

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08917

研究課題名(和文)腸管神経系と免疫系の相互作用による関節リウマチの病態制御機構の解明と新規治療開発

研究課題名(英文)Elucidation of pathological control mechanism of rheumatoid arthritis by interaction between enteric nervous system and immune system and development of novel treatment

研究代表者

前澤 玲華 (Maewaza, Reika)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20322406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチの病態に腸内細菌叢の不均衡(dysbiosis)による腸管免疫異常の関与が推定されている。本研究は、マウスのNcx遺伝子の欠損により腸管で一酸化窒素の産生神経細胞の増加に伴うdysbiosisの存在に注目し、Ncx-KOマウスと自己免疫疾患モデルであるSKGマウスを用いて自己免疫性関節炎におけるNcx遺伝子の役割を解析した。予想に反して、Ncx欠損によりSKG-マウスの関節炎は軽症化した。本研究よりNcx遺伝子はdysbiosis以外に自己免疫性関節炎の病態の制御に関与することが示唆された。しかしそのメカニズムはまだ十分解明されていないため、さらなる研究が現在も継続進行中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、マウスの関節炎モデルの解析により腸管の一酸化窒素産生神経細胞の増加が関節リウマチ様関節炎の重症度に関与することや、腸内の環境変化が過剰免疫システムの誘導に関与すること可能性が示唆された。今までに、関節リウマチの発症について腸内細菌叢と一酸化窒素の腸内産生を関連付けて着目した研究は国内外において報告されていない。一酸化窒素の産生の機能調節が新規の治療開発につながる可能性に着目した本研究の成果は、関節リウマチなど自己免疫性関節炎の新規治療法の開発に大いに貢献し、さらに様々な免疫性疾患の病態の分子メカニズムの解明や新規分子標的治療法の開発へとつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been presumed that intestinal immune abnormalities caused by changes in the intestinal microbiota (dysbiosis) are involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. In this study, we analyzed the role of the Ncx gene in autoimmune arthritis using Ncx-KO mice and SKG mice, a model of autoimmune disease, focusing on the presence of dysbiosis in the intestinal tract with increased nitric oxide production in mice due to Ncx gene deletion. Contrary to expectations, Ncx deficiency resulted in milder arthritis in SKG-mice. This study suggests that the Ncx gene is involved in the regulation of the pathogenesis of autoimmune arthritis in addition to dysbiosis. However, the mechanism is still not fully understood, and further studies are ongoing.

研究分野：自己免疫疾患 リウマチ性疾患 膠原病

キーワード：関節リウマチ 腸管神経 腸管免疫 NCX

1. 研究開始当初の背景

(1) 自己免疫疾患の病態には正常な免疫系が持つ自己抗原に対する免疫トレランスの破綻が深く関わると考えられるが、その病態は十分に理解されていない。膠原病の中でもっとも罹患頻度の高い関節リウマチ (RA) の治療は免疫機構修飾を目的とした新たな治療戦略として生物製剤などの導入により大きく進歩したが、いまだ根治的治療法は存在しないことから、その病態の解明と新規の根治的治療の開発が必要とされている。RA の発症や病態の維持において環境要因は極めて重要であると考えられ、その中で特に腸内細菌叢の変化が最近注目されている。近年、腸内細菌叢の変化が様々な疾患の発症・進行に関連していることが示唆されている。RA においても腸内細菌叢の不均衡 (dysbiosis) による免疫機構の異常が深く関与することが考えられるようになってきた。しかし、その病理的意義は十分に明らかでない。

(2) 腸管免疫系においてパイエル板・孤立リンパ小節などの消化管関連リンパ組織の免疫系細胞が中心となって形成される自然・獲得免疫ネットワークは、腸管組織における病原性微生物に対する生体防御と非病原性微生物との共生による恒常性の維持に極めて重要な役割を果たしている。そして、ある種の遺伝的因子や dysbiosis などの環境因子の作用により腸管免疫の生体防御機構やトレランスが破綻すると腸管免疫異常が生じ、さらに全身性免疫の異常へ進展することにより RA の発症に繋がると考えられている。最近、伊藤能永博士 (京都大学) らによって自己免疫性関節炎モデルである SKG マウスから関節炎をひき起こす T 細胞受容体が遺伝子クローニングされ、その T 細胞受容体が認識する自己抗原が特定された。そのうちのひとつは全身に発現するタンパク質 RPL23A で、RA 患者において RPL23A に反応する T 細胞および自己抗体が検出された。さらに、前田悠一博士 (大阪大学) らは RA 患者で認められる dysbiosis が自己反応性 T 細胞の活性化を介して関節炎の発症に関与することを RA 患者の糞便を定着させた SKG マウスの解析から明らかにしている。また dysbiosis で認められる腸内細菌叢の中で *Prevotella copri* の増加が RA 発症に関与することを示唆している。

(3) 研究分担者の幡野は神経堤細胞に特異的に発現しているホメオボックス遺伝子 *Ncx* を同定し、腸管で神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) の増加と NO 産生神経細胞が増加することを報告している。最近、幡野や研究分担者の有馬らは *Ncx*-ノックアウト (KO) マウスにおいて dysbiosis を認め、NO の無毒化酵素 Nitric Oxide reductase flavorubredoxin をコードする遺伝子 *NorV* 陽性の腸内細菌の優勢を認めた。また、*Ncx*-KO マウスは、通常の生殖可能で寿命も野生型と変わりがないが、デキストラン硫酸 (DSS) 腸炎発症の感受性が増加することを観察している (投稿中)。そこで、神経堤細胞に特異的に発現する遺伝子 *Ncx*-KO マウスの腸管における NO 産生神経細胞の増加に伴う腸内細菌叢の dysbiosis および炎症性腸疾患が誘導されることに注目し、*Ncx*-KO マウスの関節炎モデルを解析することによって、RA および自己免疫機構が関連すると考えられる関節炎の発症・維持機構における腸管の神経・免疫系制御機構や NO の役割を解明する研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究は、*Ncx*-KO マウスの関節炎モデルの解析により RA を代表とする自己免疫性関節炎の病態基盤である全身免疫系に対する腸管神経系と粘膜免疫系の相互作用や、NO 合成酵素異常を介した粘膜免疫系機能および腸内細菌叢の dysbiosis の病理的意義を明らかにする。そして自己免疫疾患の病態制御機構に対する腸管粘膜免疫系の役割の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 本研究で使用する SKG マウス (BALB/c) は、T 細胞受容体刺激伝達分子 ZAP-70 の点変異により、潜在的に自己反応性 T 細胞を有する。無菌環境下では正常であるが、真菌成分であるマンナンとの投与により関節炎が惹起される。関節炎の発症には自然免疫系の活性化により、関節炎惹起性 T 細胞 (Th17 細胞) が誘導され、滑膜増殖や炎症細胞浸潤を認め、リウマトイド因子、抗核抗体、抗シトルリン化ペプチド抗体などが血清中に検出される (J Exp Med. 2010;207:1135-1143)。本研究では SKG マウス由来ナイーブ CD4⁺T 細胞を養子免疫細胞移入した *Ncx*-KO マウス (BALB/c) と *Ncx*-WT (野生型) マウス (BALB/c)、また、SKG マウスと *Ncx*-KO マウスを交配して作成した SKG-*Ncx*-KO マウスと SKG-*Ncx*-Het (ヘテロ) マウスおよび SKG-*Ncx*-WT マウスについて SPF 環境下で解析を行った。そして自己免疫性関節炎発症および進行に対する NO 産生腸管神経の増加の影響について検討した。

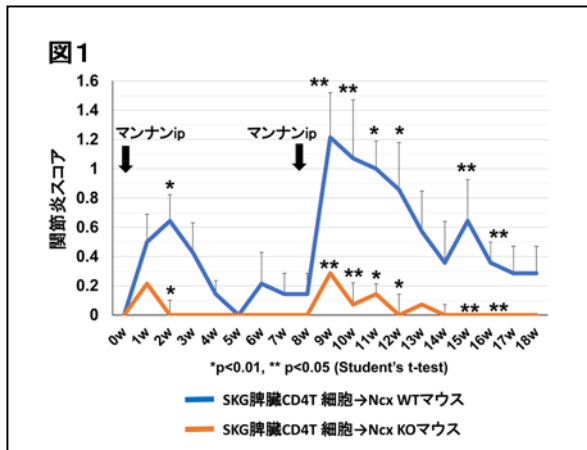
(2) 関節炎関連免疫ネットワークに対する腸管神経系の機能的役割を明らかにするため、各マウスに β -D グルカンの腹腔内投与前および投与後の関節炎発症時期に以下の解析を行った。① 関節炎の解析：臨床的評価は関節炎スコアで定量化した。足関節の病理学的解析は炎症スコア (膜増生、線維化、血管増生、炎症細胞浸潤) と軟骨傷害スコアで定量化して継時的に評価した。

② 免疫組織学的解析：腸管粘膜免疫系として孤立リンパ濾胞，パイエル板，上皮細胞間リンパ球，粘膜固有層リンパ球，全身免疫系として脾臓の胚中 GC-B 細胞，制御性 T 細胞(Treg)，各自然リンパ球，タイプ別マクロファージおよび樹状細胞の出現について免疫組織化学的検討を行った。③ 免疫学的解析：自己抗体産生を解析するために血清中のリウマトイド因子や抗核抗体を ELISA で測定した。④ 関節炎に対する腸内細菌叢-粘膜系-全身系免疫ネットワークに対する神経型 nNOS の機能を明らかにするため，NOS 阻害剤 L-NAME を前投与して関節炎について解析し，NO 合成制御の臨床的意義を検討した。

4. 研究成果

(1) SKG マウス由来脾臓 CD4⁺細胞の養子移入 NCX-WT/KO マウスにおけるマンナン誘導関節炎

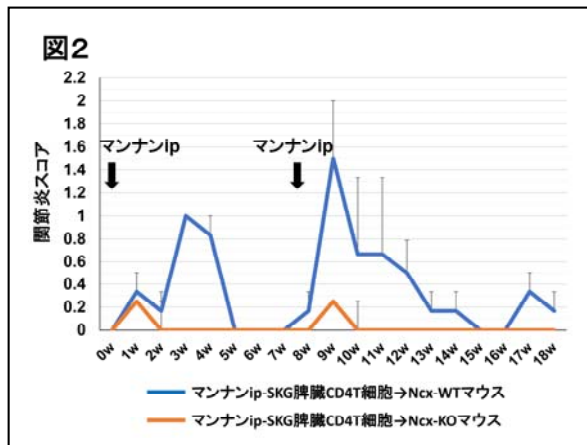
SKG マウス脾臓由来ナイーブ CD4⁺細胞を SPF 環境で Ncx-WT と Ncx-KO マウスに移入し，0 週及び 8 週後にマンナン 20mg を腹腔内注射した。Ncx-WT マウスと Ncx-KO マウス，いずれにおいてもマンナン初回投与 1 週間後から多関節炎の発症を認め，その後軽減したが，2 回目のマンナン投与後に関節炎の増強を認めた。関節炎スコアは，手（両側 2 か所）と手指（両側 8 か所），足（両側 2 か所）と足趾（両側 10 か所）について点数化して評価した (Sakaguchi N, et al.



Nature. 2003 Nov 27;426(6965):454-60). マンナン投与後の 18 週の観察期間中に Ncx-WT マウスの関節炎スコア値と比べ Ncx-KO マウスの関節炎スコア値は有意に低値であり，関節炎の軽症化を認めた (図 1). 次に，関節炎誘導 3 週後の SKG マウスの脾臓由来 CD4⁺細胞を Ncx-WT マウスと Ncx-KO マウスに養子移入して関節炎の誘導を行なった。SKG マウスのナイーブ CD4⁺細胞の移入実験と同様に関節炎発症 SKG マウス由来の CD4⁺T 細胞を養子移入した Ncx-KO マウスの関節炎スコア値は，Ncx-WT マウスに比べて低値の傾向を示した (図 2).

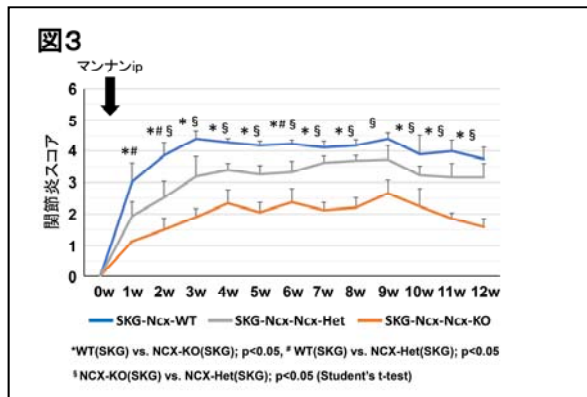
(2) SKG-Ncx-KO マウスと SKG-Ncx-WT マウスにおけるマンナン誘導関節炎

以上の細胞移入する非生理的な実験系に加え，同一生体内由来 CD4⁺細胞の存在下で SPF 環境にて，SKG-Ncx-KO マウスと SKG-Ncx-Het (ヘテロ) マウスおよび SKG-Ncx-WT マウスのマンナンによる関節炎誘導について解析を行なった。Ncx-KO の関節炎スコア値は，関節炎誘導後は常に Ncx-WT よりも有意に低値であった。また，Ncx-Het の関節炎スコア値は，Ncx-WT と Ncx-KO の中間にあった。以上の結果より，NCX 欠損は，その遺伝子発現量に依存して病原性 CD4⁺細胞依存的に発症する関節炎を軽減することが明らかになった (図 3).



(3) マウスのマンナン投与後誘導関節炎の病理学的解析

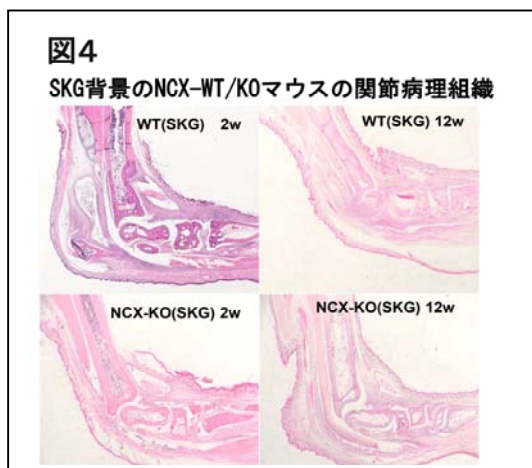
SPF 環境下で SKG-Ncx-WT マウスと SKG-Ncx-KO マウスのマンナン誘導関節炎の病理組織学的評価を HE 染色標本で行った。関節病理スコアは，Rooney スコアを改変し，各項目と軟骨傷害の総スコアを調べた (Rooney M, et al. Arthritis Rheum. 1988 Aug;31(8):956-63.). 関節炎誘導 2 週間および 12 週間後のスコアは SKG-Ncx-WT マウスに比べて SKG-Ncx-KO マウスにおいて有意に低値 (2 週間) または低値の傾向 (12 週間) であった (図 4, 図 5).



(4) SKG-Ncx-WT マウスと SKG-Ncx-KO マウスのリンパ組織の細胞分画の解析

SPF 環境下で未処置の SKG-Ncx-WT マウスと SKG-Ncx-KO マウスの胸腺，脾臓および小腸について比較した (各 n=3). 胸腺総細胞数は，Ncx-WT と Ncx-KO 間で有意な差異を認めなかった (図 6). また，胸腺における T 細胞分化 (CD4⁺CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺, CD8⁺) も Ncx-WT と Ncx-KO 間で有

意な差異を認めなかった。脾臓において、脾臓総細胞数は Ncx-WT と Ncx-KO 間で有意な差異を認めなかった。脾臓 CD4T⁺細胞, Tfh 細胞, CD8⁺細胞, B 細胞, 形質細胞・形質芽細胞, cDC・pDC



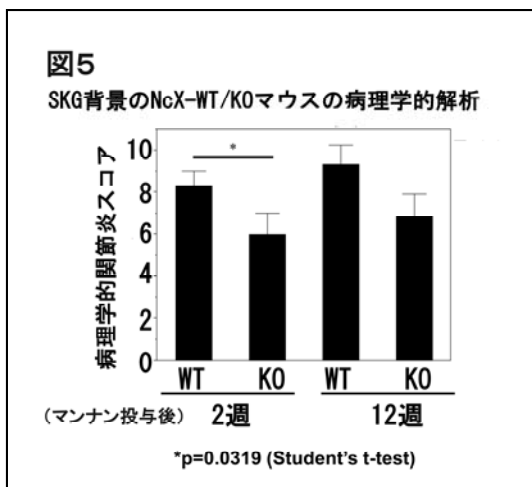
の割合は, Ncx-WT と Ncx-KO 間で有意な差異を認めなかったが, M1 マクロファージ (CD11c⁺F4/80⁺) の分画は軽度であるが Ncx-WT と比較して Ncx-KO で有意な増加を認めた ($p < 0.05$ (Student t-test)). 小腸組織において, 全小腸リンパ組織(クリプトパッチ, 孤立性リンパ小節, パイエル板)の個数は, Ncx-WT と Ncx-KO で有意な差異を認めなかった。

(5) マンナン誘導後の自己抗体 (RF-IgM) 産生

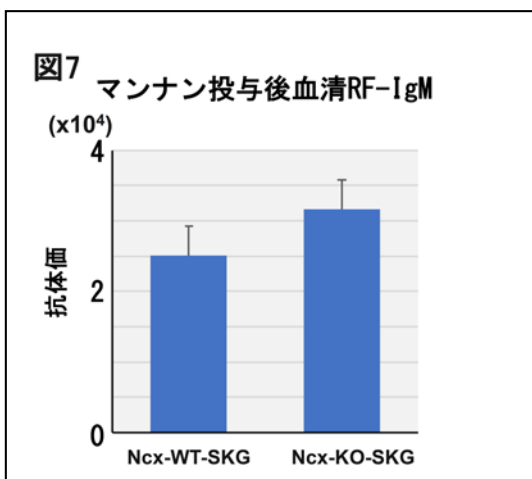
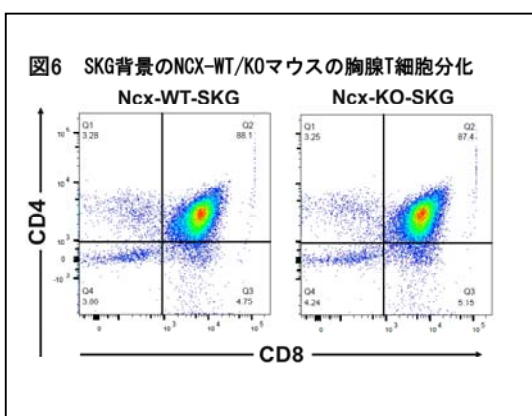
SKG-Ncx-KO マウスと SKG-Ncx-WT マウスにおける血清リウマチ因子を比較した (各 n=4). 血清 RF-IgM 抗体価は, SKG-Ncx-KO マウスと SKG-Ncx-WT マウスで有意な差異を認めなかった (図 7).

(6) マンナン誘導関節炎に対する一酸化窒素合成酵素 (NOS) の関与についての検討

Ncx-KO マウスの腸管において NO 産生神経細胞の増加や dysbiosis が認められることからマンナン誘導関節炎に対する NOS の役割を検討するために, SPF 環境下の SKG-Ncx-KO マウスと SKG-Ncx-WT マウス (WT;n=8, KO;n=5) に対して非選択的 NOS 阻害薬 (L-NAME) の経口投与を 1 週間行い, その 1 週間後にマンナン 20mg を腹腔内注射し, さらに 2 週間後の関節炎の病理学的評価を行った. その結果, NOS 阻害薬を内服した SKG-Ncx-KO/WT とともに病理学的評価において, いずれのマウスも NOS 阻害薬の内服により関節炎が軽減し, Ncx-KO マウスは Ncx-WT マウスと比較して病理学的関節炎スコアがさらに改善した。



RA の病態に環境要因の重要性が考えられ, その中で特に腸内細菌叢の変化が最近注目されている. 自己免疫性関節炎の発症は, 感染や炎症など何らかの要因で誘導された dysbiosis による腸管免疫異常から全身性免疫系異常を介して関節滑膜の局所免疫過剰応答に進展し発症する病態が推定されている. Ncx-KO マウスの腸管で NO 産生神経細胞が増加し, 非病原性常在菌の減少および病原性細菌が増加による dysbiosis が存在し, NO の無毒化酵素である flavorubredoxin をコードする遺伝子 NorV 陽性の腸内細菌の優勢を認めている. 一方, RA 患者にみられる dysbiosis で観察された Prevotella 属は flavorubredoxin 様蛋白を発現しており, NO 抵抗性であることが推測される. また腸内細菌叢を介して病態悪化に関与すると報告されていることから, 本研究の解析開始当初, 我々は NO 抵抗性の病原性腸内細菌が自己免疫性関節炎の病態に深く関与すると推測した. また, NO は炎症性疾患の病態を制御して炎症性腸疾患や RA 滑膜炎に関与すると考えられており SKG-Ncx-KO マウスの関節炎増悪を予想した. しかし, 予想に反して SKG-Ncx-WT マウスの関節炎と比較して軽症化を認めた. 本研究によって, 初めて腸管の nNOS および NO の産生亢進が RA 様関節炎の重症度に関与すること, および腸内の環境変化が過剰免疫システムの誘導に関与することが示されたが, そのメカニズムはまだ十分解明されていないため, さらなる研究が現在も継続進行中である。



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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kondoh Y, Makino S, Ogura T, Suda T, Tomioka H, Amano H, Anraku M, Enomoto N, Fujii T, Fujisawa T, Gono T, Harigai M, Ichiyasu H, Inoue Y, Johkoh T, Kameda H, Kataoka K, Katsumata Y, Kawaguchi Y, Kawakami A, Kitamura H, Kitamura N, Koga T, Kurasawa K, et.al.	4. 巻 59
2. 論文標題 2020 guide for the diagnosis and treatment of interstitial lung disease associated with connective tissue disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 709-740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2021.04.011.	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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tanaka A, Owada T, Hasegawa A, Hiyama T, Takamura Y, Miyao T, Yamazaki R, Arai S, Maezawa R, Arima M, Kurasawa K.
2. 発表標題 TCZ might be a risk factor for worsening of ILD, particularly of chronic ILD.
3. 学会等名 EULAR (European League Against Rheumatism) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Owada T, Tanaka A, Hirata H, Arima M, Fukushima Y, Kurasawa K.
2. 発表標題 The Association Between Continuous Decreases in Serum RF Titers and Radiographic Remission of Joint Damage in RA Patients Treated with Biological or Targeted Synthetic DMARDs.
3. 学会等名 ACR (American College of Rheumatology 's Annual Meeting) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高村雄 太田中彩絵 倉沢和宏 長谷川杏奈 檜山知佳 宮尾智之 山崎龍太郎 新井聡子 大和田高義 前澤玲華 有馬雅史
2. 発表標題 RA-ILDにおけるKL-6測定の意義
3. 学会等名 64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前澤玲華 宮尾智之 倉沢和宏 檜山知佳 長谷川杏奈 高村雄太 山崎龍太郎 田中彩絵 新井聡子 大和田高義 有馬雅史
2. 発表標題 関節リウマチ治療中に発症する肺障害の予後因子の検討
3. 学会等名 64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中彩絵 倉沢和宏長谷川杏奈 檜山知佳 高村雄太 宮尾智之 山崎龍太郎 新井聡子 大和田高義 前澤玲華 有馬雅史
2. 発表標題 生物学的製剤使用中関節リウマチに合併する間質性肺炎の増悪因子の検討
3. 学会等名 64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大和田高義 倉沢和宏 田中彩絵 長谷川杏奈 檜山知佳 高村雄太 宮尾智之 山崎龍太郎 新井聡子 前澤玲華 有馬雅史
2. 発表標題 血清リウマトイド因子値の連続減少は関節リウマチの関節破壊抑制に関係する
3. 学会等名 64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中彩絵 大和田高義 清水彩 高瀬賀子 吉田雄飛 長谷川杏奈 高村雄太 宮尾智之 永澤潤哉 山龍太郎 新井聡子 前澤玲華 有馬雅史 倉沢和宏
2. 発表標題 生物学的製剤使用中関節リウマチに合併する間質性肺炎の増悪因子の検討
3. 学会等名 65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮尾智之 倉沢和宏 吉田雄飛 高瀬賀子 清水彩 檜山知佳 長谷川杏奈 高村雄太 山崎龍太郎 田中彩絵 新井聡子 大和田高義 前澤玲華 有馬雅史
2. 発表標題 関節リウマチIP急性増悪の予後と関連する発症前に存在する異常・因子の同定
3. 学会等名 65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高村雄太 倉沢和宏 吉田雄飛 高瀬賀子 清水彩 長谷川杏奈 宮尾智之 山崎龍太郎 田中彩絵 大和田高義 前澤玲華 有馬雅史
2. 発表標題 A患者の10年間における肺病変発症とそのリスク因子の解析
3. 学会等名 65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	有馬 雅史 (Arima Masafumi) (00202763)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	
研究分担者	幡野 雅彦 (Hatano Masahiko) (20208523)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	倉沢 和宏 (Kazuhiro Kurasawa) (30282479)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	

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
---------	---------