

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16608

研究課題名（和文）脳動脈瘤の発生と破裂に対する腸内細菌叢の老化が与える影響の解明と新規治療法の探索

研究課題名（英文）Investigation of the effects of aging of the gut microbiome on the development and rupture of cerebral aneurysms and the search for novel therapies.

研究代表者

角野 喜則 (Kadono, Yoshinori)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：60770675

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）：腸内細菌叢の老化がくも膜下出血の重症化に与える影響を検討するため、老年マウスに対して若年マウスからの便移植を行うことで腸内細菌叢を変化させた便移植老年マウスに、くも膜下出血を導入する実験を行った。くも膜下出血導入後の24時間以内の致死率は便移植前後で低下し、早期脳損傷の程度についても軽減していることが免疫染色、FACSなどの結果で判明した。また、当研究室から報告している、未破裂動脈瘤患者と脳動脈瘤破裂が原因のくも膜下出血患者の便検体から認めた腸内細菌叢の差異を、同患者間の血液検体の一塩基多形とポリジェニックリスクスコアを検討したところ、脳動脈瘤の破裂リスクを評価できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、これまでに指摘されてきた高齢者における破裂脳動脈瘤によるくも膜下出血の重症化や予後不良の因子として、腸内細菌叢の老化が関係していることが判明した。また、年齢や性別、瘤の大きさ、部位などでしか予測し得なかった未破裂脳動脈瘤の破裂率に、腸内細菌叢やSNPといった新たな尺度を加え、より高い精度で破裂予測ができるようになることが期待できる。また、これまでは外科的介入で破裂予防をするしかなく、くも膜下出血への防御策が、腸内細菌叢の操作で、破裂予防と破裂時の重症化予防を同時に行える新しいアプローチへの道がひらけば、医療経済的にも高齢者などへの低侵襲な介入としても期待できる。

研究成果の概要（英文）：To investigate the effect of aging gut microbiome on the severity of subarachnoid hemorrhage, we performed an experiment to induce subarachnoid hemorrhage in old mice transplanted with stool from young mice, in which the gut microbiome was altered by transplantation of stool. Immunostaining and FACS revealed that the mortality rate within 24 hours after induction of subarachnoid hemorrhage decreased after stool transplantation, and the degree of early brain injury was also attenuated after stool transplantation. In addition, the differences in gut microbiome observed in stool samples from patients with unruptured aneurysms and patients with subarachnoid hemorrhage caused by ruptured cerebral aneurysms, as reported from our laboratory, were examined using single nucleotide polymorphisms and polygenic risk scores of blood samples among the same patients, suggesting the possibility of assessing the risk of rupture of cerebral aneurysms.

研究分野：Cerebral vascular disease

キーワード：subarachnoid hemorrhage cerebral aneurysm gut microbiome くも膜下出血 加齢マウス 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

<臨床的背景>

くも膜下出血 (SAH) は脳動脈瘤の破裂によって生じる現代における最良の医療技術を用いても極めて予後不良の疾患である。その原因の多くは脳動脈瘤の破裂であり、本邦では脳ドックの広がりにより脳動脈瘤は未破裂の状態で見られる場合も多く、その破裂率の予測は動脈瘤の大きさや形態、高血圧の有無、年齢や性別などからの推定法が知られている (Stroke. 2017;48:2105-12)。しかし本邦の報告では、未破裂脳動脈瘤の自然破裂率は全体で約1%と極めて低く (N Engl J Med 2012; 366: 2474-82)、前記の推定法で破裂しやすいとされる大型瘤に対して、実際に破裂して見つかる動脈瘤は小型なものも多く、精度の高い破裂予測は未だ不可能であり、新たな破裂予測の指標が期待されている。

近年本邦では高齢化が急速に進んでいるが、高齢者は若年者と比べて脳動脈瘤の破裂率が高く、80歳以上であることが破裂リスクであるとされている (Stroke. 2007;38:1404-1410; Neurol Med Chir 2017;57:247-252)。加えて、破裂した場合の予後も高齢者では極めて不良であるため、適切な破裂予防が求められる (J Neurosurg. 1996;85:410-8)。しかし、実際の臨床においては、特に80歳以上の高齢者では破裂予防手術のリスクと自身の余命を考慮して経過観察を選択する場合も多く、破裂リスクが高く、かつ破裂時の予後が不良であるにも関わらず、予防的治療を避けてしまうという矛盾が存在し、高齢化が進む本邦において重要な問題になっている。

<研究背景>

腸内細菌叢の加齢性変化腸内細菌は「腸脳相関」という言葉に代表されるように、うつ病やてんかん、脳梗塞などの脳疾患との関連性が知られており (Cell. 2018;173:1728-41)、また、加齢にともなって腸内細菌が変化して、その変化が慢性的な炎症を引き起こすことが老化に関与していることも報告されている (Cell Host Microbe. 2018;21(4):455-466より引用)。さらに、SAHと同じ脳血管疾患の脳梗塞においては、これらの結果から腸内細菌の老化が疾患の予後に影響を与えていることが考えられ、腸内細菌の若年化で疾患予後を改善させることができると注目されている (Ann Neurol. 2018;84:23-36) 一方で、腸内細菌と脳動脈瘤との研究における報告はまだ少なく、抗生物質投与による腸内細菌の制御と炎症性サイトカインの発現低下により、脳動脈瘤の発生、破裂を抑制できた報告 (Hypertension. 2019;73:491-496) がある程度で、腸内細菌の老化と脳動脈瘤の関連についての研究はまだ進んでいない。

上記二つの背景を受けて、今回我々は『高齢者になぜ予後不良な脳動脈瘤破裂が多いのか?』という問いに対して、『腸内細菌叢の加齢性変化に伴う慢性炎症反応の上昇が原因の一つである』という仮説を提唱し、それを証明するために、腸内細菌の老化が脳動脈破裂やSAHの早期脳損傷に与える影響を解明すべく本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、未破裂脳動脈瘤患者の腸内細菌を調べることで、疾患群の腸内細菌叢に年齢層による違いがあることを明らかにし、また、老齢の腸内細菌叢を導入した若齢の動物を用いた腸内細菌の若年化の実験において、脳動脈瘤破裂時の違いを検証することで、脳動脈瘤患者の腸内環境の老化とその破裂や重症化に対する影響を明らかにすることである。本研究の仮説を証明することは、腸内細菌の若年化を行うことで高齢者における非侵襲的、かつ安全に脳動脈瘤の破裂を予防するという、これまでに報告されていない、独自の治療法につながる可能性がある。

3. 研究の方法

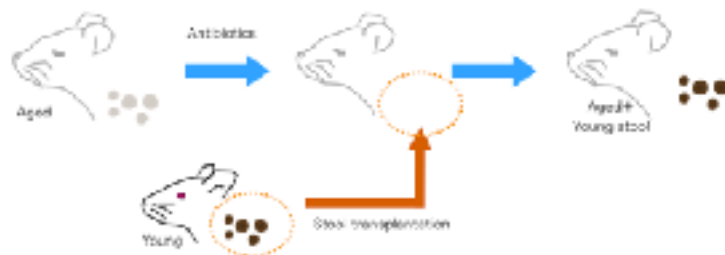
<脳動脈瘤保有患者での検討>

対象は未破裂脳動脈瘤で通院している患者と、脳動脈瘤破裂によるSAHで加療している患者で、それぞれから便検体のサンプルを収集し、破裂、未破裂、間での腸内細菌叢の違いを解析した。便検体の採取は本人、もしくは家人に研究協力の同意が得られた後に行い、集められた検体は-80度で保存し、DNAを抽出した後に16Sリボソーム解析を行った。得られたデータ (FASTQファイル) はQIIME2を用いて菌種の同定を行い、群間比較解析 (LEfSe) を行って有力な細菌の同定を試みた。

<マウス脳動脈瘤破裂モデルを用いた実験>

実験マウスには雌C57BL/6J種を使用した。9-12週齢マウスを若年群とし、17-20ヶ月齢マウスを老年群とした。SAHは、定位脳固定装置を用い視交叉前脳槽に自家動脈血を注入することで導入した。まず、若年マウスと老年マウスにおけるSAH導入を行い、その致死率や早期脳損傷 (EBI) の程度を比較した。続いて老年マウスに抗生剤含有水の投与を行い腸内細菌を除菌したのち、予め採取した若年マウスの糞を用いて便移植を行う腸内細菌叢若年化老年マウスを作成し、同じくSAH導入後の致死率やEBIの程度がどう変化するかを移植前と比較した。EBIの評価

は神経学的スコアと、脳浮腫、血液脳関門の破壊や細胞死、ミクログリアや好中球の増加、TNF- α の発現で評価した。腸内細菌が適切に変化しているかを確認するため、それぞれの群でSAH導入前に便検体を採取し、DNAを抽出の後、16S rRNA解析を行った。



4. 研究成果

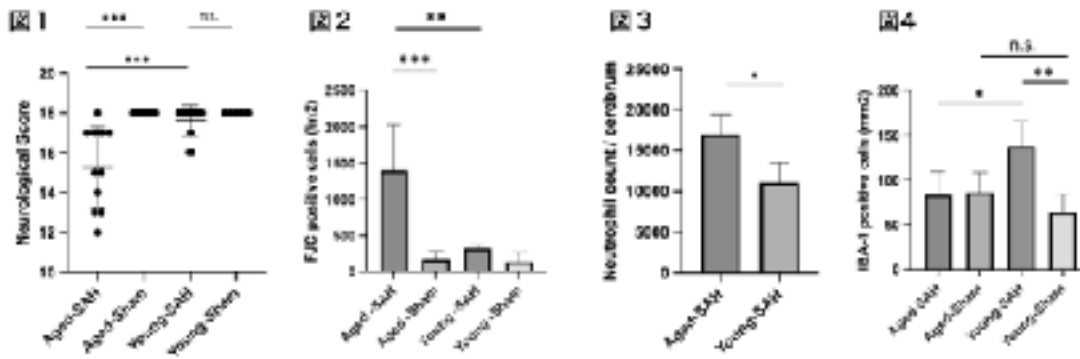
<脳動脈瘤保有患者での検討>

未破裂動脈瘤患者における便検体回収、及び動脈瘤破裂によるSAH患者の便検体回収を完了し、腸内細菌叢の比較解析を行ったところ、*Campylobacter*属、中でも*C. ureolyticus*が破裂に関与していることが示唆された (Stroke. 2022 Mar;53(3):895-903.)。

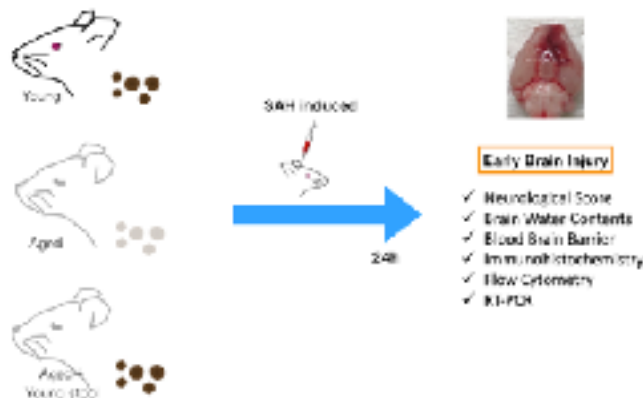
同じ患者の血液検体から得られた一塩基多型 (SNP) 情報、またポリジェニックリスクスコアも含めた検討を追加で行っており、こちらについては現在論文作成中 (未発表) である。

<マウス脳動脈瘤破裂モデルを用いた実験>

老年マウス (18-20ヶ月齢) ではくも膜下出血を導入した際の神経スコアの悪化が若年マウス (2-3ヶ月齢) と比較してより顕著であり (Garcia scale 15.3 vs. 17.6、図1)、24時間以内の致死率も優位に高かった (Mortality 28.1% vs. 0%)。EBIの評価では、脳浮腫やBBBの破壊は老年マウスで少ない一方、神経損傷の程度 (図2) や好中球の浸潤 (図3) は老年マウスが高い傾向がみられた。また、若年マウスではSAHによりミクログリアの増加がみられたが、老年マウスではミクログリアの増加はみられなかった (図4)。



老年マウスに対して抗生剤投与を行った上で若年マウスの便移植を行い腸内細菌叢を変化させ、その後にくも膜下出血を導入した際の早期脳損傷について評価を行った。腸内細菌叢の解析を16S rRNAで行ったところ、老年マウスと若年マウスでは腸内細菌叢の分布がかなり異なっており、さらに便移植後は老年マウスの腸内細菌叢が若年マウスのもに近似した分布に変化していることを確認することができた。またくも膜下出血24時間内の致死率は低下し、早期脳損傷についても軽減していることが免疫染色、FACSなどの結果で判明した。(未発表、論文作成中)



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 15
2. 論文標題 Association of Gut Microbiome with Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage: an Experimental Study	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Translational Stroke Research	6. 最初と最後の頁 87-100
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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田竜丸、高垣匡寿、角野喜則、尾崎友彦、中村元、貴島晴彦
2. 発表標題 若齢・加齢マウスにおけるSAH後EBIの違い
3. 学会等名 Stroke2024
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 福田竜丸、高垣匡寿、角野喜則、尾崎友彦、中村元、貴島晴彦
2. 発表標題 若齢・加齢マウスを用いたSAH後EBIの比較
3. 学会等名 第37回日本老年脳神経外科学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 角野喜則、川端修平、平井信登、西川佑甫、末松拓也、梶川隆一郎、都築 貴
2. 発表標題 重症くも膜下出血における早期脳損傷と早期治療の検討
3. 学会等名 第77回日本脳神経外科学会学術総会
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
研究協力者	福田 竜丸 (Fukuda Tatsumaru) (90825712)	大阪大学 (14401)	

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