

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20770

研究課題名（和文）全身性エリテマトーデスにおける胸腺-腸管-迷走神経-脾臓ネットワークの解明

研究課題名（英文）The elucidation of the thymus-intestinal-vagus nerve-spleen network in systemic lupus erythematosus.

研究代表者

白柏 魅怜（Shirakashi, Mirei）

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：10934367

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：B6SKGはHRVの結果、B6WTに比べると副交感神経の活動性が高かった。B6SKGに迷走神経切断を行い切断群（Vx）と偽手術群（sham）に分けて、表現型について評価を行った。糸球体における免疫複合体沈着はVx群で弱く、抗ds-DNA抗体の上昇も軽度であった。FACSではTfhはVxで低い傾向であった。B6SKGはVxで2ARの発現が軽度の上昇を認め、血清中のNAdが高い傾向にあった。VxではB6SKGの糞便のLactobacillus属の減少を認めており、自律神経を介した腸内細菌とTCRシグナル異常によるT細胞分化異常の是正がSLEに寄与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患への迷走神経刺激術については疼痛や疲労などに対して検討されているが、疾患活動性に対する影響をみたものは多くなかった。今回、腸管の免疫に重要な役割を持つT細胞の伝達異常を背景にもつモデルで迷走神経切断を行ったところ、疾患活動性は改善した。このことは、遺伝的背景に応じて、自律神経に与える影響が異なることを示しており、どのような症例が自律神経に対する介入を行うべきかを検討する必要があることにつながる。今回、迷走神経を切断することで腸内細菌の変容を認めており、表現型も予想とは異なるものになった。胸腺におけるT細胞選択異常が、自律神経を介した腸管免疫にも影響を与えることがわかった。

研究成果の概要（英文）：In the HRV results, B6SKG exhibited higher parasympathetic activity compared to B6WT. B6SKG mice underwent vagotomy and were divided into a vagotomized group (Vx) and a sham-operated group (sham), and their phenotypes were evaluated. Immune complex deposition in the glomeruli was weaker in the Vx group, and the increase in anti-dsDNA antibodies was mild. FACS analysis showed a tendency for lower Tfh cells in the Vx group. B6SKG exhibited a slight increase in 2AR expression and a tendency for higher serum NAd levels in the Vx group. The Vx group also showed a decrease in the genus Lactobacillus in the feces of B6SKG, suggesting that the correction of T cell differentiation abnormalities due to TCR signal abnormalities through gut microbiota mediated by the autonomic nervous system contributes to SLE.

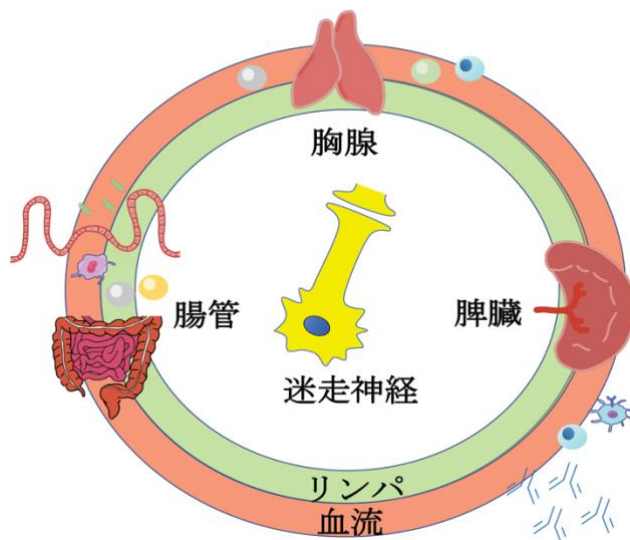
研究分野：自己免疫疾患

キーワード：自律神経 T細胞

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (SLE) は多臓器病変を呈する自己免疫疾患であり、遺伝的素因や環境因子の相互作用で発症する (Tsokos GC *Nat Immunol* 2020)。また、感染や紫外線といった外的因子により再燃と寛解を繰り返し、慢性炎症を来す (Fanouriakis A et al. *Ann Rheum Dis* 2021)。治療法としてはステロイドや免疫抑制薬があり、近年生物学的製剤の開発が進んでいる。しかし、副作用として感染症や骨粗鬆症、生活習慣病など数多くあり、しばしば問題となる。また、慢性炎症から疼痛や倦怠感が持続し QOL 低下に影響を与えている。近年、抗炎症作用を期待して、慢性炎症疾患に対して

図1 SLEの新たな免疫ネットワーク



迷走神経刺激療法 (VNS) が注目されている。VNS は難治性てんかんで確立された治療法であり、埋め込み型の電気刺激装置により左頸部迷走神経を刺激する (てんかん診療ガイドライン 日本神経学会 2018)。作用機序の一つとして、迷走神経を介した炎症性サイトカインの抑制が考えられている。迷走神経の分枝である脾臓神経が活性化されるとノルエピネフリンが産生される。ノルエピネフリンがコリンアセチルトランセフェラーゼ陽性 T 細胞を刺激し、分泌されたアセチルコリンがニコチン作動性アセチルコリン受容体に結合し、マクロファージの炎症性サイトカイン産生を抑制させることが示された (Tracey KJ et al. *Nat Rev Immunol* 2009)。また最近、腸管の末梢性制御性 T 細胞 (pTreg) の維持に迷走神経が関与しているという報告がなされた (Teratani et al. *Nature* 2020)。これまで、pTreg は腸内細菌の代謝産物に誘導されると考えられていたが (Furusawa Y et al. *Nature* 2013)、腸内細菌叢の情報が迷走神経肝臓枝求心路を介して脳幹に伝わり、左迷走神経背側運動核・左迷走神経遠心路を介する神経反射によってシグナルを受け pTreg が誘導、維持されていることがわかった (Teratani et al. *Nature* 2020)。この事から、VNS がもたらす免疫学的作用は、迷走神経の直接的な作用だけでなく、腸内細菌を介しても起きうる事が予想される。関節リウマチやシェーグレン症候群といった自己免疫性疾患に対して VNS による臨床試験が行われており、疼痛や倦怠感、一部の炎症性サイトカインの改善を認めている (Genovese MC et al. *Lancet* 2020, Tam J et al. *Neuromodulation* 2019)。近年、SLE についても VNS の臨床試験が行われ、疼痛や倦怠感、関節炎の改善を確認された (Aranow C et al. *Ann Rheum Dis* 2021)。上記臨床試験では免疫抑制剤で問題になる易感染性の報告はなく、新たな非薬物療法として期待できる。しかし、短期間の検討しかなされておらず、疾患活動性や抗体価は未評価で、詳細なメカニズムは未だ不明である。以上の背景より本研究の学術的な「問い」は、SLE において迷走神経と腸内細菌、免疫学的作用の連関を明らかにする事で VNS を長期的寛解維持療法として使用できないか? である (図 1)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SLEにおいて迷走神経と腸内細菌、免疫学的作用の連関を明らかにする事である。これまで数多くの分子標的薬や JAK 阻害薬で臨床試験が行われてきたが、そのうちの大半が失敗している。その要因は SLE が多因子疾患であることに起因しており、治療の層別化が求められている。SLE に対して VNS の治療応用を行うためには、迷走神経と腸内細菌における免疫学的作用の解明を行い、VNS が最適である患者を抽出できる事が重要である。上記目的を達成するために、申請者らが樹立した ZAP70 の点突然変異による T 細胞受容体 (TCR) シグナル伝達不全を背景に SLE を自然発症する B6SKG マウスを使用する (Matsuo T et al. *J Immunol* 2019)。SLE の原因として T 細胞受容体 (TCR) 伝達異常は数多く報告されており (Katsuyama T et al. *Front Immunol* 2018)、申請者が作製に関与した B6SKG マウスを使用する。また、申請者は B6SKG マウスを詳細に解析し、胸腺の T 細胞選択異常の結果、自己抗体の産生と腸内細菌叢の偏り (dysbiosis) を起こし、SLE を発症することを報告した (Shirakashi M, et al. *Arthritis Rheumatol* 2022)。このマウスを使用する事で、迷走神経が SLE 発症に及ぼす影響を、腸内細菌や胸腺の関連をふまえて明らかにしようと計画をした。

3. 研究の方法

1) 自律神経の活動性の評価

B6WT マウスと B6SKG マウスの自律神経の活動性を評価するために、血圧・心拍変動 (Heart Rate Variability:HRV) を非観血血圧測定装置 BP-98AL+HRV (鼻動脈波による心拍変動解析 PRV、株式会社ソフトロン) を用いて測定した。

2) 迷走神経切断術での評価

10-12週令の B6SKG マウスに対して、Sub-diaphragmatic Vagotomy を施行した。吸入麻酔下に開腹し、両迷走神経を同定して横隔膜下に切断した。切断群 (Vx) と偽手術群 (sham) に分けて、18-23週令にその表現型について評価を行った。体重については週に一回測定を行った。腎臓については免疫複合体の沈着について蛍光顕微鏡を (BZ-X810、キーエンス) を用いて定量的に評価、抗 ds-DNA 抗体については自作の ELISA を使って介入前後で測定した。脾臓をとってきて、Tfh 細胞をはじめとした T 細胞分化、B 細胞について FACS Fortessa で評価をした。

3) ノルアドレナリンの評価

B6WT と B6SKG の切断群 (Vx) と偽手術群 (sham) について、脾臓 CD4T 細胞における $\beta 2$ adrenergic receptor ($\beta 2AR$) を評価した。また、血清中のカテコラミン濃度について評価した (日研ザイル株式会社)。

4) 腸内細菌叢の評価

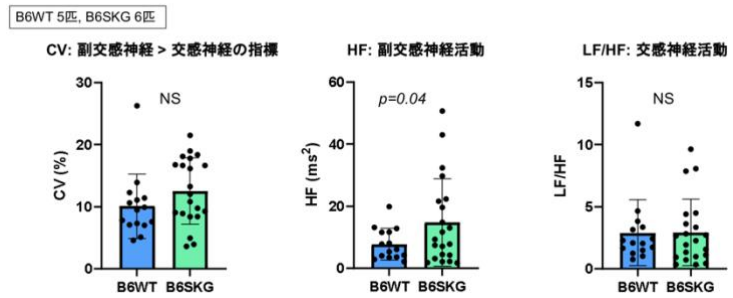
B6SKG の切断群 (Vx) と偽手術群 (sham) の腸内細菌叢について、16SrRNA 解析を行った。種の同定については BLAST を用いて行った (株式会社テクノスルガラボ)。

4. 研究成果

1) 自律神経の活動性の評価

B6SKG雌マウス (12週令)はHRVの結果、B6WT雌マウス(12週令)に比べると副交感神経の活動性が高いことがわかった。

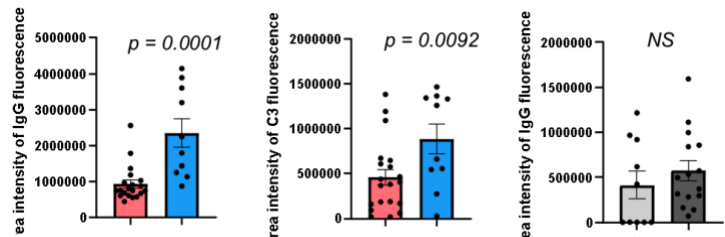
B6SKGの自律神経機能について、HRVを用いて定量的に評価



2) 迷走神経切断術での評価

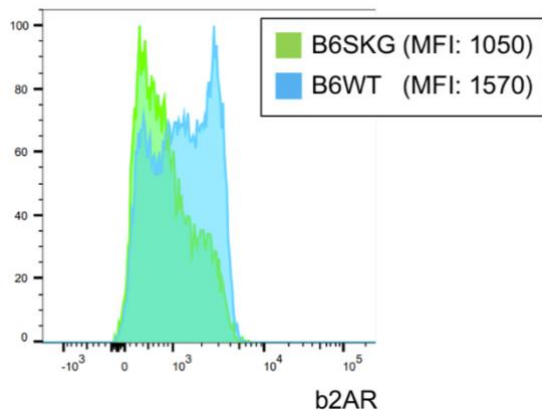
B6SKGマウスに迷走神経切断を行い、切断群 (Vx)と偽手術群 (sham)に分けて、18-23週令にその表現型について評価を行った。Vxは体重増加の推移が緩慢であったが、16週令になると逆転しより増加する傾向になった。B6SKGはB6WTに比べると処置前の貧血を認めていたが、Vx群では上昇しており、B6SKGにおいて

はVxで炎症が改善する傾向になることがわかった。糸球体における免疫複合体沈着 (IgG,C3)についてもVx群は弱く、WTでは処置前後での差は認めなかった (WTは元々沈着がない)。抗ds-DNA抗体の上昇も軽度であった。FACSではTfh、Th1はVxで低くなる傾向であったが、他のT細胞分画、B細胞では差を認めなかった。

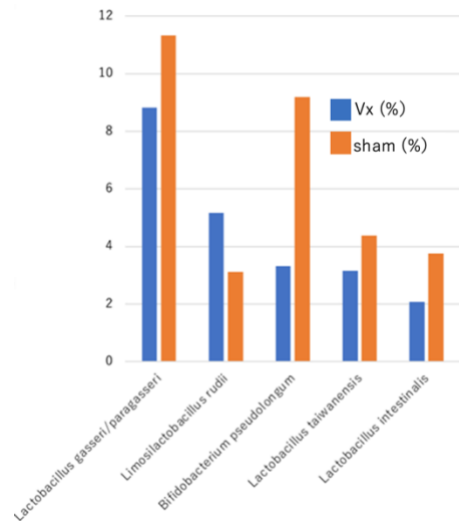


3) ノルアドレナリンの評価

脾臓では脾神経からノルアドレナリン (NAd)が分泌されてCD4 T細胞におけるβ2アドレナリン受容体に結合することがT細胞の活性化に関与している。B6SKGとB6WTマウスにおけるβ2ARの発現を検討したところ、B6SKGではβ2ARの発現が低かった。B6SKGのshamとVxと比較したところ、B6SKGではVxでβ2ARの発現が軽度の上昇を認めた。



次に血清中のカテコラミン3分画を検討したところ、B6SKGのVxはshamよりNAdが高くなっている傾向にあった。TCRシグナル異常によるT細胞分化異常はノルアドレナリンなどの神経伝達物質によって是正される可能性があることが示唆された。



4) 腸内細菌叢の評価

また、VxではB6SKGの糞便のLactobacillus属 (SLEでの報告が多い) の減少を認めていた。自律神経を介した腸内細菌バランスと脾臓におけるT細胞分化異常の是正がSLEの活動性に寄与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Shirakashi Mirei, Nishida Yuri, Nakashima Ran, Fujimoto Masakazu, Hiwa Ryosuke, Tsuji Hideaki, Kitagori Koji, Akizuki Shuji, Morinobu Akio, Yoshifuji Hajime	4. 巻 14
2. 論文標題 TAFRO syndrome is associated with anti-SSA/Ro60 antibodies, in contrast to idiopathic castleman disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-024-53413-5	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 Nishida Yuri, Shirakashi Mirei, Hashii Noritaka, Nakashima Ran, Nakayama Yoichi, Katsushima Masao, Watanabe Ryu, Onizawa Hideo, Hiwa Ryosuke, Tsuji Hideaki, Kitagori Koji, Akizuki Shuji, Onishi Akira, Murakami Kosaku, Yoshifuji Hajime, Tanaka Masao, Tsuruyama Tatsuaki, Morinobu Akio, Hashimoto Motomu	4. 巻 34
2. 論文標題 Pathogenicity of IgG-Fc desialylation and its association with Th17 cells in an animal model of systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 523 ~ 529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/mr/road054	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白柏魅怜
2. 発表標題 TCRシグナル伝達異常が引き起こす自己免疫と腸管免疫のクロストーク
3. 学会等名 Joint conference for clinical immunology（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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