

(様式5)

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

脳虚血病巣と腸管機能および腸内細菌叢の連関における エクソソームの関与の検討

研究代表者 西山 康裕¹⁾

研究分担者 若林 あや子²⁾、五十嵐 博中³⁾

1) 日本医科大学大学院 脳神経内科学 2) 日本医科大学大学院微生物免疫学
3) 新潟大学脳研究所

研究要旨

脳卒中は神経系のみならず消化器系の合併症を引き起こし、患者の半数以上が便秘、便失禁、消化管出血などを呈するが、そのメカニズムの詳細は不明である。コントロール群と比べて脳卒中患者は4-5倍排便困難症に罹患しやすく、また、約30-60%と高頻度で起こることが知られているが、このメカニズムの一つとして脳卒中後の腸内細菌叢の変化が関与すると考えられている。我々は改良 Tamura 法で distal MCA に直接電気凝固を施し、結紮を行う脳梗塞モデルマウスを用いて、脳梗塞病変部位組織および盲腸組織の RNA シーケンシング (RNA-seq) により発現変動遺伝子を網羅的に解析し、炎症誘導などに関わる遺伝子発現変動を解析すると共に、脳梗塞マウスでは盲腸の機能変化に伴い腸内細菌叢が変化する可能性があるため、盲腸内容物の 16S rRNA メタゲノム解析により腸内細菌叢の変化も調べる。

A. 研究目的

脳梗塞病変部位においては細胞死に伴い、マクロファージや好中球を活性化に導く様々なダメージ関連分子パターン(DAMPs)が放出される。こうした DAMPs は遺伝子の発現を制御する miRNA と共に放出され (M Fleshner et al. Trends Immunol 38,2017)、miRNA を含有するエクソソームは脳血管関門を通過して脳神経系と末梢組織のメッセンジャーとして働くと考えられている (S Saeedi et al. Translational Psychiatry 9, 2019)。しかし、脳梗塞病変由来のエクソソーム内 miRNA が腸管組織に与える影響については不明である。そこで我々は脳梗塞マウスにおける脳梗塞病変部位と盲腸組織の発現変動遺伝子および血中エクソソーム中 miRNA を網羅的に解析し、脳梗塞由来エクソソームが腸管機能に与える影響を検討する。脳梗塞予後不良患者の腸内細菌由来の血中小胞内微生物叢は、健常者の微生物叢と異なり、腸内細菌叢は脳梗塞の予後に影響を与えることも示

されており (Y Chang et al. Sci Reports 11,2021)、脳梗塞病変と腸管組織・腸内細菌叢は互いに相関する可能性がある。

本研究では、脳梗塞病変部由来のエクソソーム中 miRNA が盲腸組織や腸内細菌叢に与える影響を明らかにし、脳梗塞時の消化器系合併症のメカニズムを解明することを目的とする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

- ① 脳梗塞処置または偽処置を行い2週間後の C. B-17 マウスの盲腸を摘出し、RNA later で処理した盲腸組織より RNA を抽出、ライブラリー調整、シーケンシングを行い、2 群間の発現変動遺伝子について網羅的に解析する。(脳梗塞処置 n=16, 偽処置 n=16)
- ② 同上マウスの脳 (梗塞側大脳半球) を摘出、RNA later で処理した組織より RNA を抽出、ライブラリー調整、シーケンシングを行い、発現変動遺伝子解析する。

③ 同上マウスの血清を採取し、血清を超遠心分離することにより得られるエクソソーム中の miRNA をシーケンシングし、2群間で比較解析する。

C. 研究結果

1) 脳梗塞マウス病変部位および盲腸における遺伝子発現の主成分分析

脳梗塞マウスの脳病変部ではコントロールマウスの脳に比べて遺伝子発現が大きく異なっていた。脳梗塞マウスの盲腸の遺伝子発現もコントロールと異なる傾向がみられた。

2) 脳梗塞病変部位における遺伝子発現増加

CI vs Sham 発現変動遺伝子プロットを調べたのちに、DAVID ソフトを用いて発現増加遺伝子の遺伝子オントロジー (GO) エンリッチメント解析を行ったところ、脳梗塞病変部では免疫プロセス、炎症反応、自然免疫反応、TNF・IFN- β ・IL-6 産生などに関わる遺伝子の発現が増加した。また、Casp4, Gasdmd, Nlgn1 など炎症性細胞死に関わる遺伝子の発現が増加していた。脳梗塞病変部では炎症性細胞死が起こっていることが推測される。

3) 脳梗塞病変部位における遺伝子発現低下

同様に、発現低下遺伝子の GO エンリッチメント解析を行ったところ、脳梗塞病変部では骨格筋細胞やニューロンの分化、有機物質に対する細胞の反応などに関わる遺伝子の発現が低下した。

4) 脳梗塞マウスの盲腸における遺伝子発現増加

脳梗塞病変部位と同様に、盲腸部位においても CI vs Sham 発現変動遺伝子プロットを調べたのちに、DAVID ソフトを用いて発現増加遺伝子の遺伝子オントロジー (GO) エンリッチメント解析を行ったところ、脳梗塞マウスの盲腸では、免疫グロブリンによる免疫反応、B 細胞活性化、ファゴサイトーシスなどに関わる遺伝子の発現が増加した。

5) 脳梗塞マウスの盲腸における遺伝子発現低下

同様に、発現低下遺伝子の GO エンリッチメント解析を行ったところ、脳梗塞マウスの盲腸では、骨格系発達、免疫グロブリンによる免疫反応、B 細胞活性化、ファゴサイトーシスなどに関わる遺伝子の発現の低下も見られた。

6) 脳梗塞病変部位における炎症性細胞死 (pyroptosis) に関わる遺伝子発現増加

脳梗塞病変部では Gasdmd, Nlgn1 など炎症性細胞死に関わる遺伝子の発現が増加した。

7) 脳梗塞マウスの盲腸における免疫グロブリン重鎖産生に関わる遺伝子発現増加

脳梗塞マウスの盲腸では Ighv9-3 など免疫グロブリン重鎖産生に関わる遺伝子の発現が増加した

今後、脳梗塞マウスの盲腸における遺伝子発現増加・低下の具体的な遺伝子の解析、および免疫細胞データベースなどを用いたさらなる遺伝子発現応用解析や病変部位の炎症性細胞死解析、血中サイトカイン測定など予定している。

D. 考察

脳研究所五十嵐博中教授と随時議論しながら、実験を進めて行くこととしている。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

- 2023 年 第 72 回日本アレルギー学会学術集会 (2023 年 10 月 20 日~22 日、東京) Wakabayashi A, Nishiyama Y, et al. An aluminum-containing food additive causes pyroptosis and IL-18 production in intestinal epithelial cells under antibiotic treatment.
- World Allergy Congress 2023. (12/1-3/2023, Bangkok, Thailand) Wakabayashi A, Nishiyama Y, et al. An aluminum-containing food additive causes cleavage of IL-33 and gasdermin D in intestinal epithelial cells under antibiotic-treatment.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 特許取得
なし
- 実用新案登録
なし
- その他
なし