

令和 5 年 4 月 20 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08773

研究課題名(和文) Microbiotaを起点とする全身性自己免疫疾患の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenic role of microbiota for the development of systemic autoimmune diseases.

研究代表者

橋本 求 (Hashimoto, Motomu)

大阪公立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60512845

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)：ZAP70変異の結果B6背景でSLEを、BALB/c背景で関節炎を起こす2つの動物モデル(SKG)を用い、全身性自己免疫疾患の発症における腸内細菌叢の役割を検討した。B6-SKGマウスでは、1) SLEの発症には腸内細菌叢が必須であり、2) 腸内細菌叢の偏移によりTh17分化が誘導され、3) Th17は自己抗体のFc部分の糖鎖の脱シアル化を促進することでSLE発症に寄与すること、を明らかにした。BALB/c-SKGマウスを用いて、1) SKGマウスでは腸炎誘発により関節炎などのSpA病態が起きること、2) 関節炎発症には生体内への腸内細菌のtranslocationが関係していること、を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLEやSpAなどの全身性自己免疫疾患の発症メカニズムはまだよくわかっていないが、近年の研究により腸内細菌叢のかかわりが指摘されている。本研究では、腸内細菌叢がSLEやSpAなどの全身性自己免疫疾患の発症につながる分子メカニズムの一端を明らかにした。これらの研究成果は、腸内細菌叢とその生体内移行、もしくはTh17細胞の分化誘導やそれによる自己抗体の糖鎖修飾の変化が、自己免疫疾患の治療ターゲットとなりえることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we studied the role of gut microbiome for the development of systemic autoimmune diseases, utilizing an animal model of autoimmunity. SKG mice, which harbor a point mutation in ZAP70 gene, developed SLE or SpA upon B6 or BALB/c genetic background, respectively. The B6-SKG study revealed that 1) Gut microbiome was required for the development of SLE, 2) altered gut microbiome drive Th17 differentiation, 3) Th17 promote systemic autoimmunity via modification of Fc-glycosylation of autoantibodies. The BALB/c-SKG study revealed that 1) Induction of colitis could trigger arthritis in SKG mice, 2) Arthritis was triggered by the translocation of gut microbiome.

研究分野：リウマチ学

キーワード：全身性エリテマトーデス 腸内細菌叢 Th17細胞 ZAP70 TCRシグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、ZAP70 分子の点突然変異による TCR シグナル伝達不全の結果、全身性エリテマトーデス (SLE) や自己免疫性関節炎の病態を発症する動物モデルを樹立してきた。一方近年、これらの自己免疫疾患の発症に腸内細菌叢が深くかかわっていることが報告されてきた。そこで、本研究ではこれらの動物モデルを使って、SLE や関節炎の発症における腸内細菌叢の役割を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、ZAP70 変異による TCR シグナル伝達不全により、遺伝的背景に応じて異なった自己免疫疾患を発症する動物モデルを用いて、腸内細菌叢の SLE や脊椎関節炎 (SpA) 病態への寄与を明らかにすることを目的とする。具体的には下記のテーマについて明らかにする。

- (1) B6 背景の SKG マウスの SLE 発症における Microbiota-driven Th17 の関与
- (2) BALB/c 背景の SKG マウスの関節炎発症における Bacterial translocation の関与
- (3) Th17 が自己抗体 Fc 糖鎖修飾を介して自己免疫疾患を促進するメカニズムの解明

3. 研究の方法

- (1) B6SKG マウスを用いた SLE 発症における Microbiota-driven Th17 の関与

1) B6SKG マウスの SLE 発症における腸内細菌叢の役割をみるために、Germ free で飼育した B6SKG マウスを作成した。GF 環境下で飼育した B6SKG マウスでは、抗 DNA 抗体価や腎系球体における免疫複合体 IgG, C3 の沈着が低下しており、SLE 発症に腸内細菌叢が関与することが見出された。

2) 腸内細菌叢の SPF 環境下で飼育した B6SKG マウスと wild type の腸内細菌叢を比較したところ、B6SKG マウスでは腸内細菌叢の多様性 (α-diversity) が低下しており dysbiosis が起きていることが見出された。とりわけ B6SKG マウスでは、Th17 細胞分化を誘導することで知られる Segmented Filamentous Bacteria (SFB) が増多していた。

3) SPF 下の B6SKG マウスにおいては、SFB の量と抗 DNA 抗体の抗体価との間に相関がみられ、腸内細菌叢の寄与が考えられた。SFB によって誘導される Th17 の役割をみるために、IL-17 をノックアウトした B6SKG マウスを作成したところ、脾臓における follicular helper T 細胞 (Tfh) や Germinal center B 細胞 (GC B cell) が減量し、腎系球体における IgG, C3 の沈着が低下しており、IL-17 が germinal center reaction を亢進することで SLE の病態を促進することが明らかとなった。

4) B6SKG マウスの腸内細菌叢 dysbiosis の原因を探るために、腸管 IgA 濃度を wild type と比較した。すると、B6SKG マウスでは、腸内細菌に対して high affinity に結合する IgA の濃度が低下していた。また、SKG マウスでは全身性の Tfh や GC B cell が増加し自己抗体の産生が誘導されている一方、パイエル板では逆に Tfh や GC B cell が低下しており、そのため腸管 high affinity IgA の分泌低下をきたして dysbiosis につながっていると考えられた。

5) B6SKG マウスの T 細胞の自己抗原と腸内細菌抗原に対する反応性の違いの原因を探るために SFB specific TCR トランスジェニックマウスと B6SKG マウスを交配し、SFB 特異的な T 細胞の胸腺選択を検討した。B6SKG マウスでは、ZAP70 変異の結果胸腺選択の閾値が変化しており、SFB 特異的な TCR をもつ T 細胞は負の選択を受けて末梢での割合が低下していた。一方、自己反応性 T 細胞は SKG マウスにおいて正の選択を受けていた。その結果、SKG マウスの T 細胞はアポトーシスした好中球などの自己抗原に対して増殖反応を示し、逆に SFB に対する反応性は低下していた。この結果、SKG マウスでは胸腺選択の閾値が変化し、自己に対する免疫反応の亢進とともに腸内細菌に対する免疫応答の低下をきたし、腸内細菌叢 dysbiosis につながっていることが明らかとなった。

- (2) BALB/c 背景の SKG マウスの関節炎発症における Bacterial translocation の関与

1) BALB/c 背景の SKG マウスの自己免疫性関節炎の発症における腸内細菌叢の役割をみるために、関節炎を起こしていない SKG マウスにデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) にて腸炎を誘発した。すると、wild type マウスでは腸炎のみが起きたのに対し、SKG マウスでは約半数にアキレス腱の腱付着部炎がおき、一部のマウスは関節炎を発症した。このことで、SKG マウスでは腸

炎が関節炎発症の引き金となることが分かった。

2) DSS で腸炎を起こした SKG マウスでは wild type に比較して Th1 細胞、Th17 細胞の割合が増加しており、腸炎がヘルパー T 細胞分化を促進し関節炎惹起につながっていることが示唆された。

3) SKG マウスに DSS 腸炎で関節炎を誘発する際に広域抗生剤を投与すると、SKG マウスの関節炎が抑制された。このことから、腸内細菌の translocation が自然免疫刺激を介してヘルパー T 細胞分化を誘導し、関節炎につながっている可能性が示唆された。

4) DSS 腸炎を誘発した際の血液中の細菌 DNA を網羅的に解析した結果、SKG マウスと wild type マウスでは、腸内細菌の量に変わりはないが、血液中に移行している細菌叢には差があり、SKG マウスでは *Lactobacillus reuteri* などの免疫活性化能の高い細菌群が生体内に移行していることが明らかとなった。

(3) Th17 が自己抗体 Fc 糖鎖修飾を介して自己免疫疾患を促進するメカニズムの解明

1) 腸内細菌叢は Th17 分化を誘導するが、Th17 分化がどのように自己抗体依存性の病態を促進するかは十分には分かっていない。上記(1)の研究で、IL-17 が germinal center reaction を促進することが示されたが、本研究では、Th17 が IgG の Fc 糖鎖修飾を変え病態を促進する可能性を検討した。Curdlan を投与して Th17 を促進した SKG マウスでは IgG-Fc の糖鎖修飾が変化しており、特にシアル酸の低下が認められた。

2) Curdlan を投与したマウスでは、Th17 の増多とともに骨髄や脾臓の plasmablast におけるシアル酸転移酵素 st6gal1 の発現が低下しており、IgG のシアル酸修飾の低下につながっていることが分かった。

3) Curdlan 投与 B6SKG マウスに対して、抗 IL-23 抗体または抗 IL-17 抗体を投与すると、B6-SKG マウスの腎炎の病勢が低下し、同時に plasmablast における st6gal1 の発現が回復していることが認められた。このことから、Th17 関連サイトカインである IL-23 や IL-17 が IgG のシアル酸低下を介して自己抗体の病原性を高めている可能性が示唆された。

4) 自己抗体 IgG のシアル酸低下が病勢に直接的につながっているかを検討するために、activation-induced cytidine deaminase (AID) 特異的に st6gal1 をノックアウトした SKG マウスを作成した。この Conditional knockout (CKO) マウスでは、IgG のシアル酸が低下しており、抗 DNA 抗体価には変化がなかったが、腎系球体における IgG や C3 の沈着が亢進し、腎系球体の萎縮が促進していた。このことから、Th17 により誘導された IgG のシアル酸修飾の変化が、腎炎を促進する作用をもつことが示された。

4. 研究成果

課題(1)の成果は、Shirakashi, et al. Effect of Impaired T Cell Receptor Signaling on the Gut Microbiota in a Mouse Model of Systemic Autoimmunity. *Arthritis Rheumatol. Arthritis Rheumatol* 2022; 74(4): 641-653.に掲載された。なおこの論文は、*Arthritis Rheumatology* 誌の Clinical Connection の記事においても紹介された。

課題(2)の成果は、Tabuchi, et al. Oral dextran sulfate sodium administration induces peripheral spondyloarthritis features in SKG mice accompanied by intestinal bacterial translocation and systemic Th1 and Th17 cell activation. *Arthritis Res Ther.* 2022 ;24(1):176.に掲載された。

課題(3)の成果については、現在論文投稿中であり、under revise である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Shirakashi Mirei, Maruya Mikako, Hirota Keiji, Tsuruyama Tatsuaki, Matsuo Takashi, Watanabe Ryu, Murata Koichi, Tanaka Masao, Ito Hiromu, Yoshifuji Hajime, Ohmura Koichiro, Elewaut Dirk, Sakaguchi Shimon, Fagarasan Sidonia, Mimori Tsuneyo, Hashimoto Motomu	4. 巻 74
2. 論文標題 Effect of Impaired T Cell Receptor Signaling on the Gut Microbiota in a Mouse Model of Systemic Autoimmunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 641 ~ 653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.42016	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 該当する

1. 著者名 Yuya Tabuchi, Masao Katsushima, Yuri Nishida, Mirei Shirakashi, Hideaki Tsuji, Hideo Onizawa, Koji Kitagori, Shuji Akizuki, Ran Nakashima, Kosaku Murakami, Koichi Murata, Hajime Yoshifuji, Masao Tanaka, Akio Morinobu, Motomu Hashimoto	4. 巻 24
2. 論文標題 Oral dextran sulfate sodium administration induces peripheral spondyloarthritis features in SKG mice accompanied by intestinal bacterial translocation and systemic Th1 and Th17 cell activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arthritis Research and Therapy	6. 最初と最後の頁 176 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-022-02844-4.	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 白柏 魅怜、橋本 求	4. 巻 68
2. 論文標題 T細胞受容体シグナル伝達異常が腸内細菌叢と全身性自己免疫へ与える影響	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 リウマチ科	6. 最初と最後の頁 336-340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本 求
2. 発表標題 脊椎関節炎の病態とIL-17阻害の意義
3. 学会等名 日本臨床免疫学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西田 優理, 橋本 求, 白柏 魅怜, 辻 英輝, 北郡 宏次, 秋月 修治, 中嶋 蘭, 吉藤 元, 森信 暁雄
2. 発表標題 ループモデルマウスにおいて、IgGシアル酸減少はTh17-IL23軸を介して病態増悪に関与しうる
3. 学会等名 日本臨床免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田淵 裕也, 辻 英輝, 鬼澤 秀夫, 北郡 宏次, 秋月 修治, 中嶋 蘭, 村上 孝作, 大西 輝, 吉藤 元, 田中 真生, 橋本 求, 森信 暁雄
2. 発表標題 DSS内服によるSKGマウスの末梢性SpA病態では、真菌より細菌のtranslocationが関与し、脾臓ではTh17よりTh1の割合が増加する
3. 学会等名 日本脊椎関節炎学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田淵 裕也, 橋本 求, 秋月 修治, 中嶋 蘭, 村上 孝作, 吉藤 元, 田中 真生, 大村 浩一郎
2. 発表標題 SpAモデルである -1、3-グルカン誘導SKGマウスの腸管においてCTLA4-Ig投与でTh17は減少しうるがILC3は維持される
3. 学会等名 日本脊椎関節炎学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 橋本 求、白柏 魅玲	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 325
3. 書名 ヒト常在菌叢と生理機能・全身疾患	

〔産業財産権〕

〔その他〕

B6SKGマウスを用いて腸内細菌叢とSLEとのかかわりを研究するにあたり、SLEと腸内細菌について先駆的な研究を行っていたGhent UniversityのDirk Elewautとの共同研究を行った(Nat Rev Rheumatol. 2020 ;16(8):415-433.Nat Rev Rheumatol. 2016 ;12(7):398-411)。本国際共同研究が、研究成果Shirakashi M, Elewaut D, Hashimoto M. et al. Arthritis Rheumatol. 2022;74(4):641-653. につながった。

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		
ベルギー	Ghent University		