

長寿医療研究開発費 2019年度 総括研究報告

便移植を用いたアルツハイマー病と腸内環境との影響探索（19-46）

主任研究者 田代 善崇 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部（流動研究員）

研究要旨

日本は、高齢化社会を迎えており、その中において認知症は解決すべき重要な課題である。認知症の原因として、アルツハイマー病（以下AD）は認知症の中でも特に多い疾患であり、本病の疾患進行に関わる機構解明は重要課題である。

糖尿病や肥満といった生活習慣病は、ADの危険因子として報告されているが、この危険因子の原因の一つとして、腸内環境の変動影響の可能性が示唆されており、本研究では、ADおよび肥満・糖尿病モデルを用いて、便移植を行うことで腸内環境の変動影響を探索することを考えた。本年度の結果として、野生型、肥満・糖尿病モデルであるob/ob、ADモデルであるAPP23、肥満・糖尿病合併型ADモデルとしてAPP23; ob/obを同環境で飼育し、これらから糞便を回収し腸内細菌叢解析を行った。本研究の腸内環境の探索結果は、腸内環境とADでの脳内環境の関係を示唆するものであり、今後の検討を行うことで、AD発症や進行影響と危険因子として報告されている環境要因との新たな側面が見出され、また、疾患予防としての腸内環境正常維持を対象とした療法が確立されうる。

主任研究者

田代 善崇 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部（流動研究員）

分担研究者

里 直行 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部（部長）

篠原 充 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部標的治療薬開発室（室長）

## A. 研究目的

日本は、高齢化社会を迎えており、その中において認知症は解決すべき重要な課題である。認知症の原因として、アルツハイマー病（以下 AD）は認知症の中でも特に多い疾患であり、本病の疾患進行に関わる機構解明は重要課題である。

糖尿病や肥満といった生活習慣病は、AD の危険因子として報告されているが、この危険因子の原因の一つとして、腸内環境の変動影響の可能性が示唆されている。これは、腸内環境における研究として、抗生物質を用いた腸内環境の変動によって、A $\beta$  の蓄積が変わったとの報告がある（Minter MR et al., *Scientific Reports*. 6:30028. 2016）ことから、AD と腸内環境の腸脳相関によって引き起こされたものと考えられる。

腸内細菌移植の一つに便移植（FMT : Fecal microbiota transplantation）がある。これは、健常者（ドナー）から得た腸内細菌叢を含む糞便を投与することで、健康状態の腸内環境を復元する手法である。これまでに高脂肪食を負荷したマウスへの正常マウスの便移植によって、体重減少や肝機能および肝臓内免疫制御機構の改善などが報告される（Zhou D et al., *Scientific Reports*. 7 (1) :10174. 2017）など、便移植による腸内環境の変動は、腸に留まらず、別器官への影響も及ぼすことが知られている。微生物における腸内環境と脳内環境の関わりについては、腸内細菌叢の解析によって、うつ病との関連が示唆される（Valles-Colomer M et al., *Nature microbiology*. 4, 623-632. 2019）などより、便移植による腸内環境の正常化は、脳内環境への影響も及ぼすと示唆される。

本研究によって、腸内環境と AD での脳内環境の関係が導き出された場合、AD 発症や進行影響と危険因子として報告されている環境要因との新たな側面が見出され、また、疾患予防としての腸内環境正常維持を対象とした療法が確立されう。

## B. 研究方法

3ヶ月齢 APP23 オスマウスに対して、肥満・糖尿病モデルとして ob/ob マウスから取得した便を便移植（FMT）によって投与することを計画した。サンプルの回収目標として、FMT 施行後 4ヶ月目（7ヶ月齢）の腸内細菌叢解析および脳の回収による A $\beta$  蓄積の変動を解析し、肥満・糖尿病モデルからの FMT による影響を探索する。本年度では、FMT 実行以前に従来環境で、各遺伝子型で腸内細菌の変動が起きているか否かを調査する為に、野生型、肥満・糖尿病モデルである ob/ob、AD モデルである APP23、肥満・糖尿病合併型 AD モデルとして APP23; ob/ob を同環境で飼育し、計画回収と同時期である 7ヶ月齢時に糞便を回収し、次世代シーケンス・アンプリコン解析によって、各遺伝子型のマウスの腸内細菌叢を解析する。

(倫理面への配慮)

すべての基礎研究は、国立研究開発法人国立長寿医療研究センターにて、設置された動物実験倫理委員会および、遺伝子組換え実験安全委員会のもと、組換え DNA および実験動物を用いての実験計画が承認され、関連の講習教育を受け、従事者として認められた後に開始する。

組換え DNA 実験に関しては、平成 16 年 2 月より施行された「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律 (カルタヘナ法)」および平成 30 年 3 月より施行された「バイオセーフティに関するカルタヘナ議定書の責任及び救済に関する名古屋・クアラルンプール補足議定書 (補足議定書)」を遵守し、規定に則った実験計画を作成し研究を行う。

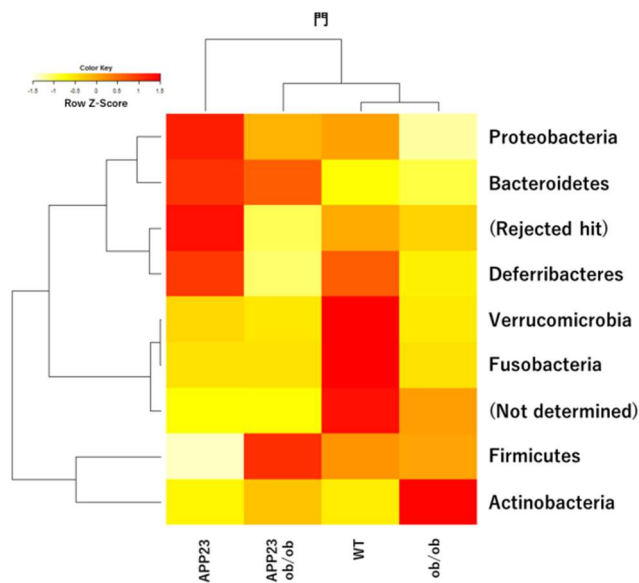
本研究の動物実験は下記の国のガイドライン・法律などを遵守し、実施する。

- ・「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号、最終改正令和元年)
- ・「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年文部科学省告示第 71 号)
- ・「厚生労働省における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知、最終改正平成 27 年)
- ・「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年環境省告示第 88 号、最終改正平成 25 年)
- ・「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(平成 18 年日本学術会議制定)

加えて、国立研究開発法人国立長寿医療研究センター内規程として、「国立研究開発法人国立長寿医療研究センター動物実験取扱規程」(平成 25 年制定)を遵守し、動物実験における倫理的な配慮として、Replacement (代替), Reduction (削減), Refinement (洗練) の 3R を常に意識し、規則に則った実験計画を作成し、加えて、Responsibility (責任), Reliability (信頼性) を持って、計画を実施する。

### C. 研究結果

AD モデルである APP23 マウス、肥満・糖尿病モデルである ob/ob マウス、また糖尿病合併アルツハイマー病モデルマウスの腸内細菌叢の調査の為に、APP23 と ob/ob マウスの交配を行い、WT, APP23, ob/ob, APP23;ob/ob を構築した。7 ヶ月齢時に便回収を行い、腸内細菌叢解析として、生体次世代シーケンスアンプリコン解析を行い、それぞれのマウスより腸内細菌叢の状態を取得し、細菌種の同定を行った。結果として、APP23 では、Proteobacteria, Bacteroidetes, Degerribacteres が多く含まれ、APP23;ob/ob では、Firmicutes, Bacteroidetes が多かった。また ob/ob では、野生型と比べて Firmicutes/Bacteroidetes 比が低値であった (図)。詳細として、APP23 では、planococcaceae, Corynebacteriaceae,などが他遺伝子型と比較し多く存在しており、



APP23; ob/ob では、Streptococcaceae, Muribaulaceae, Enterobacteriaceae, Actinomycetaceae, Caulobacteraceae などが多く、野生型では、Fusobacteriaceae, Akkermansiaceae, ob/ob では Eubacteriaceae, Erysipelotrichaceae, Phyllobacteriaceae などが多く存在していた。APP23 背景共通として、Bacteroidaceae, Lachnospiraceae などが存在し、ob/ob 背景では、leuconostocaceae,

Clostridiaceae, Peptostreptococcaceae などが共通して存在していた。

#### D. 考察と結論

本研究において、同環境飼育下においても、各遺伝子型で異なる腸内細菌叢を持つことが示された。肥満・糖尿病モデルである ob/ob マウスは、腸内細菌叢が変動 (Ley RE et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 102 (31) :11070-5. 2005) することが報告されており、また、今回得られた ob/ob が Firmicutes/Bacteroidetes 比が低値であったことは、肥満者の腸内細菌叢解析の結果 (Schwiertz A et al. Obesity 18 : 190-195. 2010.) と一致し、臨床結果との合致より、本研究に対する臨床応用の可能性を示した。ただし、今回の結果においては、交配より取得した各遺伝子型の n 数の関係にて、解析実行数が不足していたことから、今後の解析によってより有効な腸内細菌解析が可能となると考えられる。本研究で期待される成果は、AD の発症・進行の機序解明および創薬に対する新規経路の探索である。AD へ影響を及ぼす環境要因として肥満・糖尿病があるが、これらが影響を及ぼす経路として、本研究で腸脳相関が示されるのであれば、腸内環境の健常化を図ることで、AD の発症や進行の抑制が可能となる。また、これまでの AD に対する薬剤は、対症的治療であるのに対し、本研究によって、腸内環境の健常化が AD に重要であることを示すことが出来れば、新たな治療・創薬目標として腸内環境の健常化を目指すことが AD の発症や進行の根本的治療の道筋となるのではないかと考える。今回使用した ob/ob マウスにおいては細菌移植を行う事で、ドナーマウスがエネルギー代謝の低下や体脂肪率の増加を示した (Turnbaugh PJ et al., Nature. 444 (7122) :1027-31. 2006) ことから、各疾患の腸内細菌叢が異なること、また便移植などによりこれを変動させることは、治療の道筋となり得る。また、間接的に期待される成果として、現在、便移植は炎症性腸疾患に対し臨床

実施されている術式であるが、臨床においてもドナー側の選定条件は、未だに基準が設けられておらず、便移植による腸内環境変動が疾患治癒以外の部分でどのように影響を及ぼすかは不明のままである。本研究による便解析、また今後の検討としての便移植実施が治癒対象以外の疾患に影響を及ぼすことが示されるのであれば、便移植ドナー選定において、より厳格な基準の設定が必要であることを示すこととなり、本検討の結果は、腸脳相関のみならず、腸とそれ以外の器官への影響示唆を考えるうえで重要な可能性を示したと言える。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Shinohara M, Tashiro Y, Shinohara M, Hirokawa J, Suzuki K, Onishi-Takeya M, Mukouzono M, Takeda S, Saito T, Fukumori A, Saido T, C, Morishita R, Sato N. Increased levels of A $\beta$  42 decrease the lifespan of ob/ob mice with dysregulation of microglia and astrocytes. The FASEB Journal, 2020 Feb;34(2):2425-2435.

2) Shinohara M, Tashiro Y, Suzuki K, Fukumori A, Bu G, Sato N. Interaction between APOE genotype and diabetes in cognitive decline. Alzheimers Dement, 2020 Feb 6;12(1):e12006.

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし