

令和 2 年 6 月 28 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16644

研究課題名(和文) 関節炎における腸管免疫調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of intestinal immunoregulatory mechanism in arthritis

研究代表者

長沼 靖 (Naganuma, Yasushi)

山形大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10463811

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、関節リウマチ(RA)の発症や再燃予防を目標として、マウスのコラーゲン誘発性関節炎(CIA)モデルを用いて腸管免疫系と腸内細菌叢の解析を行った。CIAモデルを作成後に、CIAの発症前から発症後、寛解後、再燃後と経過を追って免疫細胞を回収し、動態と機能解析を行った。さらに関節組織、血液を採取し、免疫組織学的評価、サイトカイン定量を行った。また、便も随時回収し、次世代シーケンサーを用いて腸内細菌叢解析を行った。免疫細胞、サイトカイン、腸内細菌叢も関節炎の発症、寛解、再燃とともに大きく変動した。特に初発時と再燃時では腸管免疫系の動態が異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチは未だ根治的治療法はない。本研究により関節リウマチモデルにおける腸管免疫系の時系列変化が明らかになった。本研究の社会的意義として、将来的に関節リウマチ患者の便を回収、解析することにより特徴的な細菌の存在を明らかとし、関節リウマチの病勢を予測することが可能になると考えられる。また、特に病勢が強い時期に特徴的な腸内細菌を抑制し、腸管免疫を修飾することにより関節リウマチの治療につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the intestinal immune system and intestinal flora using a mouse collagen-induced arthritis (CIA) model with the goal of preventing the onset and relapse of rheumatoid arthritis (RA). After preparing the CIA model, immune cells were collected before and after the onset of CIA, after remission, and after relapse, and the kinetics and function were analyzed. Furthermore, joint tissues and blood were collected, and immunohistological evaluation and cytokine quantification were performed. In addition, feces were collected at any time, and intestinal microflora was analyzed using a next-generation sequencer. Immune cells, cytokines, and intestinal flora also fluctuated significantly with the onset, remission, and relapse of arthritis. In particular, it was suggested that the dynamics of the intestinal immune system differ between the initial onset and relapse.

研究分野：腸管免疫

キーワード：腸管免疫 関節リウマチ 腸内細菌叢

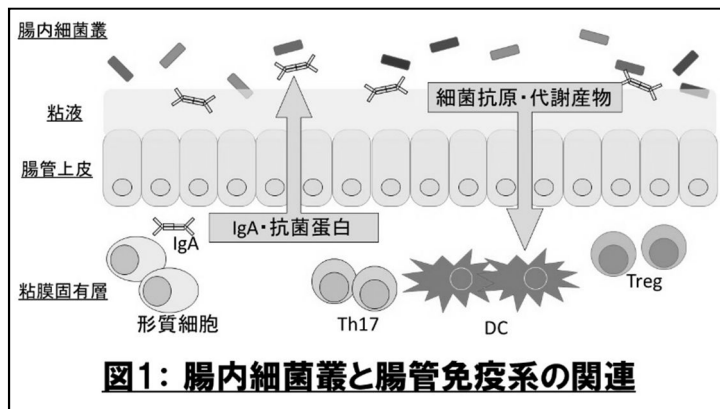
1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患である関節リウマチ(RA; rheumatoid arthritis)は遺伝因子と環境因子の相互作用によって発症すると考えられており、寛解と再燃を繰り返し、最終的に不可逆的な関節破壊をもたらす。近年、生物学的製剤が出現し、早期の寛解導入が可能となってきたものの、未だ根治的治療法は見つっていない。

腸内細菌叢と腸管免疫系は相互に影響し合いながら、環境因子の1つとして様々な疾患の発症に関わっていることが示唆されている。特に腸管の粘膜固有層(lamina propria: LP)では、樹状細胞(DC)やタイプ17ヘルパーT細胞(Th17)、制御性T細胞(Treg)等免疫系の細胞が、腸内細菌やその代謝産物により活性化もしくは抑制されると同時に、宿主から分泌されるIgAや抗菌蛋白、粘液によって腸内細菌叢が調節されることにより、腸管免疫のバランスを保っていることが分かってきた(図1)。この免疫系のバランスが崩れることによって、生体は病的状態に傾くと考えられる。さらに近年、いわゆる善玉菌とされるプロバイオティクスが腸管免疫系を調節し、疾患の発症を抑制する可能性も示唆されている。しかし、RAと腸管免疫系の関連、病態制御機構については未だに不明な点が多い。特に、RA初発時と再燃時の腸管免疫や腸内細菌の違いについては全く不明である。

2. 研究の目的

本研究ではRA発症の環境因子の1つである腸内細菌と、それに影響を受け、同時に影響を与える腸管免疫系細胞の検討を行う。本研究では、ヒトRAの



モデルとして利用されているCIAマウスを用いる。マウスへのコラーゲン投与による免疫刺激が腸内細菌にどのような変化をもたらすのか、関節炎発症直前、初発時、そして特に再燃時の腸管免疫細胞やサイトカイン、腸内細菌の変化を捉えようとしている点が特徴的である。病態を解明し、発症抑制を目指すこと、根治を目指すことはもちろん重要であるが、仮に発症したとしても再燃させず、寛解を維持する点からの腸管免疫系の研究は少ない。

関節炎発症前から発症後、さらに寛解後、再燃後における腸管免疫系、腸内細菌の一連の関連を明らかにすることにより、臨床症状として腫脹や発赤が現れていない時期のCIAの病態解析を行うこと、さらに初発時と再燃時の病態の違いについて解析を行うことが本研究の特色であり、独自のものである。

3. 研究の方法

本研究では自己抗原としてのコラーゲンの免疫、すなわち自己免疫性関節炎の発症原因となる局所炎症や外傷が、CIA初発時、再燃時において腸内細菌叢や腸管免疫系に与える影響を特に次の点に注目して解析を行う。

(1) 腸管や腸間膜リンパ節でのリンパ球、サイトカイン産生の変化を調べる

フローサイトメトリー法、サイトメトリックビーズアレイ法

(2) 腸管内容物を採取し腸内細菌叢の変化を捉える

バクテリア16sRNAを指標にした次世代シーケンス法

(3) 四肢関節組織を採取し、局所変化を捉える
組織学的解析

4. 研究成果

(1) 大腸の粘膜固有層、腸間膜リンパ節、および脾臓におけるリンパ球、サイトカイン産生
CIA マウスの大腸の粘膜固有層、腸間膜リンパ節、および脾臓を回収し、フローサイトメトリー法を用いてリンパ球の解析を行った。CD4+ROR_t+Foxp3⁻ T細胞をTh17細胞として、CD4+Foxp3+ROR_t⁻ T細胞を各リンパ組織のTreg細胞として解析した。腸間膜リンパ節においてはCD4⁺ T細胞中のTh17細胞の割合は、最初のコラーゲン免疫後に徐々に増加し、その後、再燃時において対照群と比較して減少した。対照的に、Tregの比率は最初のコラーゲン免疫後にはほとんど変化を示さず、その後関節炎の再燃時に増加した。

サイトメトリックビーズアレイ法を用いて血中サイトカインの測定を行った。TNFはCIA群と対照群の両方で初回と2回目のコラーゲン免疫後に増加し、最初の免疫から4週間後にピークに達し、その後徐々に減少した。CIA群と対照群の両方で、TNFは比較的早い段階で増加した。一方、IL-6は、初回免疫後6週間で対照群と比較して有意に増加し、その後12週間目において減少した。

(2) 腸内細菌叢変化

CIA マウスから便を随時回収し、次世代シーケンサーを用いて腸内細菌叢の解析を行った。科レベルで解析を行ったところ、*Bacteroidales; f_*は関節炎の初発時と再燃時に二峰性の増加を認めた。*Desulfovibrionaceae*は関節炎発症後再燃時まで継続的に増加した。

(3) 組織学的解析

CIA マウスの膝組織を回収し、パラホルムアルデヒドで固定後、20%EDTAで脱灰しパラフィン包埋を行った。切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色で解析を行った。初発時に比較し、再燃時においては炎症系細胞の浸潤が強く関節組織の破壊が著明であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nemoto Nobuhito, Takeda Yuji, Nara Hidetoshi, Araki Akemi, Gazi Md Yeashin, Takakubo Yuya, Naganuma Yasushi, Takagi Michiaki, Asao Hironobu	4. 巻 32
2. 論文標題 Analysis of intestinal immunity and flora in a collagen-induced mouse arthritis model: differences during arthritis progression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 49 ~ 56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1093/intimm/dxz058	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nobuhito NEMOTO, Yuji TAKEDA, Hidetoshi NARA, Akemi ARAKI, Md. Yeashin GAZI, Yuuya TAKAKUBO, Michiaki TAKAGI, Hironobu ASAO
2. 発表標題 Changes of intestinal immunity during arthritic progression in mouse model.
3. 学会等名 ORS annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nobuhito NEMOTO, Yuji TAKEDA, Hidetoshi NARA, Akemi ARAKI, Md. Yeashin GAZI, Yuuya TAKAKUBO, Michiaki TAKAGI, Hironobu ASAO
2. 発表標題 Can the intestine save the joints ? : From the viewpoints of intestinal immunity during arthritic progression in mouse model.
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 根本 信仁、武田 裕司、奈良 英利、荒木 明美、Gazi Yeashin、高窪 祐弥、高木 理彰、浅尾 裕信
2. 発表標題 マウス関節炎モデルにおける腸管免疫系の時系列解析
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuya Takakubo; Tomoto Suzuki; Hiroharu Oki; Nobuhito Nemoto; Yasushi Naganuma; Yuta Suzuki; Kan Sasaki; Michiaki Takagi
2. 発表標題 Toll-like receptors and immune-cells in rheumatoid synovial tissues treated by tocilizumab (TCZ)
3. 学会等名 第4回日本骨免疫学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----