

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850090

研究課題名(和文)腸内細菌による中枢神経系炎症制御メカニズムの解析

研究課題名(英文)Mechanisms of effects of gut microbiota on inflammation in the central nerve system

研究代表者

宮内 栄治(Miyauchi, Eiji)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・訪問研究員

研究者番号：60634706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)マウスを用いて、中枢神経系炎症の発症に寄与する腸内細菌の探索を行った。その結果、EAEが抑制されたマウスの小腸においてErysipelotrichaceae科の菌株が減少することを見出した。本菌株をマウスから単離培養し、無菌マウスに定着させたところ、EAE症状が悪化することを確認した。本菌株は小腸においてバイオフィルムを形成し、小腸上皮に付着することで炎症反応を促進し、さらにはEAEにおける自己抗原特異的T細胞の病原性を高める可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the gut microbes which are involved in the progression of inflammation in central nerve system using Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) mice, animal model of multiple sclerosis. It has shown that Erysipelotrichaceae strain was significantly decreased in the mice with reduced EAE susceptibility. So we isolated the Erysipelotrichaceae strain from mice, and inoculated to germ free mice. The mice colonized with only Erysipelotrichaceae strain showed increased EAE severity compared to germ free mice, meaning that this bacterium have pathogenic roles in EAE. Further, we found that this bacterium forms biofilm and attaches to epithelial cells in the small intestine, and this might lead to the increased pathogenicity of antigen-specific T cells.

研究分野：農学

キーワード：腸内細菌 多発性硬化症 Th17 EAE

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢はヒトの健康維持に有用であると同時に有害な面があることも明らかになってきている。いわゆる悪玉菌の増加は癌・糖尿病・高血圧・心臓病などの生活習慣病、アレルギー・炎症性腸疾患などの免疫疾患や各種感染症を誘発し、老化との関連も示唆されている。さらに近年、多発性硬化症といった神経免疫疾患においても、その発症・進行に腸内細菌が関与していることが明らかになってきた (Lee, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2011; Berer et al., Nature, 2011)。しかしながら、腸内細菌がどのような作用機序で中枢神経系の炎症反応に関わっているのか、すなわち宿主中枢神経系 - 腸内細菌間相互作用の科学的根拠は乏しいのが現状であった。

われわれは、ミエリンペプチドに自己応答性を持つ多発性硬化症モデル動物 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) に各種抗生物質 (Ampicillin, Vancomycin, Neomycin, Metronidazole) を投与した結果、EAE 病態発症が促進または抑制されることを見出している。これらの結果は、腸内細菌叢の変化を含む腸内環境変動が、多発性硬化症の発症および抑制の両方に寄与していることを示唆している。さらに、16S rRNA メタシーケンスの結果、EAE 病態発症抑制されたマウス腸内細菌は、*Bacteroides* 属が有意に増加していることを確認している。一方で、EAE 病態発症が促進されたマウスでは、*Barnesiella* 属が増加していた。さらに、腸管粘膜固有層においてミエリンペプチド特異的な免疫応答が確認できたことから、ある種の腸内細菌が中枢神経系炎症に関与する免疫細胞を腸管において制御していることが示唆された。これらの予備検討結果をもとに、上記オーミクス解析手法を応用すれば、腸内細菌による中枢神経系の免疫制御機構の分子メカニズムを明らかにでき、その分子機構を基盤とする腸内細菌をターゲットとした神経免疫疾患の予防・治療法開発にもつながると考えられる。

2. 研究の目的

これまでの研究において、ある種の腸内細菌が多発性硬化症モデルにおける病態発症に関与していることが明らかにされている。Segmented filamentous bacteria (SFB) などの腸内細菌が腸管免疫を活性化することで症状悪化に加担することが示されたが (Lee, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2011)、SFB 以外の菌の関与も指摘されており (Berer et al., Nature, 2011)、また、腸管免疫と中枢神経系の炎症との関わりについても詳細は明らかになっていない。そこで本研究提案では、「どのような腸内細菌が」「どのようなメカニズムで」中枢神経系炎症を制御しているのか、腸内細菌側に主に焦点をあてて解析を試み

る。

われわれはこれまでに、多発性硬化症モデルマウスに各種抗生物質投与することで腸内細菌叢を変動させ、多発性硬化症に対する感受性が変化することを見出しており、それらの菌叢の特徴を明らかにしている (感受性の変化は SFB 非依存的である)。このように、抗生物質投与・非投与による 5 つの特徴的な腸内細菌叢データとそれらの病態変化データを取得しており、相関解析および特定菌株定着マウス (exGF マウス) を用いた解析により、「どのような腸内細菌が」関与しているのか、その同定が可能であると考えられる。

また、本モデルマウスでは小腸においてミエリンペプチド特異的な免疫応答が活性化していることを見出している。このことから、腸内細菌による腸管でのミエリンペプチド特異的な免疫応答の制御が、病態変化に重要な役割を果たしているを示唆している。これらのデータをもとに、「どのようなメカニズムで」腸内細菌がミエリンペプチド特異的な免疫応答を制御するのか、菌活性成分の同定も含めて解明を試みる。以上の解析により、腸内細菌をターゲットとした中枢神経系炎症反応の新規予防・治療法の確立に展開するための基盤が構築されると期待でき、中枢神経系炎症抑制に適した機能性食品やプレバイオティクスの開発などに発展すると考えられる。

3. 研究の方法

マウスに Ampicillin, Vancomycin, Neomycin, Metronidazole をそれぞれ 1 週間自由摂取させることで、人為的に腸内細菌叢を変動させた。これらのマウスにミエリンペプチド (MOG) を免疫し EAE を発症誘導した。EAE 症状は尾および四肢の麻痺をもとに毎日評価するとともに、脊髄における脱髄をもとに評価した。また、脾臓および小腸粘膜固有層からリンパ球を単離し MOG 存在下で培養後、上清中のサイトカイン濃度または細胞増殖アッセイにより、MOG 特異的な免疫応答を解析した。

抗生物質を投与したマウスの小腸内容物から細菌 DNA を抽出し、16S rDNA の V4 領域を PCR により増幅した。得られたライブラリを次世代シーケンサー Mispseq を用いてシーケンシングを行った。取得したシーケンスデータは Mothur ソフトウェアを用いてクオリティーフィルタリング、キメラ除去、アノテーション、および OTU の作成を行った。また、単離した菌株からゲノム DNA を単離し、ゲノムシーケンシングを Mispseq を用いて行った。得られたシーケンスは sickle, SPADes、および RAST を用いてそれぞれクオリティーフィルタリング、アセンブル、およびアノテーションを行った。

4. 研究成果

各種抗生物質を投与したマウスに EAE を

発症誘導した結果、Ampicillin 投与マウスのみで EAE の発症が抑制された。本マウスにおいては、脊髄における脱髄、さらには脊髄への Th1/Th17 細胞の浸潤が抑制されており、中枢神経系炎症が緩和されていることが確認できた。また、脾臓および小腸粘膜固有層における MOG 特異的免疫応答も Ampicillin 投与により抑制された。一方、Ampicillin を飲水投与ではなく腹腔内投与したマウスではこれらの抑制効果を確認することが出来なかった。以上の結果から、MOG 特異的免疫応答、さらには中枢神経系炎症の促進に加担する菌が Ampicillin 投与により減少したのではないかと考えられた。

そこで、各抗生物質を投与したマウス小腸内容物の菌叢解析を行い、多変量解析により Ampicillin 投与マウスでのみ有意に減少する菌を探索した。その結果、*Erysipelotrichaceae* 科の菌株が Ampicillin 投与マウスでのみ有意に減少することが示された。一方、前述の予備検討でみられた *Bacteroides* および *Barnesiella* の変動は、今回確認することが出来なかった。これは、腸内容物からの細菌 DNA 抽出方法を変更したためだと考えられた。*Erysipelotrichaceae* 科の腸内細菌は近年、肥満や炎症性腸疾患など、他の炎症性疾患への関与が予想されている。以上の結果から、本菌株が EAE においても炎症促進に寄与しているのではないかと予想された。

上記菌叢解析で着目した *Erysipelotrichaceae* 科の菌株をマウス小腸から単離培養することに成功した。続いて、無菌マウスに投与することで本菌株のみが定着したモノアソシエイトマウスを作製した。本マウスに EAE を発症誘導した結果、無菌マウスおよび *Lactobacillus* 菌株のみ定着したマウスに比べ、重篤な EAE を発症することが確認された。*Erysipelotrichaceae* 科定着マウスでは、脾臓および小腸粘膜固有層における MOG 特異的免疫応答も活性化しており、本菌株が自己免疫応答を促進することが示唆された。

さらに、本菌株が自己免疫応答を促進するメカニズムの解析を試みた。本菌株定着マウス小腸において、serum amyloid A および IL-23 の mRNA 発現が亢進していることを確認した。これらは Th17 細胞の pathogenicity を増加させることが確認されている。従って、今回単離した *Erysipelotrichaceae* 科の菌株は、serum amyloid A および IL-23 発現を誘導することで MOG 特異的 Th17 細胞を活性化することが考えられた。実際、EAE マウス由来の脾細胞を serum amyloid A または IL-23 で刺激した場合、MOG 特異的 T 細胞の pathogenicity が増加することを確認することができた。

これまでの研究で、SFB は小腸において serum amyloid A および IL-23 を誘導することが報告されている。SFB は腸管上皮細胞に一端を挿入することで上記の作用を発揮すると考えられている。今回単離した

Erysipelotrichaceae 科のみ定着させたマウスの小腸組織を走査型電子顕微鏡で観察したところ、本菌株はバイオフィームを形成することで上皮細胞に接着することが示唆された。実際、本菌株のゲノム解析の結果から、細胞外多糖合成に関わる遺伝子群が多数確認された。これらの結果から、今回単離された *Erysipelotrichaceae* 科の菌株は、バイオフィームを形成することにより腸管上皮細胞に接着し、これにより serum amyloid A や IL-23 の発現を誘導することが示唆された。これにより、MOG 特異的 Th17 細胞の pathogenicity が増加し中枢神経系炎症が促進されるのではないかと考えられる。

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 4 件)

1. High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice. Okai S, Usui F, Yokota S, Hori-I Y, Hasegawa M, Nakamura T, Kurosawa M, Okada S, Yamamoto K, Nishiyama E, Mori H, Yamada T, Kurokawa K, Matsumoto S, Nanno M, Naito T, Watanabe Y, Kato T, Miyauchi E, Ohno H, Shinkura R. Nat Microbiology in press (2016). 査読有
2. Plasmodium berghei ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis. Taniguchi T, Miyauchi E, Nakamura N, Hirai M, Suzue K, Imai T, Nomura T, Handa T, Okada H, Shimokawa C, Onishi R, Olia A, Hirata J, Tomita H, Ohno H, Horii T, Hisaeda H. Sci. Rep. 5, 15699 (2015) 査読有
3. 宮内栄治 腸内細菌による多発性硬化症の制御、医学のあゆみ 253 巻 5 号 445-450 (2015) 総説 査読無
4. 宮内栄治、田辺創一、大野博司 ビフィズス菌による Th17 細胞の制御、臨床免疫・アレルギー科 62: 140-146 (2014) 総説、査読無

[学会発表](計 6 件)

1. 宮内栄治、大野博司、フラクトオリゴ糖による腸内細菌叢修飾の Biogeographic 解析。日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
2. MIYAUCHI Eiji, KIM Seok-Won, OHNO Hiroshi, The role of gut microbiota in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. 第 44 回日本免疫学

- 会学術集会、2015年11月20日、札幌
コンベンションセンター(北海道・札幌
市)
3. OKAI Shinsaku, USUI Fumihito,
HASEGAWA Makoto, NAKAMURA
Toshinobu, YAMAMOTO Kazuya,
NISHIYAMA Eri, MORI Hiroshi,
YAMADA Takuji, KUROKAWA Ken,
KATO Tamotsu, MIYAUCHI Eiji,
OHNO Hiroshi, SHINKURA Reiko,
High-affinity, poly-reactive IgA is
required for gut homeostatic
maintenance to prevent colitis in mice.
第44回日本免疫学会学術集会、2015
年11月19日、札幌コンベンションセ
ンター(北海道・札幌市)
 4. 川崎吾子、宮内栄治、川住雅美、森田英
利、大野博司、ビフィズス菌による大腸
炎抑制効果とメカニズム解析、日本農芸
化学会2015年度大会、2015年3月
27日、岡山大学(岡山県・岡山市)
 5. 宮内栄治、腸内細菌による中枢神経系の
制御、HiHA第3回Workshop、2014
年12月26日、広島大学(広島県・東
広島市)
 6. 宮内栄治、鈴木卓弥、大野博司、田辺創
一、Bifidobacterium longumによる腸
管上皮を介した大腸炎抑制メカニズム
の解析、第68回日本栄養・食糧学会大
会、2014年5月31日、酪農学園大学
(北海道・江別市)

〔その他〕

ホームページ等

[http://leib.rcai.riken.jp/riken/index.h
tml](http://leib.rcai.riken.jp/riken/index.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮内 栄治(Miyauchi Eiji)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・訪問研究員

研究者番号：60634706

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし