

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation
- 研究開発課題名： (日本語) パーキンソン病の起因となる腸管 α -synuclein 異常蓄積に対する腸内細菌叢の関与の解明
(英語) Intestinal microbiota in association with abnormal aggregation of intestinal alpha-synuclein causing Parkinson's disease
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学 教授 大野 欽司
所属 役職 氏名： (英語) Division of Neurogenetics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Professor, Kinji Ohno
- 実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) パーキンソン病(PD)とレビー小体型認知症(DLB)の腸内細菌叢の横断解析・縦断解析、ならびに、単培養細菌の代謝解析
開発課題名： (英語) Cross-sectional and longitudinal analyses of intestinal microbiota in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies, and metabolomic analyses of individual intestinal bacteria
- 研究開発分担者 (日本語) 大野 欽司 (国立大学法人名古屋大学・教授)
所属 役職 氏名： (英語) Kinji Ohno, Professor, Division of Neurogenetics, Nagoya University Graduate School of Medicine

II. 成果の概要（総括研究報告）

【和文】

1. PD と DLB の腸内細菌叢のメタゲノム・16S rDNA による横断解析

研究代表者、共同研究者の各施設において生命倫理委員会承認を得た。糞便サンプルの自宅から名古屋大学への冷蔵状態での輸送方法を確立した。Freeze dry サンプルから DNA 抽出方法を確立し、高い α diversity を得られることを確認した。PD 67 名、健常同居者 30 名の糞便サンプルを取得した。名古屋大学医学系研究科に設置した HiSeq 2500 を用いてショットガンメタゲノム解析を開始した。メタゲノム解析は、Mocat2 pipeline に従い、samtools による trimming、SOAPaligner によるヒトゲノム除去、BWA による mOTU.v1 database と RefMG database への mapping・annotation 解析のセットアップを行った。Mocat2 pipeline の *de novo* assembly のセットアップを行った。

2. PD と DLB の臨床症状・補助検査所見・腸内細菌叢の縦断解析

本研究期間を通して経時的に取得を行う MDS-UPDRS score (PD 重症度スコア)・他の臨床所見・血中バイオマーカー・尿中バイオマーカーを決定した。本研究チームが 2 年前に YIF-SCAN 法により腸内細菌叢解析を行った PD 52 名のデータを用いて 2 年後の臨床所見・血中バイオマーカー・尿中バイオマーカーの予測モデルを作成し、PD 悪化に関与する細菌群の解析を行った(*submitted*)。

3. 腸内細菌の PD のバイオマーカーへの関与の解明

糞便中有機酸（短鎖脂肪酸）は一部のサンプルの外注を行ったが、短鎖脂肪酸を検出不可能なサンプルが多く、研究グループが所有する LC-MS を用いた解析系を立ち上げた。

4. PD に特異的な細菌の PD モデルマウスへの投与

Engrailed 欠損 PD モデルマウスと α -synuclein 過剰発現 PD モデルマウスの実験環境のセットアップを行った。

5. PD に特異的な腸内細菌水素産生能の定量

我々は PD 腸内細菌叢の解析により腸内水素産生菌数が低いことを予想したが(*PLoS One* 10: e0142164, 2015)、どの腸内細菌がどの程度の効率で水素産生するか未解明であり、PD 特異的に変化する腸内細菌の単培養により水素産生能の定量を行った。100%窒素ガスを充填した液体培地で嫌気性培養を行い、細菌数を濁度計、細菌計算盤でカウントし、ガスクロマトグラフィー (EAG analyzer GS-23) により水素濃度を定量した。その結果、PD で減少する *Clostridium coccoides* と *Clostridium leptum* が最も効率良く水素を産生することを明らかにした。腸内水素ガス産生のシミュレーションにより PD では健常同居者に比べて 1.5 倍腸内水素産生が低いことが予測された(*submitted*)。

[英文]

1. Cross-sectional analyses of intestinal microbiota by shotgun metagenome studies and 16S rDNA studies in PD and DLB

Our research project has been approved by the institutional review boards of the four attending institutes. We established a method to deliver chilled fecal samples from patients' homes to Nagoya University. We also established a method to isolated DNA from freeze-dried fecal samples, and confirmed that alpha diversity values were sufficiently high. We obtained fecal samples from 67 PD patients and 30 healthy cohabitants. We started shotgun metagenome analysis with HiSeq 2500 running in Nagoya University. For shotgun metagenome analysis, according to the Mocat2 pipeline, we trimmed fastq files with samtools, eliminated human genome sequences with SAOPaligner, mapped reads to mOTU.v1 database and RefMG database with BWA, and performed annotation analysis. We have also set up *de novo* assembly of fastq reads according to the Mocat2 pipeline.

2. Longitudinal analyses of clinical features, laboratory data, and intestinal microbiota in PD and DLB

We have determined MDS-UPDRS score to estimated PD severity, clinical findings, and serum/urine biomarkers to be traced throughout our research period. We analyzed progression of clinical features of 52 PD patients in 2 years, for which we analyzed intestinal microbiota two years ago by the YIF-SCAN method, and identified a group of bacteria that are associated with rapid worsening of PD symptoms in 2 years (*submitted*).

3. Association of metabolome of intestinal microbiota and PD biomarkers

We analyzed fecal organic acids (short chain fatty acids, SCFAs) by outsourcing, but SCFAs were not detected in a large number of samples. We thus established an assay system for SCFAs using LC-MS running in Nagoya University.

4. Effect of PD-specific intestinal bacterium on mouse models for PD

We have set up experimental systems for PD mouse models that either lacks the *engrailed* gene or overexpresses alpha-synuclein.

5. Quantification of hydrogen production by intestinal bacteria that are unique to PD

We previously predicted that the number of hydrogen-producing bacteria in the intestine is low in PD (*PLoS One* 10: e0142164, 2015). However, the amount of hydrogen produced by each bacterium that is changed in PD, remains undetermined. We thus quantified the amount of hydrogen produced by each intestinal bacterium that was changed in PD. Seven bacteria were anaerobically cultured in liquid medium under 100% nitrogen gas, and the number of bacteria was counted and the produced hydrogen was quantified by gas chromatography, EAG analyzer GS-23. We found that *Clostridium coccooides* and *Clostridium leptum*, which were reduced in PD intestines, efficiently yielded hydrogen. Simulation of intestinal hydrogen production according to the number of intestinal bacteria in PD and the amount of hydrogen production by each bacterium revealed that the hydrogen production in PD is 1.5-times lower compared to healthy cohabitants (*submitted*).

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 4件、国際誌 12件)

【研究開発代表者 大野 欽司】

1. Imai K, Kotani T, Tsuda H, Mano Y, Nakano T, Ushida T, Li H, Miki R, Sumigama S, Iwase A, Hirakawa A, Ohno K, Toyokuni S, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A, Kikkawa F. Neuroprotective potential of molecular hydrogen against perinatal brain injury via suppression of activated microglia. *Free Radic Biol Med* 2016, 91: 154-163.
2. Hirayama M, Tsunoda M, Yamamoto M, Tsuda T, Ohno K. Serum tyrosine-to-phenylalanine ratio is low in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2016, 6: 423-431.
3. Muramatsu Y, Ito M, Oshima T, Kojima S, Ohno K. Hydrogen-rich water ameliorates bronchopulmonary dysplasia (BPD) in newborn rats. *Pediatr Pulmonol* 2016, 51: 928-935.
4. Lin Y, Ohkawara B, Ito M, Misawa N, Miyamoto K, Takegami Y, Masuda A, Toyokuni S, Ohno K. Molecular hydrogen suppresses activated Wnt/beta-catenin signaling. *Sci Rep* 2016, 6: 31986.
5. Hasegawa S, Ito M, Fukami M, Hashimoto M, Hirayama M, Ohno K. Molecular hydrogen alleviates motor deficits and muscle degeneration in mdx mice. *Redox Rep* 2017, 22: 26-34.
6. Ushida T, Kotani T, Tsuda H, Imai K, Nakano T, Hirako S, Ito Y, Li H, Mano Y, Wang J, Miki R, Yamamoto E, Iwase A, Bando YK, Hirayama M, Ohno K, Toyokuni S, Kikkawa F. Molecular hydrogen ameliorates several characteristics of preeclampsia in the Reduced Uterine Perfusion Pressure (RUPP) rat model. *Free Radic Biol Med* 2016, 101: 524-533.

【研究開発分担者 柏原 健一】

1. Kashihara K, Nomura T, Maeda T, Tsuboi Y, Mishima T, Takigawa H, Nakashima K. Beneficial Effects of Ramelteon on Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder Associated with Parkinson's Disease - Results of a Multicenter Open Trial. *Intern Med.* 2016;55:231-6.
2. 柏原健一. パーキンソン病における認知障害の早期診断法. *Dementia Japan*, 2016;30:213-222.
3. 柏原健一、北山通朗、濱口敏和. ダットスキャン早期像の臨床的意義—5 症例の検討. *運動障害*. 2016;26:27-32.
4. 柏原健一、濱口敏和、北村通朗. チェックリストを用いた Parkinson 病患者の症状把握. *神経内科*. 2016;84:88-93.
5. 柏原健一. パーキンソン病診断における自律神経症状の意義. *自律神経*. 2016;53:111-119.

【研究開発分担者 前田 哲也】

1. Kubo S, Hamada S, Maeda T, Uchiyama T, Hashimoto M, Nomoto N, Kano O, Takahashi T, Terashi H, Takahashi T, Hatano T, Hasegawa T, Baba Y, Sengoku R, Watanabe H, Kadowaki T, Inoue M, Kaneko S, Shimura H, Nagayama H. A Japanese multicenter survey characterizing pain in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2016;365:162-6
2. Yoritaka A, Abe T, Ohtsuka C, Maeda T, Hirayama M, Watanabe H, Saiki H, Oyama G, Fukae J, Shimo Y, Hatano T, Kawajiri S, Okuma Y, Machida Y, Miwa H, Suzuki C, Kazama A, Tomiyama M, Kihara T, Hirasawa M, Shimura H, Hattori N. A randomized double-blind multi-center trial of hydrogen water for Parkinson's disease: protocol and baseline characteristics. *BMC Neurol* 2016;16:66

【研究開発分担者 坪井 義夫】

該当無し

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

【研究開発代表者 大野 欽司】

1. パーキンソン病の起因となる腸管 α -synuclein 異常蓄積に腸内細菌叢は関与するか, 口頭, 大野 欽司, 第 51 回糖尿病学の進歩 シンポジウム「代謝異常と腸内細菌」, 京都, 2017/2/17-18, 国内.

【研究開発分担者 柏原 健一】

1. Pharmacology of dopa-induced dyskinesia, 口頭, Kashihara K, 高松, 第 15 回記念高松国際パーキンソン病シンポジウム, 2016/2/5, 国内.
2. パーキンソン症候群の鑑別における画像検査 「ドパミントランスポーターシンチの有用性と限界」, 口頭, 柏原健一, 神戸, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016,5,18, 国内.
3. When and why patients with Parkinson's disease become bed ridden? When and why patients with Parkinson's disease become bed ridden?, ポスター, Kashihara K, ベルリン, 20th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, 2016/6/19, 国外.
4. Effects of open class for patients with Parkinson's disease and their care givers, ポスター, Kashihara K, ポートランド, 4th World Parkinson Congress, 2016/9/20, 国外.
5. パーキンソン病患者の脳血管障害. ポスター, 柏原健一, 京都, 第 10 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres, 2016/10/6, 国内.
6. イストラデフィリンの使用経験, ポスター, 柏原健一, 米子, 第 34 回日本神経治療学会総会, 2016/11/3, 国内.
7. パーキンソン病進行期の運動症状治療を再考する一薬物療法. 口頭, 柏原健一, 米子, 第 34 回日本神経治療学会総会, 2016/11/3, 国内.
8. パーキンソン病患者の行動障害. 口頭, 柏原健一, 米子, 第 34 回日本神経治療学会総会, 2016/11/3, 国内.

【研究開発分担者 前田 哲也】

1. パーキンソン病患者と自動車運転, 口頭, 前田哲也, 第 34 回日本神経治療学会 シンポジウム 2 「自動車運転」, 米子市, 2016/10/6-8, 国内.
2. “Clinical benefits and optimal dosage of Istradefylline in Parkinson's disease”, Tetsuya Maeda, Kenichi Kashihara, Masaaki Hirayama, The 13th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and Related Neurological Disorders, Poster, March 29 - April 2, 2017, Vienna, Austria, 国外.

【研究開発分担者 坪井 義夫】

該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation
- 研究開発課題名： (日本語) パーキンソン病の起因となる腸管 α -synuclein 異常蓄積に対する腸内細菌叢の関与の解明
(英語) Intestinal microbiota in association with abnormal aggregation of intestinal alpha-synuclein causing Parkinson's disease
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学 大学院医学系研究科神経遺伝情報学分野
教授 大野 欽司
- 所属 役職 氏名： (英語) Division of Neurogenetics, Nagoya University Graduate School of
Medicine, Professor, Kinji Ohno
- 実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 山陽地方における PD・DLB・同居健常者の腸内細菌叢の解明と PD 関連
バイオマーカー解析
- 開発課題名： (英語) Intestinal microbiota and Parkinson's disease-related biomarkers in
Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and healthy
cohabitants in the Sanyo area
- 研究開発分担者 (日本語) 柏原 健一 (一般財団法人操風会 岡山旭東病院診療部・神経内科部長)
- 所属 役職 氏名： (英語) Kenichi Kashihara, Director, Department of Neurology, Okayama Kyokuto
Hospital

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者： 国立大学法人名古屋大学・大学院医学系研究科神経遺伝情報学分野・大野 欽司
司 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 4 件、国際誌 1 件）

1. Kashihara K, Nomura T, Maeda T, Tsuboi Y, Mishima T, Takigawa H, Nakashima K. Beneficial Effects of Ramelteon on Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder Associated with Parkinson's Disease - Results of a Multicenter Open Trial. *Intern Med*. 2016;55:231-6.
2. 柏原健一. パーキンソン病における認知障害の早期診断法. *Dementia Japan*, 2016;30:213-222.
3. 柏原健一、北山通朗、濱口敏和. ダットスキャン早期像の臨床的意義—5 症例の検討. *運動障害*. 2016;26:27-32.
4. 柏原健一、濱口敏和、北村通朗. チェックリストを用いた Parkinson 病患者の症状把握. *神経内科*. 2016;84:88-93.
5. 柏原健一. パーキンソン病診断における自律神経症状の意義. *自律神経*. 2016;53:111-119.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Pharmacology of dopa-induced dyskinesia, 口頭, Kashihara K, 高松, 第 15 回記念高松国際パーキンソン病シンポジウム, 2016/2/5, 国内.
2. パーキンソン症候群の鑑別における画像検査 「ドパミントランスポーターシンチの有用性と限界」, 口頭, 柏原健一, 神戸, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016,5,18, 国内.
3. When and why patients with Parkinson's disease become bed ridden? When and why patients with Parkinson's disease become bed ridden?, ポスター, Kashihara K, ベルリン, 20th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, 2016/6/19, 国外.
4. Effects of open class for patients with Parkinson's disease and their care givers, ポスター, Kashihara K, ポートランド, 4th World Parkinson Congress, 2016/9/20, 国外.
5. パーキンソン病患者の脳血管障害. ポスター, 柏原健一, 京都, 第 10 回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS, 2016/10/6, 国内.
6. イストラデフィリンの使用経験, ポスター, 柏原健一, 米子, 第 34 回日本神経治療学会総会, 2016/11/3, 国内.
7. パーキンソン病進行期の運動症状治療を再考する—薬物療法. 口頭, 柏原健一, 米子, 第 34 回日本神経治療学会総会, 2016/11/3, 国内.
8. パーキンソン病患者の行動障害. 口頭, 柏原健一, 米子, 第 34 回日本神経治療学会総会, 2016/11/3, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation
- 研究開発課題名： (日本語) パーキンソン病の起因となる腸管 α -synuclein 異常蓄積に対する腸内細菌叢の関与の解明
(英語) Intestinal microbiota in association with abnormal aggregation of intestinal alpha-synuclein causing Parkinson's disease
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学 大学院医学系研究科神経遺伝情報学分野
教授 大野 欽司
- 所属 役職 氏名： (英語) Division of Neurogenetics, Nagoya University Graduate School of
Medicine, Professor, Kinji Ohno
- 実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) パーキンソン病 (PD) における腸内細菌叢変動と運動合併症発生メカニ
ズムに関する検討
- 開発課題名： (英語) Analyses of changes in intestinal microbiota and mechanisms causing
motor complications in Parkinson's disease
- 研究開発分担者 (日本語) 前田 哲也 (学校法人岩手医科大学 岩手医科大学医学部・内科学講座・
特任准教授)
- 所属 役職 氏名： (英語) Tetsuya Maeda, Designated Associated Professor, Department of Internal
Medicine, Iwate Medical University

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者： 国立大学法人名古屋大学・大学院医学系研究科神経遺伝情報学分野・大野 欽司 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

1. Kubo S, Hamada S, Maeda T, Uchiyama T, Hashimoto M, Nomoto N, Kano O, Takahashi T, Terashi H, Takahashi T, Hatano T, Hasegawa T, Baba Y, Sengoku R, Watanabe H, Kadowaki T, Inoue M, Kaneko S, Shimura H, Nagayama H. A Japanese multicenter survey characterizing pain in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2016;365:162-6
2. Yoritaka A, Abe T, Ohtsuka C, Maeda T, Hirayama M, Watanabe H, Saiki H, Oyama G, Fukae J, Shimo Y, Hatano T, Kawajiri S, Okuma Y, Machida Y, Miwa H, Suzuki C, Kazama A, Tomiyama M, Kihara T, Hirasawa M, Shimura H, Hattori N. A randomized double-blind multi-center trial of hydrogen water for Parkinson's disease: protocol and baseline characteristics. *BMC Neurol* 2016;16:66

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. パーキンソン病患者と自動車運転, 口頭, 前田哲也, 第 34 回日本神経治療学会 シンポジウム 2 「自動車運転」, 米子市, 2016/10/6-8, 国内.
2. “Clinical benefits and optimal dosage of Istradefylline in Parkinson's disease”, Tetsuya Maeda, Kenichi Kashihara, Masaaki Hirayama, The 13th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and Related Neurological Disorders, Poster, March 29 - April 2, 2017, Vienna, Austria, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation
- 研究開発課題名： (日本語) パーキンソン病の起因となる腸管 α -synuclein 異常蓄積に対する腸内細菌叢の関与の解明
(英語) Intestinal microbiota in association with abnormal aggregation of intestinal alpha-synuclein causing Parkinson's disease
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学 大学院医学系研究科神経遺伝情報学分野
教授 大野 欽司
- 所属 役職 氏名： (英語) Division of Neurogenetics, Nagoya University Graduate School of
Medicine, Professor, Kinji Ohno
- 実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 九州地方におけるパーキンソン病 (PD)・Lewy 小体型認知症 (DLB)・同居
居健常者の腸内細菌叢の解明と PD 関連バイオマーカー解析
- 開発課題名： (英語) Intestinal microbiota and Parkinson's disease-related biomarkers in
Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and healthy
cohabitants in the Kyushu area
- 研究開発分担者 (日本語) 坪井 義夫 (学校法人福岡大学 福岡大学医学部・神経内科学・教授)
- 所属 役職 氏名： (英語) Yoshio Tsuboi, Professor, Department of Neurology, Fukuoka University
School of Medicine

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者： 国立大学法人名古屋大学・大学院医学系研究科神経遺伝情報学分野・大野 欽司
司 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 3 件）

1. Umemoto G, Fujioka S, Yanamoto S, Fukae J, Tsuboi Y. A case of sudden deterioration in Parkinson disease. *Neurology*. 2016 Sep 27;87(13):1422.
2. Onozawa R, Tsugawa J, Tsuboi Y, Fukae J, Mishima T, Fujioka S. The impact of early morning off in Parkinson's disease on patient quality of life and caregiver burden. *J Neurol Sci*. 2016 May 15;364:1-5.
3. Miyake Y, Tanaka K, Fukushima W, Kiyohara C, Sasaki S, **Tsuboi Y**, Oeda T, Shimada H, Kawamura N, Sakae N, Fukuyama H, Hirota Y, Nagai M, Nakamura Y; Fukuoka Kinki Parkinson's Disease Study Group.. PARK16 polymorphisms, interaction with smoking, and sporadic Parkinson's disease in Japan. *J Neurol Sci*. 2016 Mar 15;362:47-52.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし