

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15394

研究課題名（和文）腸内細菌のパーキンソン病病態関与の解明

研究課題名（英文）Elucidating the Role of Gut Microbiota in the Pathogenesis of Parkinson's Disease

研究代表者

浜口 知成（Hamaguchi, Tomonari）

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：90812149

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：申請者は特定の腸内細菌がパーキンソン病(PD)を発症させると仮説を立てている。本課題の目的の1つは発症および進行に関わる腸内細菌を特定することである。2つ目はPDにおける短鎖脂肪酸(SCFA)の役割を明らかにすることである。課題1に対して、*A. muciniphila*と*Bacteroides* spp.の共移植モデルを作成し、PD最初期症状の便秘を実験的に再現した。課題2に対して短鎖脂肪酸受容体ノックアウトモデルとPDモデルマウスを交雑させることでPD症状の増悪を認めた。そのため、モデルマウス研究を通じて腸内細菌がPDの症状に関与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで世界各地での研究により、パーキンソン病（PD）患者の腸内細菌叢とPDの病態との間に相関が見られることが明らかになってきた。しかし、これらの相関関係から直接的な因果関係を特定するには至っていない。本研究では、モデルマウスを使用してPDに特有の腸内細菌がPDの初期症状である便秘を再現することを検証しました。さらに、腸内細菌叢が産生する短鎖脂肪酸が病態の進行をどのように抑制するかも明らかにしました。本研究にて、PDは腸脳相関が破綻することに伴う病気であることを示すことができた。

研究成果の概要（英文）：We hypothesize that specific gut bacteria are involved in the onset and pathogenesis of Parkinson's Disease (PD). One objective of this project is to identify the gut bacteria involved in the onset and progression of PD. The second is to elucidate the role of short-chain fatty acids (SCFAs) in PD. For Objective 1, we created a co-transplantation model of *A. muciniphila* and *Bacteroides* spp. and experimentally reproduced chronic constipation, an early symptom of PD. For Objective 2, we observed an exacerbation of PD symptoms by cross-breeding a short-chain fatty acid receptor knockout model with a PD mouse model. Thus, through mouse model studies, it has been demonstrated that gut bacteria are involved in the symptoms of PD.

研究分野：分子病態

キーワード：腸内細菌 パーキンソン病 短鎖脂肪酸 モデルマウス研究

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)は、中脳黒質ドパミン神経細胞へのLewy小体( $\alpha$ -synuclein異常蓄積)出現を特徴とする加齢とともに増加する神経変性疾患であり、2030年には世界で1000万人の罹患数に到達すると推定される。近年、PDの少なくとも半数は腸管発症であることが高いレベルのエビデンスで明らかにされつつある。十二指腸潰瘍治療目的で迷走神経切除術を受けた人のPD発症率が50%低下することもPDの腸管起源説を示唆している。我々は、腸内細菌の代謝産物である便中短鎖脂肪酸がPD患者では減少することを見出すとともに、我々のメタゲノムデータを既報4か国と合わせたメタ解析を行うことにより、短鎖脂肪酸産生菌が患者で有意に減少することを報告した(H. Nishiwaki, 2020)。 *A. muciniphila* はムチンを特異的に貪食することがよく知られている。しかし、今日までこの腸内細菌や短鎖脂肪酸による病態への影響を調べるマウスモデル研究は殆ど存在しない。

## 2. 研究の目的

本研究では、2つの研究課題を掲げた。1つ目はPD発症および進行に関わる腸内細菌を特定することを目的として、PD特有の腸内細菌を無菌化野生型マウス(ノトバイオート)に投与して、病態評価を行う。2つ目は短鎖脂肪酸の病態への影響を調べることを目的として、短鎖脂肪酸受容体GPR41ノックアウトと $\alpha$ -synucleinトランスジェニック(ASO)の交雑マウスを対象として病態評価を行う。また、研究途中でPD病態に深く関わることを見出した中枢GLP-1の役割についても探索した。本件研究はPDにおける腸内細菌叢の役割を明らかにして、PDの発症および進行要因に迫る。

## 3. 研究の方法

### (1)PD特有の腸内細菌移植マウスモデル研究

C57BL/6N無菌マウスを作成した。そして、Altered Schaedler Flora(ASF群)と *Bacteroides spp.* (Bs群)、 *A. muciniphila* (Am群)、さらにBsとAmを両方混ぜて投与したBs&Am群の4群の移植マウス(Gnotobiotic mouse)を作成した。代謝ケージで飼育し、24時間排泄能と施肥量を計測した。

便および腸管を標本として免疫化学染色を行なった。便中ムチン量を評価した。

便中腸内細菌のRNA-seqを行なった。群間で異なる変動遺伝子の同定し、活性化している代謝経路を同定した。

前期代謝経路を遮断すべくBs変異株を作成した。AmとBs変異株を移植し、同様に代謝ケージ実験と免疫化学染色を行なった。

各種の移植モデルマウスに対して、蛍光標識デキストランを経肛門投与した。血中に蛍光標識デキストランが検出された場合、マウスモデルの腸管透過性亢進を評価できる実験系である。

### (2)短鎖脂肪酸受容体ノックアウトPDマウスモデル研究

GPR41K0とSynuclein overexpression(ASO)の交雑マウスを用意した。

Beam testと、Rotarod test、Wire hanging testの行動解析を実施した。

中枢GLP-1を測定すべくELISAを行った。延髄と小脳を除いた領域を標本とした。数時間絶食後にプロピオン酸を投与して、経時的にサンプルを採取した。野生型マウスとGPR41K0マウス

スの中枢 GLP-1 濃度を比較した。

黒質のミクログリアの形態評価するため、免疫染色を行なった。野生型マウスと GPR41K0、AS0、GPR41K0&AS0 の 4 群で比較した。

野生型マウスの迷走神経節における GPR41 の発現を確認するため、RNA-scope を利用して in situ hybridization (ISH) を行なった。

野生型マウスの脳延髄を標本として GLP-1 抗体染色を行なった。

#### 4. 研究成果

(1) 代謝ケージの結果、Bs&AM 共移植マウスでは便の総数と総重量、水分含量がいずれも有意に減少していた(図 1)。摂餌量や飲水量、蓄尿量、便の総乾燥重量に差は見られなかった。以上より、PD 特有の腸内細菌移植マウスモデルは便秘を発症させた。便および腸管標本染色を行なったところ、ムチン糖鎖タンパク質の減少が確認された。bulk RNA-seq によって Am では硫黄同化代謝経路(図 2)が進んでいた。

*Bacteroides* が大腸粘膜の末端硫黄修飾を脱硫する機能が報告された(As. Luis, 2021)。*Bacteroides spp.*による脱硫によって産生された遊離硫黄を、*A. muciniphila* が硫黄同化に利用している可能性を考えた。そこで、Bs の硫黄代謝経路(sulfatase)を遮断するためのノックアウト Bs(BsK0)株を作成した。そして、この BsK0&Am 共移植マウスと BsWT&Am 共移植マウスの便秘症状を比較したところ、

BsK0&Am 共移植マウスでは便秘症状が緩和された(図 3)。また、BsWT&Am 共移植マウスの腸管透過性は亢進していた。

ムチン貪食にともなう透過性亢進の可能性が示唆された。

以上より、Bs によるムチン脱硫酸化反応が Am のムチン貪食を増強させ、便秘症状を誘発する病態制御機構を明らかにした。

(2) 行動試験の結果、交雑群がいずれも機能低下を示した。脳の ELISA を行なったところ、

GPR41K0 マウスにおいては短鎖脂肪酸投与による GLP-1 分泌が認められなかった(図 4)。黒質のミクログリアの形態変化が GPR41K0 マウスにおいて認められた。そして GLP-1 agonist 投与群は形態変化を認めなかった。ISH によって迷走神経節の GPR41 発現を確認した。また、抗体

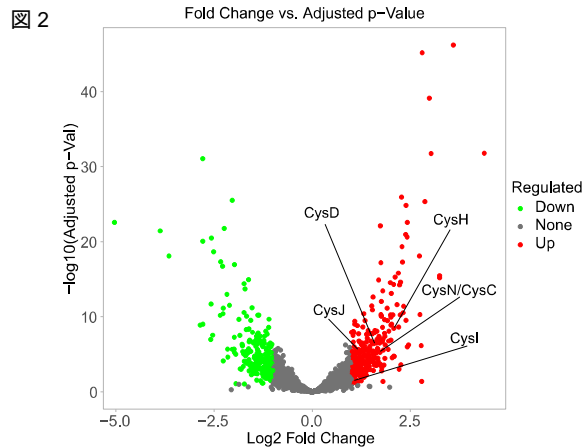
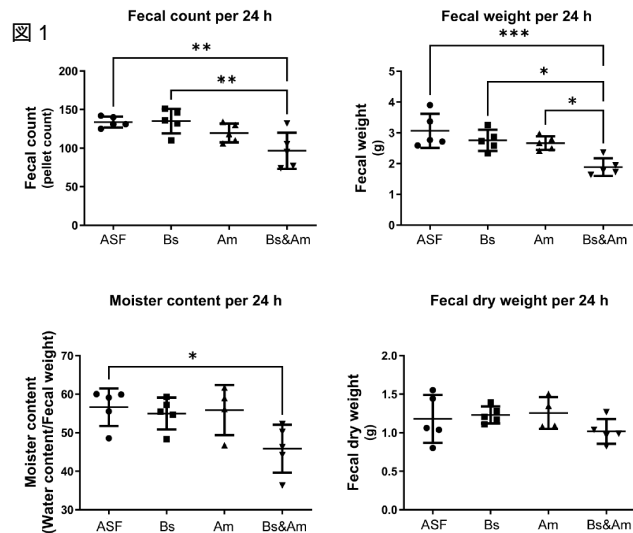
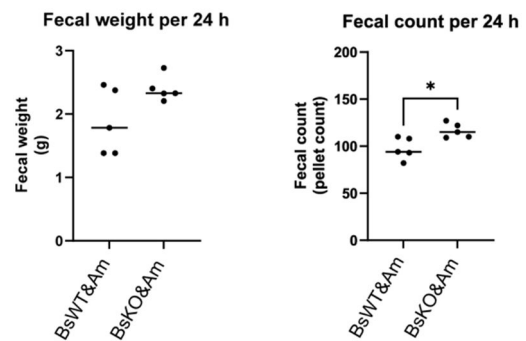
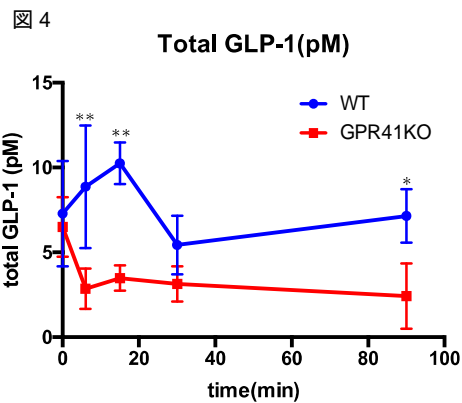


図 3



染色によって脳延髄の GLP-1 発現を確認した(図 5)。これらの結果から GPR41KO によって短鎖脂肪酸による脳 GLP-1 分泌刺激が損なわれ、PD の行動障害を引き起こすことが示唆された。以上より、短鎖脂肪酸は迷走神経の GPR41 を介して、中枢 GLP1 の分泌を行う生理機能が示唆された。そして、その機能が損なわれると PD 症状を増悪させる病態が明らかとなった。

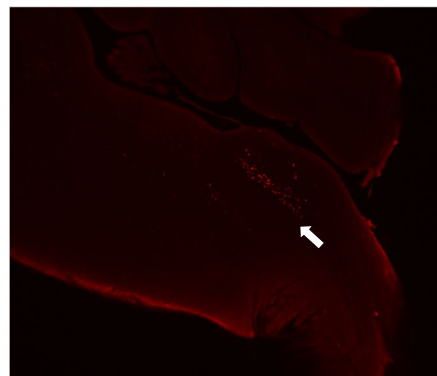
本マウスモデル研究より、腸内細菌が PD の病態に関与していることが明らかとなった。PD 特有の腸内細菌 *A. muciniphila* と *Bacteroides spp.* の共生がムチン貪食を介して便秘症状および腸管透過性を亢進させる。また、PD の便中短鎖脂肪酸の減少は、迷走神経に局在する短鎖脂肪酸受容体 GPR41 を介した中枢 GLP-1 の分泌障害を引き起こし、中枢神経炎症の増悪に関与する可能性が示唆された。本マウスモデル研究から、PD は腸脳相関の破綻に伴う疾患であることを示した。



Error bar : SEM, Two-way ANOVA

\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$

図 5



Preproglucagon neuron (red) resides at nucleus tractus solitarius (NTS).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hirayama Masaaki, Nishiwaki Hiroshi, Hamaguchi Tomonari, Ohno Kinji	4. 巻 9
2. 論文標題 Gastrointestinal disorders in Parkinson's disease and other Lewy body diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 npj Parkinson's Disease	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/s41531-023-00511-2	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 -

1. 著者名 Muraoka Ayako, Suzuki Miho, Hamaguchi Tomonari, Watanabe Shinya, Iijima Kenta, Murofushi Yoshiteru, Shinjo Keiko, Osuka Satoko, Hariyama Yumi, Ito Mikako, Ohno Kinji, Kiyono Tohru, Kyo Satoru, Iwase Akira, Kikkawa Fumitaka, Kajiyama Hiroaki, Kondo Yutaka	4. 巻 15
2. 論文標題 Fusobacterium infection facilitates the development of endometriosis through the phenotypic transition of endometrial fibroblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	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） 10.1126/scitranslmed.add1531	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 -

1. 著者名 Nishiwaki Hiroshi, Ueyama Jun, Kashihara Kenichi, Ito Mikako, Hamaguchi Tomonari, Maeda Tetsuya, Tsuboi Yoshio, Katsuno Masahisa, Hirayama Masaaki, Ohno Kinji	4. 巻 8
2. 論文標題 Gut microbiota in dementia with Lewy bodies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Parkinson's Disease	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/s41531-022-00428-2	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 Nishiwaki Hiroshi, Ito Mikako, Hamaguchi Tomonari, Maeda Tetsuya, Kashihara Kenichi, Tsuboi Yoshio, Ueyama Jun, Yoshida Takumi, Hanada Hiroyuki, Takeuchi Ichiro, Katsuno Masahisa, Hirayama Masaaki, Ohno Kinji	4. 巻 8
2. 論文標題 Short chain fatty acids-producing and mucin-degrading intestinal bacteria predict the progression of early Parkinson's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Parkinson's Disease	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/s41531-022-00328-5	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 Gibo Noriaki, Hamaguchi Tomonari, Miki Yasuo, Yamamura Takeshi, Nakaguro Masato, Ito Mikako, Nakamura Masanao, Kawashima Hiroki, Hirayama Masaaki, Hirooka Yoshiki, Wakabayashi Koichi, Ohno Kinji	4. 巻 31
2. 論文標題 Examination of Abnormal Alpha-synuclein Aggregates in the Enteric Neural Plexus in Patients with Ulcerative Colitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases	6. 最初と最後の頁 290 ~ 300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15403/jgld-4313	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 1件)

1. 発表者名 Tomonari Hamaguchi, Noriaki Gibo, Hiroshi Nishiwaki, Mikako Ito, Masaaki Hirayama, Kinji Ohno
2. 発表標題 PARKINSON'S DISEASE SPECIFIC MICROBIOTA INDUCES CONSTIPATION IN MICE
3. 学会等名 10th International Human Microbiome Consortium (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 浜口知成、宜保憲明、西脇寛、伊藤美佳子、平山正昭、大野欽司
2. 発表標題 腸内細菌は便秘症を誘発する。
3. 学会等名 日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関口恭平、浜口知成、伊藤美佳子、西脇寛、上山純、大野欽司、平山正昭
2. 発表標題 パーキンソン病患者便から単離した4種類の新規候補細菌
3. 学会等名 日本細菌学会総会
4. 発表年 2023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
---------	---------