

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17308

研究課題名（和文）制御性T細胞・Th17細胞バランスの制御による強皮症の線維化治療

研究課題名（英文）Antifibrotic effect of regulating Th17 and regulatory T cell imbalance and intestinal microbiota changes in a systemic sclerosis mouse model

研究代表者

関口 明子 (Akiko, Serkiguchi)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60774396

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：全身性強皮症におけるTh17/制御性T細胞バランス異常の病態への関与を明らかにするために、蠕虫感染により活性化した制御性T細胞がブレオマイシン誘発強皮症マウスモデルに及ぼす影響について検討した。その結果、蠕虫により活性化した制御性T細胞が、線維化モデルマウスにおけるTh17/制御性T細胞バランス異常を制御し、皮膚線維化が抑制された。マウス及び強皮症患者の腸内細菌叢の検討により、腸内細菌叢の変化が強皮症におけるTh17/制御性T細胞のバランス異常に関与している可能性が示唆された。本研究結果より、Th17/制御性T細胞のバランスを正しく制御することが、新たな治療ターゲットとなる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症は、免疫異常を基盤として、皮膚および内臓臓器の線維化、血管異常を呈する全身性疾患である。本邦の患者数は約2万人であり、難病指定されている。本研究結果によって、強皮症の皮膚線維化の病態における制御性T細胞とTh17細胞のバランス異常の解明につながり、制御性T細胞の活性化が強皮症の皮膚線維化を改善させる新たな治療法につながる可能性が期待される。強皮症の病態と腸内細菌叢との関連も新たな知見が得られることが予想される。制御性T細胞の誘導に関わる細菌叢と線維化の病態への関与が解明されれば、強皮症患者が特定の腸内細菌を摂取することで線維化の治療につながる可能性も期待される。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the involvement of Th17/regulatory T (Treg) cell balance in the pathogenesis of systemic sclerosis (SSc), we investigated the effect of intestinal parasite (*Heligmosomoides polygyrus* (Hp)) infection-induced Treg cells activation on the bleomycin-induced SSc mouse model. As a result, Hp infection increases Treg cells and suppresses bleomycin-induced Th17 cells, leading to an inhibitory effect on fibrosis. Furthermore, analysis of the intestinal microbiota of mice and SSc patients revealed that alterations of intestinal microbiota could be involved in the Th17/Treg cell imbalance in SSc and in the development and progression of the disease. In conclusion, Th17/Treg imbalance may be involved in the pathogenesis of SSc, and proper regulation of Th17/Treg balance may be a new therapeutic target.

研究分野：皮膚科学

キーワード：全身性強皮症 Th17細胞・制御性T細胞バランス 寄生虫感染症 蠕虫 皮膚線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

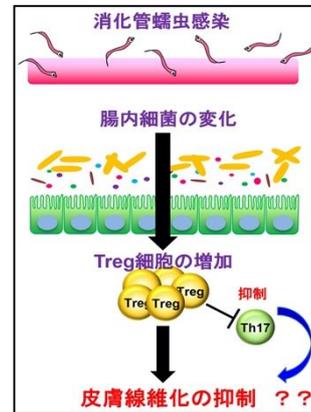
全身性強皮症は、免疫異常を基盤として、皮膚および内臓臓器の線維化、血管異常を呈する全身性疾患である。強皮症の病態は未だ不明であるが、皮膚硬化部に浸潤する様々な炎症細胞による炎症性サイトカインが皮膚線維化や血管障害の病態に関わることが知られており、特に、T細胞サブセットである Th17 細胞と制御性 T 細胞が強皮症の病態において重要な役割を果たしていると考えられている。

強皮症の病態における Th17 細胞の関与については、Th17 細胞とその産生サイトカインである IL-17A の増加が強皮症の皮膚硬化に関与する可能性が示唆されている。例えば、強皮症患者の末梢血中では Th17 細胞数や IL-17A 量が増加していること(J Exp Med 2010;207:1485, J Dermatol Sci 2008;50:240)や、IL-17A KO マウスでは、プレオマイシンにより誘導された皮膚硬化が軽減されること、また、IL-17A は、*in vitro*で TGF- β 1 や CTGF の発現を亢進させ、線維芽細胞からコラーゲン産生を誘導するとの報告がある(Arthritis Rheum 2012;64:3726)。一方、制御性 T 細胞については、強皮症患者の制御性 T 細胞は機能が低下している(FOXP3 発現低下など) (Ann Rheum Dis 2010;69:2213)ことや、制御性 T 細胞が Th17 細胞や Th2 細胞に転換して減少することが報告されているが、強皮症患者の血清中、組織中の制御性 T 細胞数は減少、増加、変化なしの報告があり一定しておらず、強皮症の病態における制御性 T 細胞の役割については研究の余地を残している。近年、様々な自己免疫性疾患において、Th17 細胞や制御性 T 細胞などの個別のサブセットの数的・質的異常だけでなく、それらのバランスの異常が病態形成に関与することが示されるようになってきた。強皮症では、発症初期に血中 IL-6 が増加し病態に関与することが知られているが、IL-6 は Th17 細胞への分化を誘導し、制御性 T 細胞への分化を抑制することから、強皮症では「Th17 細胞が増加・活性化し、制御性 T 細胞が抑制されている」と考えられる。しかし、このような Th17 細胞と制御性 T 細胞のバランスの異常が強皮症の病態に関与しているかどうかについては十分に検討されていない。そこで、我々は強皮症の皮膚線維化の病態における Th17 細胞と制御性 T 細胞の役割(バランス異常)を解明することを目的とした。さらに、発展させて、Th17 細胞と制御性 T 細胞のバランス異常を制御して、強皮症の皮膚線維化を改善できる革新的な治療法を見出すことも目標とした。

我々は制御性 T 細胞を活性化させる方法として「蠕虫」による寄生虫感染を用いることにした。蠕虫は、蠕動により移動する虫の総称であり、ヒトではアニサキス症、肺吸虫症などが知られている。これまでに免疫分野で広く研究されており、宿主の制御性 T 細胞を活性化することで、アレルギー疾患だけでなく、自己免疫性疾患の実験モデルの病態を改善させることが知られている。これらの背景から、プレオマイシン誘導強皮症モデルマウスに蠕虫を感染させて、制御性 T 細胞を活性化させて、皮膚線維化に対する影響について検討することを計画した。我々は、蠕虫感染によって制御性 T 細胞を増加させることによって、Th17 細胞が抑制されて全身性強皮症の線維化(プレオマイシン誘導皮膚線維化)が改善されるのではないかと仮説を立てた(右図参照)。



また、我々が使用する蠕虫(*Heligmosomoides polygyrus* (Hp)) は、マウス消化管に寄生して腸内細菌叢を変化させる。そこで、蠕虫を感染させたプレオマイシン誘導皮膚線維化マウスの腸内細菌叢の変化についても解析して、腸内細菌叢の変化と皮膚線維化との関連についても検討する(右図参照)。さらに、全身性強皮症患者の便について腸内細菌叢の解析を行い、健常人と比較検討することとした。



2. 研究の目的

以下の3つの項目を主な目的とした。

プレオマイシン誘導強皮症マウスの皮膚線維化に対する蠕虫感染の影響を明らかにする。

蠕虫感染による皮膚線維化抑制機序の解明：制御性T細胞・Th17細胞バランスの変化

蠕虫を感染させたプレオマイシン誘導皮膚線維化マウス及び、強皮症患者の腸内細菌叢の変化を明らかにする。

3. 研究の方法

プレオマイシン誘導強皮症マウスの皮膚線維化に対する蠕虫感染の影響を明らかにする。

プレオマイシンによる皮膚線維化モデルを用いて、蠕虫(*Heligmosomoides polygyrus* (Hp)) 感染による皮膚線維化への影響を検討する。まず、蠕虫(200匹/マウス)をマウスに経口感染させ、2週間経過した時点から、プレオマイシンもしくはPBSをマウス背部の皮下に連日局注し、皮膚線維化を誘導する。プレオマイシン投与開始から2週間後に皮膚を採取して組織学的に線維化を定量し、コラーゲン量も定量する。また、炎症細胞浸潤について、免疫染色を用いて検討する。

蠕虫感染による皮膚線維化抑制機序の解明：制御性T細胞・Th17細胞バランスの変化

蠕虫感染による皮膚線維化の抑制作用における制御性T細胞の関与を明らかにするため、CD4陽性制御性T細胞を除去して、その影響について検討する。具体的には、蠕虫に感染したプレオマイシン誘導皮膚線維化モデルマウスに対して、抗CD25抗体を投与してCD4陽性制御性T細胞を除去する。これらのマウスの皮膚を採取し、皮膚の線維化及び炎症細胞浸潤を評価する。さらに、脾臓と鼠径リンパ節を回収し、Flowcytometryにて制御性T及びTh17細胞数の変化を調べる。

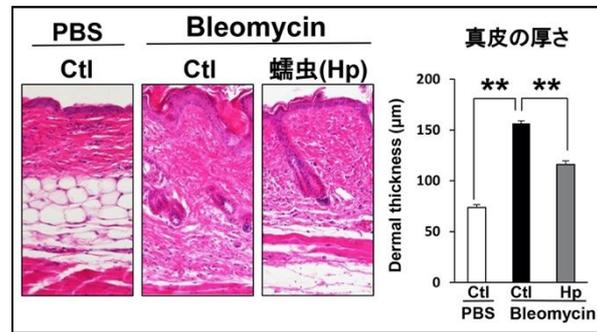
蠕虫を感染させたプレオマイシン誘導皮膚線維化マウス及び、強皮症患者の腸内細菌叢の変化について解析する。

蠕虫は、マウスの消化管に寄生して腸内細菌叢を変化させる。そこで、蠕虫感染による皮膚線維化抑制作用における腸内細菌叢の変化、役割についても検討する。マウスの糞便についてメタゲノム解析(16S rRNA領域の細菌叢解析)を行い、制御性T細胞数と相関して頻度が変動するような細菌について調べる。また、全身性強皮症患者と健常人の便について同様に腸内細菌叢の解析を行い、比較検討する。

4. 研究成果

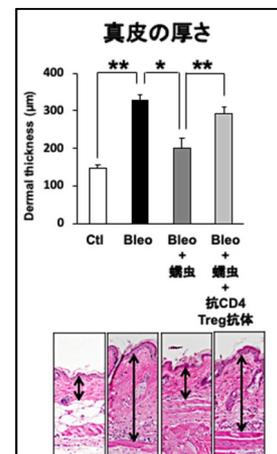
プレオマイシン誘導強皮症マウスの皮膚線維化に対する蠕虫感染の影響を明らかにする。

マウスの真皮の厚さを評価したところ、蠕虫を事前に経口感染させたマウスでは、ブレオマイシン投与による真皮の肥厚が抑制された（右図参照）。また、コラーゲン量及び真皮に浸潤する aSMA 陽性筋線維芽細胞の数も減少した。次に、マウス皮膚組織の免疫染色を行ったところ、ブレオマイシン投与によって線維化皮膚に浸潤した CD3 陽性 T 細胞や CD68 陽性マクロファージといった炎症細胞が、蠕虫感染によって減少した。これらの結果から、蠕虫感染により、ブレオマイシン投与による炎症細胞浸潤が減少し、皮膚線維化が抑制されることが示唆された。



蠕虫感染による皮膚線維化の抑制作用における制御性T細胞・Th17細胞バランスの検討

蠕虫感染による皮膚線維化の抑制作用における制御性T細胞の関与を明らかにするため、抗 CD25 抗体を投与して CD4 陽性制御性 T 細胞を除去したところ、蠕虫感染によるブレオマイシン誘導皮膚線維化モデルマウスで見られた抗線維化、抗炎症作用が失われた（右図参照）。また、ブレオマイシン誘導皮膚線維化モデルマウスのリンパ節におけるフローサイトメトリー解析では、蠕虫感染によって制御性 T 細胞が増加し、ブレオマイシン投与により誘導された Th17 細胞が減少したが、この効果は制御性 T 細胞を除去することによって失われた。これらの結果より、蠕虫感染によるブレオマイシン誘導皮膚線維化抑制効果及び Th17 細胞減少効果は、制御性 T 細胞の増加を介していることが示唆された。

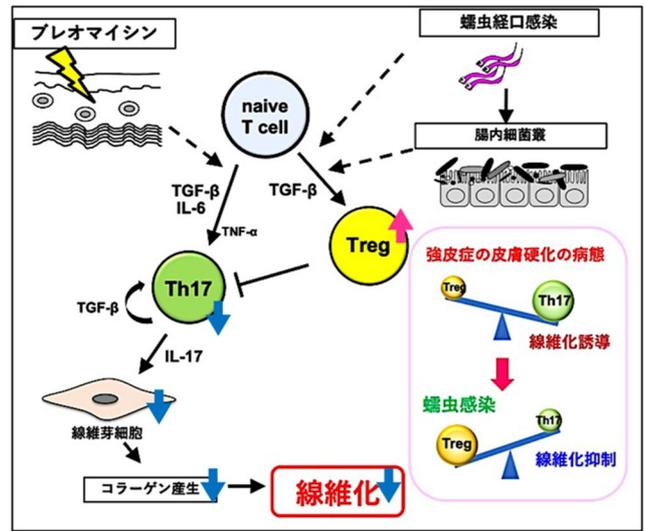


蠕虫を感染させたブレオマイシン誘導皮膚線維化マウス及び、強皮症患者の腸内細菌叢の変化を明らかにする。

我々は、蠕虫感染ブレオマイシン誘発強皮症マウスにおいて、腸内細菌叢の変化が抗線維化効果およびTh17/制御性T細胞バランスの調節に関連している可能性があるかと仮説を立てた。この仮説を確かめるために、ブレオマイシン誘発強皮症マウスの蠕虫感染の有無による糞便中の微生物叢を網羅的に解析した。その結果特徴的だったのは、*Bifidobacterium*がブレオマイシン処理で増加し、蠕虫感染で減少することであった。逆に、*Staphylococcus*はブレオマイシンで減少し、蠕虫感染で増加した。さらに、ブレオマイシン誘発強皮症マウスの、蠕虫感染による抗線維化効果やTh17/制御性T細胞バランスの制御に関与すると考えられる細菌を見つけるために、制御性T細胞数に着目し、相関のある細菌について調査した。その結果、制御性T細胞数は、*Unc. Enterobacteriaceae*, *Akkermansia*, *Unc. Rikenellaceae*, *Unc. Ruminococcaceae*と正の相関が見られた。次に、強皮症患者の腸内細菌叢の特徴を調べるために、36人の強皮症患者と20人の健常者の糞便中の微生物叢を調べ、比較した。その結果、びまん皮膚型強皮症、重症皮膚硬化、指尖潰瘍、間質性肺疾患などの特徴を有する強皮症患者は、他の強皮症患者や健常者と異なる腸内細菌叢を有していることが明らかになった。これらの結果より、腸内細菌叢の変化が強皮症のTh17/制御性T細胞のアンバランスや疾患の発症・進行に関与している可能性が示され、今後より詳細な検討が必要である。

本研究結果より、蠕虫により活性化した制御性T細胞が、プレオマイシン誘導皮膚線維化モデルマウスにおけるTh17/制御性T細胞バランス異常を正しく制御し、Th17細胞の働きが抑制されることで、皮膚線維化が抑制される可能性が示唆された（右図参照）。さらに、マウス及び強皮症患者の腸内細菌叢の検討により、腸内細菌叢の変化が強皮症におけるTh17/制御性T細胞のバランス異常に関与している可能性が示唆された。

Th17/制御性T細胞のバランス異常は強皮症の病態に関与している可能性があり、バランスを適切に制御することが新たな治療ターゲットとなることが期待できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

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

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