

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15734

研究課題名(和文)腸内細菌が産生する酪酸による関節リウマチ抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Microbiota-derived butyrate limits the autoimmune response by promoting the differentiation of follicular regulatory T cells

研究代表者

高橋 大輔 (Takahashi, Daisuke)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・助教

研究者番号：40612130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、発症初期の未治療の関節リウマチ患者の腸管内において、腸内細菌が食物繊維を資化して産生する短鎖脂肪酸の1つである酪酸が顕著に低いことを明らかにした。さらに、酪酸がマウスの自己免疫性関節リウマチモデルの発症を抑制することを見出した。酪酸は、濾胞制御性T細胞数を増加させ、関節炎の発症に必要な自己抗体の産生を抑制していた。さらに、新規に濾胞制御性T細胞培養系を開発し、酪酸による濾胞制御性T細胞の分化誘導メカニズムを検証した。その結果、酪酸はそのヒストン脱アセチル化酵素阻害作用を介して、分化に重要な転写抑制因子Bcl-6の発現を誘導することでその分化を促進していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、発症初期の未治療の関節リウマチ患者の腸管内の酪酸濃度が健常者と比較して顕著に低い事を明らかにしている。さらに、酪酸産生菌が顕著に減少することを見出した。これは、腸内の酪酸産生が減少することと関節リウマチの発症との関連性を示す成果である。実際マウス関節リウマチモデルを用いた検討から、酪酸産生菌により酪酸が産生される飼料を与えることで、関節炎の症状が著明に改善した。以上のことから、発症初期の関節リウマチ患者へ酪酸が産生される食事を予防的に提供することで、将来的な症状を抑制できると考えている。これを既存薬と合わせて使用し、効果的な関節リウマチ治療法に結び付くと期待している。

研究成果の概要(英文)：We found that butyrate, one of the short-chain fatty acids produced by the gut commensal bacteria, significantly decreased in the intestinal tract of the early stages untreated rheumatoid arthritis patients compared to healthy people. Furthermore, we found that the treatment of the butyrate diet mitigated the development of an autoimmune rheumatoid arthritis model in mice. Butyrate increased the number of follicular regulatory T cells and suppressed the production of autoantibodies required for the development of arthritis. Moreover, we developed a new follicular regulatory T cell culture system and examined the mechanism of induction of follicular regulatory T cell differentiation by butyrate. Using the culture system, we found that butyrate promotes the differentiation of follicular regulatory T cells by inducing the expression of the transcriptional repressor Bcl-6, which is essential for the differentiation through its histone deacetylase inhibitory action.

研究分野：免疫学

キーワード：酪酸 濾胞制御性T細胞数 間接リウマチ

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の発症には、遺伝的要因に加えて環境的要因が関与している。環境的要因の中でも、腸内細菌叢のバランスの異常と、それに起因する腸内細菌代謝物の変動との関連性が注目されている。腸内細菌叢のバランスの異常が疾患の抑制に重要な制御性T細胞 (Treg細胞)の減少と、疾患の発症を引き起こす炎症性 Th17 細胞や濾胞ヘルパーT細胞 (Tfh細胞)の増加が発症の一因となると考えられている。全身性の自己免疫疾患である関節リウマチは、腸内細菌との関連性について多くの研究が実施されてきた。一例として、マウスやラットの関節リウマチモデルでは、無菌環境下で飼育すると発症しないことが知られる。興味深いことに、そこに Th17 細胞や Tfh 細胞を増加させる腸内細菌を単独で定着させるだけで、関節リウマチを発症する (Wu et al., *Immunity*, 2010; Zanin-Zhorov et al., *Science*, 2010)。腸内細菌叢の網羅的解析から、発症早期未治療の関節リウマチ患者の 75%では、*Prevotella copri* という細菌種が増加することが報告されている。(Scher et al. *eLife*, 2013, Maeda et al. *Arthritis Rheum*, 2013)。また、酪酸を含む短鎖脂肪酸を産生する腸内細菌が減少することも合わせて報告されている。このことから、発症早期の関節リウマチ患者では、酪酸の産生量が減少することがその後の症状の進行に影響を与える可能性があるが、研究開始当初は不明であった。腸内細菌が産生する酪酸は、大腸で末梢誘導型の Treg 細胞の分化に必須の役割を果たすことが知られ、酪酸の産生が起きない飼料を与えたマウスでは、末梢誘導型の Treg 細胞の分化が誘導されない (Furusawa et al., *Nature*, 2013)。こうしたことから、腸内で酪酸の産生量が減少することが Treg 細胞を減らし、それが関節リウマチ発症のトリガーとなると着想した。II 型コラーゲン誘発関節リウマチマウスモデルを用いた申請者の予備的検討から、腸内細菌の代謝により盲腸・大腸で酪酸が局所的に産生される飼料 (以下、酪酸添加飼料)を与えたマウスでは、酪酸の産生されない対照飼料を与えたマウスと比較して、発症率、クリニカルスコアが著明に抑制されることを見出している。組織学的解析からも、酪酸添加飼料を与えたマウスでは、関節滑膜への炎症性細胞の浸潤や、滑膜の増殖性変化の抑制、さらに骨破壊の著大な改善が認められた。また、酪酸添加飼料を与えたマウスでは、II 型コラーゲン (関節の主成分)を認識する抗体 (自己抗体)の産生が著明に減少していた。さらに、酪酸添加飼料を与えたマウスでは、抗体産生する免疫応答に重要な胚中心の大きさが顕著に縮小していた。抗体産生の免疫応答を誘導するには、リンパ濾胞に存在する Tfh 細胞が重要である。酪酸添加飼料を与えたマウスの脾臓では Tfh 細胞を制御する Treg 細胞の一種である、濾胞性 Treg 細胞 (Tfr 細胞)数が増加していた。このことから、酪酸は Tfr 細胞の分化を誘導することで、自己の II 型コラーゲンに対する抗体産生を抑制していると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、腸内細菌が産生する酪酸と間接リウマチの発症の関係性を検証し、酪酸が II 型コラーゲン誘発関節リウマチマウスモデルの発症を抑制するメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 糞便中の酪酸濃度と関節リウマチモデルの発症の相関解析

腸内細菌が産生する酪酸と、関節リウマチ発症の相関性については明らかでない。予備検討から、酪酸添加飼料 (腸内細菌の作用により盲腸・大腸局所で酪酸が遊離される飼料)を与えて酪酸濃度を上昇させることで、II 型コラーゲン誘発関節リウマチマウスモデルの発症が抑制されることが判明している。そこで糞便中の酪酸濃度に着目し、関節リウマチの発症率とその後の症状のクリニカルスコアとの相関解析を行う。DBA/1J マウスに、通常飼料 (CE-2、食物繊維を含む)与え飼育し、II 型コラーゲン誘発関節リウマチモデルの発症を誘導する。発症の前後で、糞便中の酪酸濃度を HPLC で測定する。得られた各種パラメーターの相関解析を行うことで、酪酸濃度と関節リウマチの発症と症状の相関性の有無を明らかにする。

(2) *in vitro* の Tfr 細胞の分化誘導系を用いて、酪酸が Tfr 細胞分化を誘導するメカニズムの解明
酪酸添加飼料を与えたマウスでは、Tfr 細胞数が増加していた。酪酸がリンパ濾胞に存在する Treg 細胞である Tfr 細胞の分化を誘導するかを解析する為に、Tfr 細胞の *in vitro* の分化誘導系を確立する。Tfr 細胞と同じく濾胞に存在する Tfh 細胞と、Treg 細胞の *in vitro* の分化誘導系は確立されて、世界中で幅広く用いられている。本研究では、この二つの分化誘導系を組み合わせることで、Tfr 細胞の分化を誘導する。具体的には、Interleukin (IL)-2 と(Transforming growth factor)TGF- β の存在下で Treg 細胞へ分化させ、その後 IL-6 と IL-21 などの Tfh 細胞分化誘導条件で培養する。予備検討から、Tfr 細胞に特徴的な一部の分子の発現誘導に成功しており、条件を最適化することで Tfr 細胞の *in vitro* の分化誘導系を確立できると考える。まず *in vitro* で作成した Tfr 細胞の遺伝子発現プロファイルを RNA-seq で確認する。さらに、特徴的転写因子 (Foxp3、Bcl-6、Blimp-1 など)や細胞表面分子 (CXCR5、PD-1 など)の発現をフローサイトメトリーで解析することでその性状を解析する。Tfr 細胞 *in vitro* の分化誘導系を用いて、酪酸が Tfr 細胞の分化を誘導するか

解明する。 *in vitro* の系に酪酸を添加し、Tfr 細胞の分化誘導を促進するか、特徴的転写因子や細胞表面分子の発現についてフローサイトメトリーで解析する。酪酸が Tfr 細胞の分化に重要な Foxp3、Bcl-6 などの転写因子の発現を、HDAC 阻害活性を介して誘導するのかを解析する。抗アセチル化ヒストン抗体を用いた ChIP-seq によって、Foxp3、Bcl-6 の遺伝子発現制御領域のヒストンのアセチル化を解析する。

4. 研究成果

関節リウマチ患者（発症 1 年未満、未治療）と健康者の糞便サンプルの比較解析から、関節リウマチ患者では酪酸産生細菌が減少していることを見出した。加えて、糞便中の酪酸濃度も顕著に減少していることが明らかとなった（図 1）。こうした発症早期の腸内の酪酸濃度の減少が、その後の関節リウマチの重症化を引き起こす原因の一つではないかと考えられる。事実、腸内細菌が酪酸を産生できない特殊飼料を与えたマウスでは、関節リウマチのマウスモデルであるコラーゲン誘発性関節炎の発症率と重症度が顕著に悪化する。こうしたことは、腸内細菌の発酵代謝物である酪酸が、関節リウマチの発症率と重症化に抑制的に働いていることを示唆している。我々の過去の研究から、酪酸は大腸において制御性 T 細胞という自己免疫疾患や過度な炎症を抑制する機能を持つ細胞の分化を誘導することを見出している。コラーゲン誘発性関節炎の発症には、関節軟骨の主成分であるコラーゲンに反応する自己抗体が重要であり、自己抗体の産生には B 細胞を助ける濾胞性ヘルパー T 細胞の働きが重要である。濾胞性ヘルパー T 細胞と B 細胞のこうした相互作用を抑制するのが、濾胞性制御性 T 細胞である。腸内細菌の発酵代謝により酪酸が産生される飼料を与えたマウスの大腸を解析したところ、この飼料の摂取により、濾胞性制御性 T 細胞の分化が誘導されることが明らかとなった（図 2）。また、この現象の詳細を解析するために、*in vitro* の濾胞性制御性 T 細胞分化誘導システムを樹立し、酪酸により濾胞性制御性 T 細胞分化誘導の分化誘導が顕著に亢進することを見出した。これまでの研究成果より、腸内細菌代謝物の酪酸は濾胞性制御性 T 細胞という自己免疫疾患の抑制に重要な細胞の分化を誘導することで、コラーゲン誘発性関節炎の発症とその重症化を抑制することが示唆された。

in vitro の濾胞性制御性 T 細胞分化誘導系を用いた実験から、酪酸がヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) を阻害する事で、分化に必須の Bcl-6 と CXCR5 の発現を促進することを明らかにした（図 3）。酪酸は HDAC アイソザイムひとつである HDAC2 を特に強く阻害する。そこで酪酸の代わりに、新規 HDAC2 特異的阻害剤を自己免疫性関節リウマチモデルに投与したところ、その発症を抑制することを見出した。さらに、TFR 細胞分化誘導培養系にこの

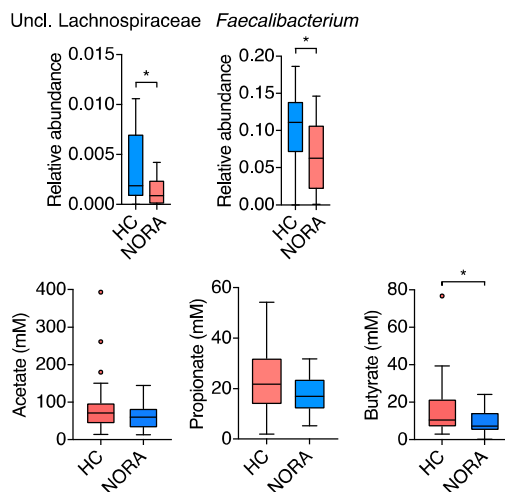


図 1 | 発症 6 ヶ月未満で未治療の RA 患者 (NORA) の糞便中では、ラクノスピラ科と Faecalibacterium の存在割合が健康な対照被験者 (HC) よりも有意に低く、酪酸濃度も減少していた。

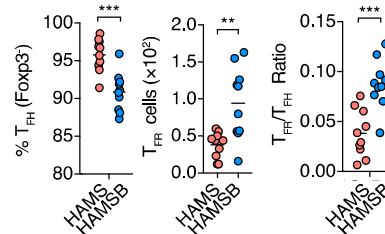


図 2 | 酪酸添加飼料 (HAMS+B) を与えることで、II 型コラーゲン誘発性関節炎マウスの TFR 細胞数を増加させ、逆に TFH 細胞数を減少させた。その結果、TFR / TFH 比が 2 倍に上昇した。HAMS はコントロール飼料。

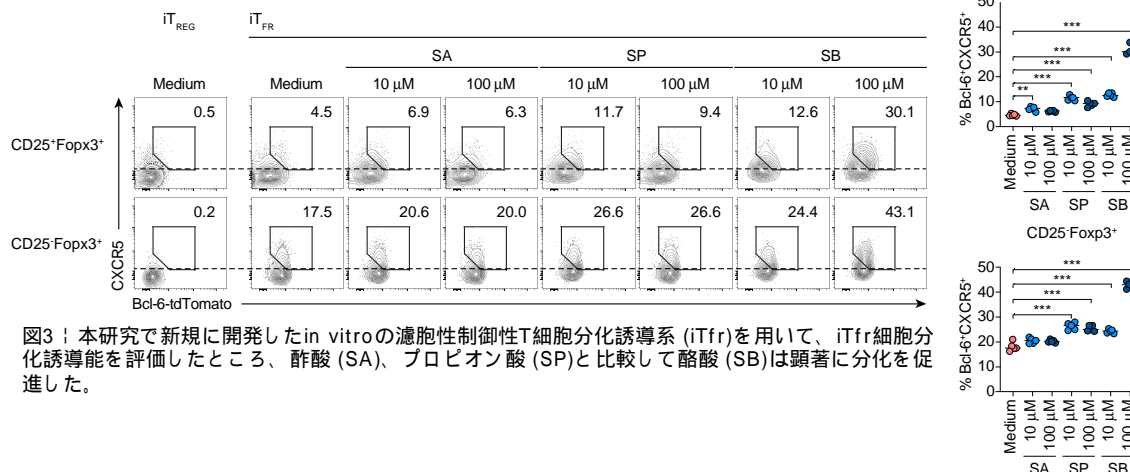


図 3 | 本研究で新規に開発した *in vitro* の濾胞性制御性 T 細胞分化誘導系 (iTFR) を用いて、iTFR 細胞分化誘導能を評価したところ、酢酸 (SA)、プロピオン酸 (SP) と比較して酪酸 (SB) は顕著に分化を促進した。

HDAC2 の選択的阻害剤を添加したところ、TFR 細胞の分化を強力に誘導した。これらのことから、酪酸は HDAC2 アイソザイムを阻害することで、TFR 細胞の分化誘導を促進し、自己免疫性

関節リウマチモデルの発症を抑制していることが示唆された。さらに、新規に T 細胞特異的 HDAC 欠損マウスを作出したところ、TFR 細胞の分化が顕著に促進されることを見出している。このことから、HDAC2 の発現を阻害することが、TFR 細胞の分化に重要な役割を果たしている可能性を見出した。

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 3件）

1. 著者名 Nobuhide Kobayashi, Daisuke Takahashi, Shunsuke Takano, Shunsuke Kimura and Koji Hase	4. 巻 10
2. 論文標題 The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 Article2345
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2019.02345	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 Junya Isobe, Shintarou Maeda, Yuuki Obata, Keito Iizuka, Yutaka Nakamura, Yumiko Fujimura, Tatsuki Kimizuka, Kouya Hattori, Yun-Gi Kim, Tatsuya Morita, Ikuo Kimura, Stefan Offermanns, Takahiro Adachi, Atsuhito Nakao, Hiroshi Kiyono, Daisuke Takahashi, Koji Hase	4. 巻 32
2. 論文標題 Commensal-bacteria-derived butyrate promotes the T-cell-independent IgA response in the colon.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 243 ~ 258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz078	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 Daisuke Takahashi, Naomi Hoshina, Yuma Kabumoto, Koji Hase et al.	4. 巻 58
2. 論文標題 Microbiota-derived butyrate limits the autoimmune response by promoting the differentiation of follicular regulatory T cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 102913
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2020.102913	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 Atsuo Nakamura, Shin Kurihara, Daisuke Takahashi, Wakana Ohashi, Yutaka Nakamura, Shunsuke Kimura, Masayoshi Onuki, Aiko Kume, Yukiko Sasazawa, Yukihiro Furusawa, Yuuki Obata, Shinji Fukuda, Shinji Saiki, Mitsuharu Matsumoto, Koji Hase	4. 巻 12
2. 論文標題 Symbiotic polyamine metabolism regulates epithelial proliferation and macrophage differentiation in the colon.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 Article 2105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22212-1	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 Atsuo Nakamura, Daisuke Takahashi*, Yutaka Nakamura, Takahiro Yamada, Mitsuharu Matsumoto* (*equal correspondence), Koji Hase	4. 巻 693
2. 論文標題 Polyamines polarized Th2/Th9 cell-fate decision by regulating GATA3 expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arch Biochem Biophys	6. 最初と最後の頁 108587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2020.108587	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 Daisuke Takahashi, Koji Hase
2. 発表標題 Microbiota-derived Butyrate Limits the Autoimmune Response by promoting the Differentiation of Follicular Regulatory T cells
3. 学会等名 The American Association of Immunologists, 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Takahashi, Ryohtaroh Matsumoto, Koji Hase
2. 発表標題 AP-1B-dependent sorting of basolateral membrane protein is required for maintenance of intestinal intraepithelial lymphocytes
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Takahashi, Trevor Lockett, Julie M Clarke, David L Topping, Koji Hase
2. 発表標題 Microbial fermentation product butyrate Ameliorates Autoimmune Arthritis.
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 濾胞性制御性T細胞の製造方法	発明者 長谷耕二、高橋大輔	権利者 学校法人慶應義塾
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-185826	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------