さらに、抗菌薬投与により、特定の腸内細菌を除去することで、増加したけいれん感受性を低下させることに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kanae Matsuda-Ito, Taito Matsuda, Kinichi Nakashima	4. 巻 17980
2. 論文標題 Expression level of the reprogramming factor NeuroD1 is critical for neuronal conversion efficiency from different cell types	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-022-22802-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Doi Hiroyoshi, Matsuda Taito, Sakai Atsuhiko, Matsubara Shuzo, Hoka Sumio, Yamaura Ken, Nakashima Kinichi	4. 巻 118
2. 論文標題 Early-life midazolam exposure persistently changes chromatin accessibility to impair adult hippocampal neurogenesis and cognition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2107596118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2107596118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Irie T., Matsuda T* (co-corresponding author), Hayashi Y., Kamiya A., Kira J.I. & Nakashima K*.	4. 巻 120
2. 論文標題 Direct neuronal conversion of microglia/macrophages reinstates neurological function after stroke.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2307972120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2307972120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Irie T#, Matsuda-Ito K#, Matsuda T* (co-corresponding author)., Masuda T., Prinz M., Isobe N. & Nakashima K*.	4. 巻 28
2. 論文標題 Lineage tracing identifies in vitro microglia-to-neuron conversion by NeuroD1 expression.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 526-534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Umeyama T., Matsuda T*. & Nakashima K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Lineage Reprogramming: Genetic, Chemical, and Physical Cues for Cell Fate Conversion with a Focus on Neuronal Direct Reprogramming and Pluripotency Reprogramming.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells13080707	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwamoto M. & Matsuda T*.	4. 巻 19
2. 論文標題 Epigenetic memory of drug exposure history controls neural stem cell quiescence in the adult brain.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Res	6. 最初と最後の頁 711-712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.382240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計15件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Matsuda T., Irie T., Matsuda-Ito K., Hayashi Y., Kamiya A., Masuda T., Prinz M.R., Isobe N., Kira J.I. and Nakashima, K.
2. 発表標題 Direct neuronal conversion of microglia reinstates neurological function after stroke.
3. 学会等名 The 50th Naito Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Matsuda-Ito K., Matsuda T., Irie T., Masuda T., Prinz M.R. and Nakashima K.
2. 発表標題 Lineage tracing using CreERT2::stop-YFP mice identifies neuronal reprogramming from microglia by NeuroD1 expression.
3. 学会等名 The 50th Naito Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kunoh, S., Zhu, Yicheng., Kai, S., Matsuda T. and Nakashima, K.
2. 発表標題 Neurogenesis in the adult hippocampus decreases after spinal cord injury
3. 学会等名 The 50th Naito Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 甲斐翔太郎、松田泰斗、中島欽一
2. 発表標題 発達期の腸内細菌がけいれん感受性に与える影響
3. 学会等名 日本発達神経科学回第12回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野村真優子、松田泰斗、和泉自泰、松田花菜江、中島孝輔、馬場健史、中島欽一
2. 発表標題 神経幹細胞の増殖再開の可否を規定するG0期誘導の分子基盤解明
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島孝輔、松田泰斗、土井浩義、山浦健、中島欽一
2. 発表標題 胎生期麻酔曝露による神経幹細胞の挙動変化とメカニズムの解明
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野村真優子、松田泰斗、和泉自泰、松田花菜江、中島孝輔、馬場健史、中島欽一
2. 発表標題 神経幹細胞の静止状態と分化における増殖停止機構の違いの解明
3. 学会等名 若手支援技術講習会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島孝輔、松田泰斗、土井浩義、山浦健、中島欽一
2. 発表標題 胎仔期ミダゾラム曝露による神経幹細胞挙動変化とそのメカニズムの解析
3. 学会等名 日本麻酔科学会第70回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松田 泰斗
2. 発表標題 ヒストン修飾酵素Setd8の発現低下は成体海馬の神経幹細胞老化を開始させる
3. 学会等名 第20回成体脳のニューロン新生懇談会・第17回神経発生討論会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松田 泰斗
2. 発表標題 ミクログリアから神経細胞へのダイレクトリプログラミングは脳梗塞モデルマウスの神経機能を回復させる
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松田 泰斗
2. 発表標題 若手研究者の神経再生への挑戦 ディレクトリプログラミングは本当に可能か
3. 学会等名 第8回TRF研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田 泰斗
2. 発表標題 Natural and artificial neurogenesis in the adult brain: Mechanisms and their possible application to treat neurological disorders
3. 学会等名 国立循環器病センターセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田 泰斗
2. 発表標題 Natural and artificial neurogenesis in the adult brain: Mechanisms and their possible application to treat neurological disorders
3. 学会等名 京都大学CIRAセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田 泰斗、土井 浩義、中島 欽一
2. 発表標題 Early-life anesthetic exposure modifies the chromatin landscape to induce long-lasting neural stem cell dormancy
3. 学会等名 第44回日本神経科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田泰斗
2. 発表標題 神経幹細胞運命決定機構を明らかにする1細胞遺伝子発現・エピゲノム解析
3. 学会等名 第64回日本神経化学会
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	梅山 大地 (Umeyama Taichi) (30706370)	九州大学・医学研究院・特任助教 (17102)	

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		
ドイツ	University of Freiburg		