

学位論文の要旨

Abstract of Thesis

研究科 School	環境生命科学
専攻 Division	農生命科学
学生番号 Student No.	77428906
氏名 Name	藤井 祐介

学位論文題目 Title of Thesis (学位論文題目が英語の場合は和訳を付記)

アルツハイマー型認知症患者の腸内細菌叢によるヒト型モデルマウスの構築と
この構築マウスの認知行動に腸内環境が及ぼす影響
ー腸内細菌叢解析およびメタボローム解析による評価ー

学位論文の要旨 Abstract of Thesis

後期高齢者の慢性疾患の中で、高齢になるほどその有病率が増加するのが認知症であり、その60%以上を占めるのがアルツハイマー型認知症（アルツハイマー病：AD）である。ADは進行性の神経変性疾患で、世界で最も罹患患者数の多い神経疾患として知られているが、その有効な治療法は確立されていない。AD発症の原因としては、遺伝、生活習慣、食事、その他の疾病など数多くの報告がされているが、その詳細は未解明な点が多く、明らかな原因解明には至っていない。一方、ヒトの免疫細胞の7割以上が集まっている腸管は、宿主の健康維持や生体防御系に重要な役割を担っているだけでなく、脳と“脳腸相関（脳-腸-細菌叢相関）”といわれるネットワークが提唱されている。また、腸内細菌叢は宿主の行動や疾病に影響する知見が多く報告されていることから、AD患者の腸内細菌叢はADに何らかの兆候や影響を及ぼすのではないかと考えた。本研究では、AD患者の腸内細菌叢によるヒト型モデルマウスを構築し、そのAD患者の腸内細菌叢がマウス認知行動に及ぼす影響について検討した。

健常高齢者（14名）およびAD患者（13名）の糞便を採取し、そこから細菌DNAを溶菌酵素法により抽出・精製してMiSeq（Illumina社）を用いてシーケンスを行った。得られたシーケンスデータをもとにQIIME（Ver. 1.9.1）を用いたUniFrac解析により腸内細菌叢を比較した。その結果、 α 多様性（PD whole tree）により、AD病患者は健常高齢者と比較してその多様性が有意に高かった。また、 β 多様性を用いた主座標分析（PCoA）により、健常高齢者とAD患者の両群では腸内細菌叢が有意に異なっていた。その中からそれぞれの群の特徴を反映しておりかつ主座標分析から腸内細菌叢が異なっている健常高齢者とAD患者の糞便を選抜した。選抜したヒト糞便（腸内細菌叢）を、嫌気状態を保持しながら4週齢の無菌マウスにそれぞれ経口投与し腸内細菌叢を移植した。ヒト糞便を投与してから2週間後にマウスの糞便を採取し、腸内細菌叢の定着を確認した。さらに、マウスが10週齢に達した時点で5週間ごとに糞便の採取および、マウスの認知機能を確認するため認知行動試験を行った。

ヒト糞便と同様にマウス糞便から細菌DNAを抽出・精製し、網羅的に腸内細菌叢を確認したところ、マウスの腸内細菌叢は、 α 多様性（Shannon Index）による多様性高さ、および β 多様性によるPCoA解析結果から、マウスの腸内細菌叢はクラスターを形成していたという点において投与したヒト腸内細菌叢をよく反映していた。さらに、その腸内細菌叢は70週齢の時点でも維持されていた。このことからAD患者の腸内細菌叢によるヒト型モデルマウスが構築されていると考えられた。

AD患者の腸内細菌叢がマウス認知行動に及ぼす影響を明らかにするために、それぞれの腸内細菌叢を移植したマウスに対して2つの認知行動試験を実施した。位置認識試験は、ケージ内に置かれた物体

の位置情報を周囲の空間情報と合わせて記憶することから、空間記憶を評価する方法と考えられている。一方、物体認識試験はケージ内に置かれた物体の形状や色に対する記憶を評価する試験で、周囲の空間情報に影響を受けないことから、非空間記憶を示している。健常者の腸内細菌叢を移植したマウス群（HC 群）は、経時的な解析において試験終了の 75 週齢までに認知機能の低下が認められなかったのに対し、AD 患者の腸内細菌叢を定着させたマウス群（AD 群）では、若い時期（10 週齢）と比較して 70 週齢（位置認識試験および物体認識試験）と 75 週齢（位置認識試験）で、認知機能の低下がみられた。さらに、健常者の腸内細菌叢を移植したマウスと比較して、位置認識試験では 55 と 70 週齢で、物体認識試験では、55、60、65、70 週齢で有意な認知機能の低下が確認された。

これらの認知機能低下と腸内細菌叢の関係を明らかにするために、採取した糞便および血清のメタボローム解析を実施した。採取した糞便から水溶性画分と脂溶性画分を抽出し、CE-TOFMS および LC-TOFMS を用いて解析したところ、それぞれ 322 (218 cation 104 anion) および 195 (98 positive 97 negative) 代謝産物が検出された。検出されたそれぞれのマウスの代謝産物を主成分分析（PCA）で解析したところ、両群の代謝産物は明らかに異なっており、腸内細菌叢の違いに起因すると推察された。その中で、健常高齢者の腸内細菌叢を定着させたマウス対象群と AD 群の間で有意に異なっていた糞便中の代謝産物の中には、中枢神経系機能に関与が報告されている GABA や神経伝達物質であるセロトニンの前駆物質として知られている tryptophan、アルツハイマーモデルマウスに経口投与することで認知機能の改善が報告されている taurine、記憶および認知機能に関与する valine、tyrosine、propionic acid などがあった。

一方、血清中の代謝産物は、CE-TOFMS を用いて解析を行った。HC 群と AD 群を比較した結果、250 (128 cation 122 anion) の代謝産物が検出され、GABA 合成に関与することが知られている putrescine および神経伝達物質として知られている acetylcholine の前駆物質である betaine と choline が AD 群において有意な低値を示した。上記のメタボローム解析の結果から、HC 群に比べ、AD 群で中枢神経系への関与や神経伝達物質の前駆物質で有意な低値が認められたことから、これらの代謝物質がマウスの認知機能低下への影響が推察された。

マウスが 75 週齢に達した時点で剖検により脳および肝臓サンプルを採取した。それぞれの臓器へのアミロイド蓄積を確認するために Congored 染色を実施した。その結果、脳組織ではアミロイド蓄積に差が認められなかった一方で、肝臓においては AD 群で血管の周囲にアミロイドの蓄積が増加していた。この結果から AD 患者の腸内細菌叢の影響により肝臓へのアミロイドの蓄積が促進されていることが示唆された。

以上の結果から、本研究では腸内細菌叢によるヒト型モデルマウスの構築に成功し、AD 患者の腸内細菌叢は腸内で生成される代謝産物および体内に吸収される物質を変化させており、認知機能低下を誘発する可能性が推察された。さらに、肝臓におけるアミロイド蓄積を促進させたことから、腸内細菌叢は AD の発症に深くかかわっていることが示唆された。