

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461488

研究課題名(和文) 自己免疫疾患における腸管自然免疫を介したTリンパ球機能スペクトラムの制御

研究課題名(英文) Establishment of an immune regulation of T cell function through gut microbiota modulation

研究代表者

清水 潤 (Shimizu, Jun)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30509964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、免疫疾患「ベーチェット病(BD)」において末梢血T細胞分化異常を報告してきた。近年、同細胞の分化に腸内細菌叢が密接に関わるとの報告が相次いでいる。そこで同疾患における腸内細菌叢メタゲノミクスを実施した。結果は、BDにおいてActinobacteria門 - Bifidobacterium属系統が有意に優勢であり、逆に健康人では、Clostridia綱 - Megamonas属系統が優位であった。腸内細菌叢が何らかの機序でT細胞分化異常を生じさせているものと推察する。好ましくない腸内細菌叢の変化を「Dysbiosis」と呼ぶが、BDのDysbiosisの一つのパターンを発見したものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have reported that T cell differentiation was skewed in the peripheral blood of patients with Behcet's disease (BD). We hypothesized that gut microbiota of BD patients involved in the skewed T cell differentiation from a review of the literature. We conducted metagenomic analysis of microbiota using next generation sequencer. We showed that the phylum Actinobacteria and the genus Bifidobacterium were prevalent in BD patients with statistical significance. The order Clostridia and the genus Megamonas were prevalent in normal individuals with statistical significance. Bacterial diversity of each sample was comparable in BD patients and normal individuals and the two group's plots of PcoA had a significant distance as beta diversity. These data suggest that the compositional changes of gut microbes may be one type of dysbiosis (unfavorable microbiota alteration) in patients with BD. The dysbiosis may have an association with the pathophysiology of BD.

研究分野：内科学

キーワード：腸内細菌叢メタゲノミクス T細胞 ベーチェット病

1. 研究開始当初の背景

我々は、免疫疾患に分類される「ベーチェット病 (BD)」における Th17 細胞の過剰産生を示した (雑誌論文 7)。Th17 細胞は、IL-23 の存在下に IL-17 を分泌してマクロファージや好中球活性化をきたす、イフェクター系の Th 細胞サブセットである。細胞外細菌や真菌感染防御に重要な役割を果たしているが、自己免疫疾患での病原性を指摘され治療介入対象として注目されるようになった。マウスにおいては腸内に広く分布し、また特定の腸内細菌がその出現に関連するため、消化管免疫との関連が強いと考えられている。

これらの所見より、我々は BD における「腸内細菌叢メタゲノミクス」を実施することを決心した。この研究は現在までのところ、最もよく腸内細菌叢の菌種および菌遺伝子機能を反映すると考えられているものである。好ましくない腸内細菌叢の変化を「Dysbiosis」と呼ぶが、BD において Dysbiosis が存在し、末梢血 Th17 細胞増加を招いているという仮説に基づき研究を開始した。

2. 研究の目的

BD における健常人に比較した腸内細菌叢の変化の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 腸内細菌叢メタゲノミクス

腸内細菌叢メタゲノミクスは、腸内細菌叢を個々に分離培養することなく、細菌叢すべてのゲノム (メタゲノム) の配列情報をシーケンシングする方法である。従来の 16S rRNA 解析と組み合わせることにより、構成細菌の種類とその遺伝子機能が解析可能である。

具体的には東京大学の服部正平らより開発されたユニバーサルプライマーを使って、PCR 法にて細菌ゲノムを増幅した後にライブラリを作成し配列解析する。

(2) 便中分泌型 IgA 濃度の測定

ELISA にて測定した。

(3) 解析

コロラド大学の開発したオープンソースソフト Qiime と、ハーバード大学で開発された PICRUST の二種類を用途に応じて使い分けた。

4. 研究成果

(1) 菌種解析 (雑誌論文 1)

BD において Actinobacteria 門 - Bifidobacterium 属系統が有意に優勢であった。逆に健常人では、Clostridia 綱 - Megamonas 属系統が優位であった。ベーチェット病における有意な Lactobacillus の上昇も観察されている。

一般に菌叢変化の主要な規定因子としては、流入するエネルギー源 (主には食事) に対応する機能遺伝子の多寡と、低 pH や高濃度胆汁酸等の悪環境への抵抗力の有無が考察されている。腸内細菌叢は発酵によって食

物繊維等から短鎖脂肪酸 (酢酸、酪酸、プロピオン酸) を産生し、これらは菌自体および腸管上皮細胞のエネルギー源として重要である。前述したように Bifidobacterium や Lactobacillus は乳酸産生によって腸管内の主要な pH 規定菌である。また、Clostridia 綱には乳酸を利用して酪酸やプロピオン酸を産生する菌を多く含むが、低 pH にて減少する。すなわち Bifidobacterium や Lactobacillus の増加等で低 pH が生じると、腸内細菌叢の乳酸利用と酪酸産生が急激に減ることが示されており、Dysbiosis の原因になり得ると考えられている。我々はこの機序がベーチェット病での腸内細菌叢に働いているのではないかと考えている。実際にベーチェット病腸内細菌叢メタゲノミクスでは (Autoimmun Rev. 2015;14:269-76.)、腸内酪酸濃度の低下が観察されており、我々の仮説を裏付けている。

(2) 便中分泌型 (雑誌論文 1)

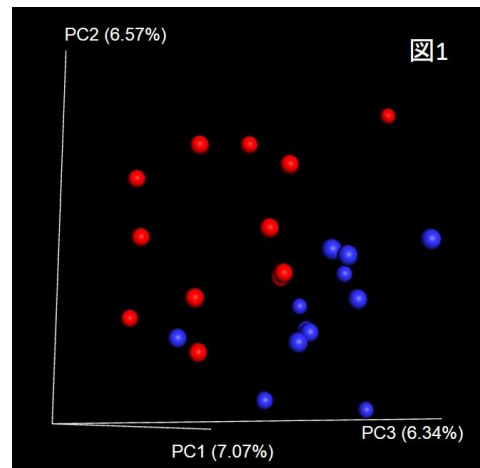
BD にてコントロールに比較して有意に上昇していた。総体としての粘膜免疫の異常を示しているものと考えている。

(3) 多様性 (雑誌論文 1)

これは、各個人内での菌多様性を評価する。一般的に疾患では多様性が低下すると考えられている。今回の検討では、BD と健常人の間に有意差は観察されなかった。

(4) 多様性 (雑誌論文 1)

これは、各群の多様性、すなわち群間の違い = 距離を評価するものである。実際には、各サンプルの菌種構成を主座標分析にて計算し、3 次元にプロットする (図 1、BD: 赤、健常人: 青)。探索的な検討ではあるが、Student-T 検定にて有意差があり ($P < 0.05$)、BD および健常人群の差は明らかと判断した。



(5) 菌遺伝子機能 (雑誌論文 2)

主要な優勢菌遺伝子機能を、BD および健常人別に表 1 に示す。

健常人では、菌の移動に関する遺伝子が上

昇していた。また、BD では解糖系・糖新生と脂肪酸代謝経路の遺伝子が上昇していることが注目された。近年、T 細胞活性化に細胞内代謝の検討が重要であることが報告されており、その中心的な役割を果たしているのがグルコースと脂肪酸である (J Exp Med. 2015;212:1345-60.)。我々のデータもこれらの分子を介した、腸内細菌叢とT細胞分化の密接な関連を示すものかもしれないと考えている。

表1 BD および健常人にて優位な菌遺伝子機能

BD	健常人
リポ酸代謝経路	菌走化性経路
解糖系・糖新生経路	鞭毛構築経路
脂肪酸代謝経路	ビオチン代謝経路
不飽和脂肪酸生合成経路	LPS 生合成経路
イノシトールリン酸代謝経路	ポルフィリン・クロコフィル代謝経路

(6) メタゲノミクスでのパラメータと臨床パラメータの比較 (雑誌論文1)

菌頻度および便中分泌型 IgA 濃度を、疾患活動性指標、血中 CRP 濃度、経口薬量といった臨床パラメータと比較した。優位菌頻度と相関する傾向にはあったが、有意差は認められなかった。これは関節リウマチの結果とは対照的であり (優位菌が CRP と相関、Elife. 2013;2:e01202) それぞれの疾患の病態を反映したものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 19 件)

1. Shimizu J, Kubota T, Takada E, Takai K, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Bifidobacteria Abundance-Featured Gut Microbiota Compositional Change in Patients with Behcet's Disease. PLoS One. 2016 ;11(4): e0153746. doi: 10.1371/journal.pone.0153746. 査読有
2. 清水 潤、久保田孝雄、鈴木 登. ヒトアレルギー・免疫疾患における Th17 細胞異常と腸内細菌叢 Dysbiosis. アレルギーの臨床 2016; 36(2): 147-152. 査読無
3. Shimizu J, Oka H, Yamano Y, Yudoh K, Suzuki N. Cutaneous manifestations of patients with relapsing polychondritis: an association with extracutaneous complications. Clin Rheumatol. 2016 Mar;35(3):781-3. 査読有
4. Shimizu J, Oka H, Yamano Y, Yudoh K, Suzuki N. Cardiac involvement in relapsing polychondritis in Japan. Rheumatology (Oxford). 2016

- Mar;55(3):583-4. 査読有
5. Shiratsuchi T, Misawa H, Saito A, Shimizu J, Iinuma M, Fujiwara N, Takai K, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Beppu M, Suzuki N. Sonic Hedgehog Supplementation Rapidly Regulates Myogenesis in Human Induced Pluripotent Stem Cells. St. Marianna Medical Journal. 2015 in press. 査読有
6. Fujiwara N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Cellular and molecular mechanisms of the restoration of human APP transgenic mouse cognitive dysfunction after transplant of human iPS cell-derived neural cells. Exp Neurol. 2015 Jul 18;271:423-431. 査読有
7. Shimizu J, Takai K, Takada E, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Possible association of proinflammatory cytokines including IL1 and TNF with enhanced Th17 cell differentiation in patients with Behcet's disease. Clin Rheumatol. 2015 May 14. [Epub ahead of print] 査読有
8. Iinuma M, Umehara T, Arimitsu N, Shimizu J, Misawa H, Takai K, Fujiwara N, Fijii A, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Hirotsu C, Beppu M, Suzuki N. Induction of neural cells with spinal motoneuron phenotype from human iPS cells and the transplantation to totally transected spinal cords in mice. Inflammation and Regeneration 35(3):154-163;2015. 査読有
9. Suzuki N, Shimizu J, Hirotsu C, Takada E, Arimitsu N, Ueda Y, Fujiwara N, Suzuki T, Takai K. Generation of Retinal Progenitor Cell Sheets which Differentiate into Rhodopsin Positive Photoreceptors from Mouse iPS Cell Derived Retinal Progenitor Cell Clones. International Journal of Ophthalmology and Clinical Research 2:1;2015 査読有
10. Suzuki N, Shimizu J, Oka H, Yamano Y, Yudoh K. Neurological Involvement of Relapsing polychondritis in Japan: An Epidemiological Study. Inflammation and Regeneration 34(4):206-208;2014 査読有
11. Misawa H, Saito A, Shimizu J, Iinuma M, Shiratsuchi T, Fujiwara N, Takai K, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Beppu M, Suzuki N. Pax7 Gene Induction Rapidly Regulates Myocyte Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells. St. Marianna Medical Journal. 5:59-67; 2014 査読有
12. Maruyama T, Shimizu J, Suzuki N. T cell protein tyrosine phosphatase (TCPTP) regulates phosphorylation of Txk, a tyrosine kinase of the Tec family.

- Inflammation and Regeneration 34(5):240-246;2014 査読有
13. Oka H, Yamano Y, Shimizu J, Yudoh K, Suzuki N. A large-scale survey of patients with relapsing polychondritis in Japan. *Inflammation and Regeneration* 34(3):149-156;2014 2014.9. 査読有
 14. Sato T, Yamano Y, Tomaru U, Shimizu Y, Ando H, Okazaki T, Nagafuchi H, Shimizu J, Ozaki S, Miyazawa T, Yudoh K, Oka H, Suzuki N. Serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a biomarker of disease activity in relapsing polychondritis. *Modern Rheumatology* 2014.1. 24(1):129-136. doi: 10.3109/14397595.2013.852854. 査読有
 15. Kono T, Arimitsu N, Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Umehara T, Saito A, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Hashimoto T, Tanaka Y, Suzuki N. Human iPS Cell Derived Neurons with Cortical Motor Neuron Phenotype are Relevant for Functional Recovery of Hemiplegic Mice with Injured Motor Cortex. *St.Marianna Medical Journal* 2013.12 4(2): 31-40. 査読有
 16. Umehara T, Arimitsu N, Iinuma M, Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Saito A, Kono T, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Moroe Beppu, Suzuki N. Transplantation of Motor Neurons Derived from Human iPS Cells into Total Transection Model of Spinal Cord Injury in Mice. *St.Marianna Medical Journal* 2013.12 4(2): 21-30. 査読有
 17. Saito A, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Arimitsu N, Umehara T, Kono T, Misawa H, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Moroe Beppu, Suzuki N. IGFII/Akt Signaling Regulates Myocyte Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells. *St.Marianna Medical Journal* 2013.12 4(2): 41-48. 査読有
 18. Fujiwara N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Saito A, Kono T, Umehara T, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Restoration of spatial memory dysfunction of human APP transgenic mice by transplantation of neurons derived from human iPS cells. *Neuroscience Letters*. 2013. 557:129-134. pii: S0304-3940(13)00947-6. doi: 10.1016/j.neulet.2013.10.043. 査読有
 19. Shimizu J, Kaneko F, Suzuki N. Skewed Helper T-Cell Responses to IL-12 Family Cytokines Produced by Antigen-Presenting Cells and the Genetic Background in Behcet 's Disease. *Genet Res Int* 2013;2013:363859.

doi.org/10.1155/2013/363859 査読有

〔学会発表〕(計2件)

1. 清水潤、久保田孝雄、鈴木登 ベーチェット病における Bifidobacterium 属優位の特徴的な腸内細菌叢 第60回日本リウマチ学会学術集会(2016年4月21日~4月23日、パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市)
2. 清水潤、鈴木登 ベーチェット病ヘルパーT細胞に及ぼす IL-12 ファミリーサイトカインの影響 第58回日本リウマチ学会学術集会(2016年4月24日~4月26日、グランドプリンスホテル新高輪、東京都・港区)

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.marianna-u.ac.jp/gakunai/immunmed/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 潤 (Shimizu Jun)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 30509964

(2)連携研究者

高井 憲治 (Takai Kenji)

聖マリアンナ医科大学・医学部・(客員)教授

研究者番号: 60121167

藤原 成芳 (Fujiwara Naruyoshi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号: 50365425

有光 なぎさ (Arimitsu Nagisa)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40408688

高田 えりか (Takada Erika)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号: 90398959

廣津 千恵子 (Hirotsu Chieko)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号: 90647174