

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08546

研究課題名（和文）腸内細菌叢に着目した早期糖尿病性神経障害の病態解明と新規治療法の確立

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of early diabetic neuropathy focusing on the intestinal microflora and establishment of new treatment methods

研究代表者

工藤 和洋（Kudoh, Kazuhiro）

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：50772026

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：岩木健康増進プロジェクトは2022年度に参加した。コロナ感染症の最中であり、約800人に対してPINT検査を行うにとどまった。現在、2022年度のデータについては解析中である。また、2017年度の岩木健康増進プロジェクトのデータを用い、PINT検査と体内細菌叢の関連について検討を加えた。その結果、口腔内細菌叢と痛覚閾値には関連を見出すことができなかった。それに対し、腸内細菌叢とは相関があり、特にバクテロイデス属の減少と痛覚閾値の悪化に有意な相関が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

痛覚閾値検査（PINT）は小径神経障害の程度を反映している。小径神経障害は糖尿病性神経障害などで発症するが、その病態、発症因子は糖代謝以外にははっきり解明されていなかった。本研究により初めて糖代謝以外の因子が小径神経障害に関連していることが解明された。腸内細菌、つまりバクテロイデス属の減少と相関がみられたことから、生活習慣、特に食生活の改善により小径神経障害の改善がもたらされる可能性がある。特に、糖尿病性神経障害に関連している小径神経障害に対しては、血糖管理に加えて生活習慣を改善する大きな動機付けになると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We could participate the Iwaki Health Promotion Project held in 2022. Because it was in the midst of a COVID-19 infection, we could examine the pain threshold test (PINT) only on approximately 800 individuals. The 2022 data is currently being analyzed. In addition, data from the Iwaki Health Promotion Project in 2017 was used to examine the relationship between PINT index and the body's bacterial flora. As a result, no association was found between oral bacterial flora and pain threshold. In contrast, there was a significant correlation between PINT index and the intestinal microflora. In particular, a significant correlation was found between a decrease in Bacteroides genus and a worsening of the PINT index.

研究分野：病理学

キーワード：糖尿病性神経障害 小径神経障害 腸内細菌 岩木健康増進プロジェクト

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性多発神経障害 (Diabetic polyneuropathy:DPN) は遠位対称性感覚有意の神経障害であり、細小血管合併症のなかで最も早期に発し、頻度が高い。約 30%の糖尿病患者で DPN の自覚症状があるが、電気生理学的検査では診断時に 90%の患者に F 波潜時の延長などの異常が認められる。多くの患者は無症状だが、その自覚症状にはしびれ、ピリピリ、ジンジン感などの感覚異常、痛み、さらに進行すると知覚鈍麻が出現する。進行性であるため、適切に治療しないと潰瘍形成、足の切断となり QOL を著しく低下させる。自律神経障害を伴うと、起立性低血圧や下痢や便秘などの消化器症状のみならず、心血管自律神経障害により無痛性心筋梗塞あるいは致死性不整脈の発症リスクが高まり、予後は著しく悪化する。残念なことに、DPN に対する根治的治療はいまだ確立されていない。そのため DPN の治療に応用できる新規病態の検索は急務となっている。

岩木健康増進プロジェクトは弘前大学が毎年施行している健康診断をベースとした臨床研究である¹⁻³。一般住民を対照とし、各年約 1000 人に対し非侵襲的な 2000-3000 項目の様々な項目を網羅的に測定している。その項目には血液検査、理学的検査から分子生物項目まで含まれている。筆者の所属する講座では表皮内痛覚閾値測定 (PINT) 検査を用いて、痛覚閾値測定による小径神経機能評価を 2 年毎に測定している。PINT 検査とは日本光電の PNS5100 を用いて行う定量的痛覚閾値検査である。PINT 検査では皮膚に使い捨ての電極をあて、電氣的刺激に対する反応閾値を測定する。電気刺激は選択的に表皮内の C 線維もしくは Ad 線維を刺激し、痛覚として認識される。これによって、電気刺激の強さ (mA) を定量的な痛覚閾値として評価することができる。我々の結果からは痛覚閾値は腹囲、BMI、HbA1c、脂質異常症、収縮期高血圧などのこれまで DPN の成因に関与するといわれていた因子と有意な相関を示していた¹。また、DPN の成因の一つである酸化ストレスマーカーである尿中の 8-OHdG レベルが痛覚閾値と有意に相関していた²。これらのことから、DPN のマーカーと同様に、小径神経障害を表す痛覚閾値においても DPN と同様の因子が関与していることが初めて示された。このことは、グルコース以外にも脂質をはじめとした血中の代謝物の変化が痛覚閾値の悪化に関与している可能性も考えることができる。さらに、多くの血液検査項目のうち、リポポリサッカライド結合タンパク (LBP) 値と有意な相関を示していた³。リポポリサッカライド (LPS) はグラム陰性菌の細胞壁成分であり、敗血症の原因となることが知られている。糖尿病においては腸内細菌や口腔内細菌から分泌され、動脈硬化の原因の一因である可能性が示されている。LBP は LPS と結合し複合体を形成し、間接的な LPS の指標となる。LBP-LPS 複合体はマクロファージ上の toll-like receptor と結合し、マクロファージを活性化させることが知られている。以上のことから、体内の細菌叢の変化が DPN もしくは痛覚閾値の変化に関与している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は PINT 検査により、痛覚閾値に関連する新規因子 (体内細菌叢の変化) を評価し、DPN の新規病態を探索することである。

3. 研究の方法

2018 年の岩木健康増進プロジェクトのデータを用いて、臨床測定値と PINT スコアとの関連を調べた。朝、仰臥位で末梢静脈から空腹時採血を行い、臨床指標を評価した。糖尿病は、2010 年

日本糖尿病学会基準（IFG：空腹時血糖値 110～125mg/dl、糖尿病：空腹時血糖値 126mg/dL 以上または HbA1c 値 6.5%以上）に従って診断した。血糖値が正常で糖尿病の治療薬を服用している者も糖尿病と定義した。HbA1c 値に影響を及ぼす 1 型糖尿病や遺伝性疾患と診断された患者はいなかった。

PINT については、先行研究で採用された方法と同じ方法を用いた¹⁻³。PINT 法は、使い捨ての双極針電極（NM-983 W；日本光電工業株式会社、東京、日本）を皮膚 A 線維および C 線維用の特異的刺激装置（PNS-5100；日本光電工業）に接続して採用した¹。刺激装置は外輪陽極（直径 1.3mm）からなり、陰極には外輪の高さから 0.025mm 突出した内針が含まれていた。PINT 電極は足の甲中央の皮膚に設置された。無作為に選ばれた参加者の約半数では、短趾伸筋上の皮膚も同時に評価に用いられた。電気刺激強度は、0.4mA から開始し、0.05mA ずつ段階的に減少させた。PINT スコアは、被験者が 2 回以上の試行で刺痛覚を感じた最小強度と定義した。すべての被験者について、PINT スコアの中央値は 0.10 mA であり、すべての被験者の平均 PINT スコアは 0.11 ± 0.09 mA で、95%信頼区間は 0.11～0.12 であった。95 パーセンタイルは 0.12mA であった。したがって、この研究では、0.15 mA 以上の PINT スコアを示す被験者を高 PINT 被験者と分類した。

検査日の早朝採取した唾液ぬぐい液と糞便を用いて、口腔内細菌叢と腸管細菌叢の検討を行った。DNA を抽出後、次世代シーケンサーにより解析を行った。解析は Ozato らのプロトコールに従って行った⁴。原核生物 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域の増幅にはユニバーサルプライマーセットを用いた PCR を行った。精製した PCR 断片は、リアルタイム定量 PCR（q-PCR）により定量した。イルミナペアエンドシーケンスは、MiSeqTM システム（Illumina, San Diego, CA, USA）の 2×300 サイクルペアエンド法を用いて行った。Illumina MiSeq システムからのマルチプレックスペアエンドリードを以下のように処理した。Cutadapt（バージョン：1.13）により、アダプター配列と低品質塩基（threshold = 20）をリードの 3' 末端でトリミングした。N 塩基を含み、150 塩基より短いリードは廃棄した。フィルター閾値以上のペアエンドリードはマージされ、“マージリード”と呼ばれる 1 つのリードとなった。370 より短い、または 470 より長いマージリードは、VSEARCH の fastq_mergepairs サブコマンド（バージョン：2.4.3）で除外した。予想されるシーケンスエラーが 1 つ以上あるマージリードも除外した。VSEARCH の uchime_denovo サブコマンドで検出されたキメラリードを除去した後、残りのマージリードを配列同一性 $\geq 97\%$ でクラスタリングした。同定されたクラスターの分類群は、代表的なリードをもとに Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) という微生物群のデータベースを適用して予測した。信頼値が 0.8 以下のものは未分類として扱った。本研究では、Ruminococcus は Ruminococcaceae に属する属、Ruminococcus2 は Lachnospiraceae に属する属とした。腸内細菌叢の各属の割合は、各属のリードカウント数を全リードカウント数で除した構成比である。腸内細菌叢における様々な腸内細菌と口腔内細菌叢における口腔内細菌の相対的存在量を、高 PINT 症例と低 PINT 症例間で比較した。相対的存在量は、リード総数に対する各細菌のリードの構成比として示した。全腸内細菌叢と口腔内細菌叢を調査し、相関解析では相対存在量が 1% を超える微生物叢を評価した。これらの微生物叢は SFN の臨床病態に影響を及ぼす可能性がある。臨床データの統計解析は、JMP ver. 12.1（SAS Institute, Cary, NC）および R ソフトウェア（R Foundation for Statistical Computing, version R-3.4.3）を用いて行った。臨床指標の値は平均値 \pm 標準偏差で表した。正規分布は Shapiro-Wilk 正規性検定および Kolmogorov-Smirnov 正規性検定により評価した。すべての種類の細菌量と PINT スコアは正規分布していなかった。2 群間の値の差（パラメトリックまたはノンパラメトリック）および群間の症例-対照の関連（ノ

ンパラメトリック)の統計的有意性は、それぞれ一元配置分散分析(ANOVA)と事後検定、2検定およびWilcoxon順位和検定により評価した。PINTスコアと臨床パラメータとの相関は線形回帰分析で評価し、相関はさらに多重ロジスティック回帰分析で評価した。値は、単変量回帰分析を用いてPINTスコアと関連する因子について調整し、以前の研究(板橋ら、2019;工藤ら、2020;大園井ら、2020)で報告されたように、PINT値の共因子となりうる変数を考慮した。さらに、 α -多様性はShannon指数とChao1指数を用いて評価し、 β -多様性は主座標分析で評価し、並べ替え多変量分散分析を用いて統計的に分析した。低PINT症例と高PINT症例の臨床的ベースライン特性を一致させるために、ロジスティック回帰モデルを適合させて傾向スコアを推定した。

4. 研究成果

被験者背景

いわきスタディ 2018 のボランティア 1056 人のうち、顕性糖尿病被験者を含む 110 人(男性 419 人、女性 582 人)が最終的に本研究で検討された。参加者はさらに、耐糖能のある被験者 789 人(男性 327 人、女性 462 人)と耐糖能のない被験者 212 人(男性 92 人、女性 120 人)に分けられた。各群は、PINT 値(0.15mA)に基づいて以下のように低 PINT 群と高 PINT 群に分けられた。

糖尿病状態に基づく参加者背景

平均年齢は、糖尿病群(DM)が非糖尿病群(nDM)よりも有意に高かった(62.27 ± 12.98 歳 vs 50.56 ± 2.68 歳、 $p < 0.01$)。HbA1c 値は、IFG 群で nDM 群より有意に高かった($6.12 \pm 0.14\%$ vs $5.55 \pm 0.23\%$ 、 $p < 0.01$)。DM 群の HbA1c は、IFG 群と比較してさらに上昇した($7.19 \pm 1.14\%$ vs $6.12 \pm 0.14\%$ 、 $p < 0.01$)。IFG の PINT スコアは nDM のそれよりも有意に高かった($0.12 \pm 0.11\text{mA}$ vs. $0.11 \pm 0.08\text{mA}$ 、 $p < 0.05$)。DM の PINT スコアは IFG のそれよりも高かった($0.15 \pm 0.13\text{mA}$ vs. $0.12 \pm 0.11\text{mA}$ 、 $p < 0.05$)。

PINT スコアに基づく参加者背景

年齢、BMI、ウエスト周囲径、ヒップ周囲径などのメタボリックシンドローム関連パラメータ、sBP、Tg、FBG、HbA1c、c-ペプチドなどの糖尿病関連パラメータ、BUN、Cr などの腎不全関連パラメータは、高 PINT 被験者で低 PINT 被験者より有意に高かった。PINT スコアは、低 PINT 群と比較して高 PINT 群で有意に高かった($0.22 \pm 0.10\text{mA}$ vs. $0.07 \pm 0.02\text{mA}$ 、 $p < 0.001$)。

口腔細菌叢 PINT 値

口腔細菌床では、主座標分析において、低 PINT 群と高 PINT 群との間に微生物構造の差は認められなかった。

腸内細菌叢と末梢痛覚

主座標分析により、糖尿病および IFG を有する被験者を含む低 PINT 群と高 PINT 群の間で、微生物組成に有意差があることが明らかになった($p < 0.01$)。糖尿病と IFG の被験者を除外しても、有意差は維持された($p < 0.01$)。糖尿病と IFG を含む低 PINT 群と高 PINT 群では、シャノン指数($p < 0.05$)とチャオ 1 指数($p < 0.05$)に有意差が認められた。これらの有意差は、糖尿病と IFG の被験者を除いても維持された(Shannon index は $p < 0.05$ 、Chao1 index は $p < 0.05$)。さらに、次世代シーケンシング解析に基づいて、腸内細菌叢に 317 属が同定された。合計 17

属が相対存在量 1%以上で同定された。これらの相対存在量が 1%以上の属のうち、3 つの属の相対存在量に低 PINT 群と高 PINT 群の間で有意差が認められた。バクテロイデス属の相対存在量は、低 PINT 参加者の方が高 PINT 参加者よりも有意に高かった(11.3±7.0%対 10.0±6.7%、 $p < 0.01$)。この差は、糖尿病および IFG を有する被験者を除外した後も維持された(11.2±6.9%対 10.0±6.5%、 $p < 0.05$)

PINT スコアとバクテロイデスの相対量を含む臨床パラメータとの相関性

単変量回帰分析により、PINT スコアと臨床的指標、例えば性、年齢、BMI、腹囲、HbA1c、C-ペプチド、e-GFR、sBP、尿酸、およびバクテロイデスの相対存在量との間に有意な相関があることが明らかになった。PINT スコアとバクテロイデス相対量($r = -0.07181$ 、 $p < 0.05$)または年齢($r = 0.128088$ 、 $p < 0.01$)との相関は、単変量解析で PINT と相関する複数の因子(性、BMI、腹囲、HbA1c、c-ペプチド、e-GFR、sBP、尿酸、脂質異常症)で調整した後も有意であった。

バクテロイデスの相対存在量と臨床測定値との相関性

単変量回帰分析を行い、腸内細菌叢におけるバクテロイデスの相対存在量と相関する因子を探索した。単変量回帰分析の結果、バクテロイデスの相対存在量と、年齢、BMI、腹囲、ウエスト周囲径、FBG、HbA1c、BUN、e-GFR、sBP、Hs-CRP、水分摂取量、タンパク質摂取量などの臨床測定値との間に有意な相関が認められた。バクテロイデスの相対存在量と年齢との相関($r = -0.08922$ 、 $p < 0.05$)は、複数の因子(BMI、腹囲、FBG、HbA1c、BUN、e-GFR、sBP、Hs-CRP)で調整した後も有意であった。

以上から本研究から痛覚閾値は腸管バクテロイデス属量と相関することが解明された⁵。この結果は食事内容など生活習慣の改善により、痛覚閾値の改善がもたらされる可能性を初めて示すことができた。

文献

1. Itabashi C, Mizukami H, Osonoi S, et al. Normal High HbA1c a Risk Factor for Abnormal Pain Threshold in the Japanese Population. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10;651.
2. Osonoi S, Mizukami H, Itabashi C, et al. Increased Oxidative Stress Underlies Abnormal Pain Threshold in a Normoglycemic Japanese Population. *Int J Mol Sci*. 2020;21;8306.
3. Kudoh K, Mizukami H, Itabashi C, et al.: Lipopolysaccharide-binding protein is a distinctive biomarker of abnormal pain threshold in the general Japanese population. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2020;8:e001739.
4. Ozato N, Saito S, Yamaguchi T, et al. *Blautia* genus associated with visceral fat accumulation in adults 20-76 years of age. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2019;5;28.
5. Takeuchi Y, Mizukami H, Kudoh K, et al. The diversity and abundance of gut microbiota are associated with the pain sensation threshold in the Japanese population. *Neurobiol Dis*. 2022;173:105839.

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 1件）

1. 著者名 Yuki Takeuchi, Hiroki Mizukami, Kazuhiro Kudoh, Sho Osonoi, Takanori Sasaki, Hanae Kushibiki, Saori Ogasawara, Yutaro Hara, Akiko Igawa, Xuekai Pan, Takahiro Yamada, Keisuke Yamazaki, Tatsuya Mikami, Makoto Daimon, Soroku Yagihashi, Kenichi Hakamada, Shigeyuki Nakaji	4. 巻 173
2. 論文標題 The diversity and abundance of gut microbiota are associated with the pain sensation threshold in the Japanese population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurobiol Dis .	6. 最初と最後の頁 105839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2022.105839	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8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 工藤和洋、水上浩哉
2. 発表標題 シンポジウム23 Analysis of small fiber neuropathy by PINT method and big data.
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森嶋奈那子、工藤和洋、遅野井祥、竹内祐貴、小笠原早織、佐々木崇矩、八木橋操六、水上浩哉
2. 発表標題 小径神経障害に関連する口腔、腸内細菌叢変化についての検討
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 工藤和洋、井川明子、佐々木崇矩、遅野井祥、水上浩哉
2. 発表標題 糖尿病は非腫瘍乳癌のE-cadherin発現を低下させ乳癌の予後を悪化させる
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井川明子, 工藤和洋, 原裕太郎, 袴田健一、水上浩哉.
2. 発表標題 Perivascular invasionは臨床的リンパ節転移陰性の浸潤性小葉癌における病理学的ステージ悪化と関連する
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 工藤和洋、井川明子、佐々木崇矩、竹内祐貴、遅野井祥、水上浩哉
2. 発表標題 Lipopolysaccharide-binding protein(LBP)は日本人における痛覚閾値異常のバイオマーカーとなりうる
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 工藤和洋、井川明子、佐々木崇矩、遅野井祥、水上浩哉
2. 発表標題 Lipopolysaccharide-binding protein(LBP) は日本人における痛覚閾値異常のバイオマーカーとなりうる
3. 学会等名 第32回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 工藤和洋、井川明子、佐々木崇矩、竹内祐貴、遅野井祥、水上浩哉
2. 発表標題 Lipopolysaccharide-binding protein(LBP)は日本人における痛覚閾値異常のバイオマーカーとなりうる
3. 学会等名 第36回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 工藤和洋、佐々木崇矩、竹内祐貴、田中幹二、水上浩哉
2. 発表標題 特発性肺動脈性肺高血圧症で死亡した妊婦の一部検例
3. 学会等名 第67回日本病理学会秋期特別総会（招待講演）
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
研究協力者	水上 浩哉 (Mizukami Hiroki)	弘前大学・医学研究科・教授 (11101)	

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