

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860747

研究課題名(和文) 関節炎の発症及び進展における腸内細菌叢の役割の解明

研究課題名(英文) The role of microbiota on the initiation and development of arthritis developed in IL-1ra^{-/-} mice

研究代表者

藤井 博 (FUJII, HIROSHI)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：20596895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸管細菌がリウマチの発症、進展に関与する可能性が示唆されており、抗生剤長期投与がリウマチモデルマウスであるIL-1ra欠損マウスの腸内細菌叢、及び関節炎に与える影響を検討した。生後すぐに抗生剤を投与したところ、腸内細菌DNAは8%に減少し、関節炎が改善したが一時的であった。関節の好中球、マクロファージの減少が認められ、関節内のケモカインCXCL1、MIP-1 α 、RANTES濃度が有意に低下した一方、IL-17A濃度に変化は認めなかった。10週齢から抗生剤を投与した群では関節炎は改善しなかった。抗生剤による腸内細菌の修飾を関節炎に治療応用するには投与時期、期間も重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Microbiota may influence initiation and development of arthritis. We investigated the influence of long term anti-biotics (ABx) use on microbiota and the course of arthritis developed in IL-1ra^{-/-} mice. ABx was given in the drinking water after weaning. ABx treatment reduced total bacteria to 8 percent and arthritis showed temporary improvement, accompanying decrease of intra-articular neutrophil and macrophages. The reduction of inflammatory cells were explained by decreased intra-articular cytokines and chemokines such as CXCL1, MIP-1 α , and RANTES, but not IL-17A. The mice treated with ABx after development of arthritis did not show improvement of arthritis. These results indicate importance of timing and interval of ABx treatment when we apply ABx to modulation of microbiota for treatment of arthritis.

研究分野：膠原病

キーワード：腸内細菌 関節炎

1. 研究開始当初の背景

RA は、関節滑膜を病変の首座とする原因不明の慢性炎症性疾患であり、全人口の約 1% に発症し、関節痛、骨破壊のため ADL や生命予後の悪化をきたす。RA の原因として HLA などの遺伝要因、喫煙やストレスなど環境要因、また微生物の影響などが考えられているが、病態の解明は十分ではない。近年腸内細菌叢により宿主の免疫系が形成され、細菌叢のバランスが崩れることで自己免疫疾患が引き起こされる可能性が指摘されている。RA においては特定の enterotype が存在することが報告されており (Arthritis Rheum 62: suppl.10, 2010) 抗生剤の使用により RA の罹患率が低下したという報告 (Arthritis Rheum 62: 1576-1582, 2010) 歯周病を治療するとリウマチの活動性が低下したという報告 (J Clin Rheumatol 13: 134-137, 2007) など細菌と RA について強く関連が示唆されているが、その詳細な機構は不明な点が多い。

IL-1ra 欠損マウスは生後 8 週頃より多発関節炎を自然発症し、20 週にかけて RA に酷似するパンヌス形成、骨破壊を伴う関節炎をきたす (J Exp Med 191: 313-320, 2010)。このマウスは Germ free の環境では関節炎を発症しないことから (J Clin Invest 118: 205-216, 2008)、本モデルにおける関節炎の発症には腸内細菌叢が関わっていることが示唆されている。我々は IL-1ra 欠損マウスにおいて CCR2 を欠損させると関節炎が増悪することを世界で初めて報告した (Arthritis Rheum 63: 96-106, 2011)。これまでの検討では、すでに関節炎を発症する時期において腸内細菌叢を検討しているため、観察された腸内細菌叢の変化の関節炎発症機構における病因的意義は明確ではない。一方、腸管マクロファージは腸内細菌を貪食し、粘膜固有層の樹状細胞が抗原提示細胞として働き、獲得免疫へとシグナルが伝達される。貪食される微生物により、Th1、Th2、Th17、Treg のシフトが変化する (Nat Rev Immunol 9: 313, 2009)。CCR2 を欠損することで腸管のマクロファージや樹状細胞の構成が変化し、腸管細菌叢による獲得免疫が修飾を受ける可能性が考えられる。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では IL-1ra 欠損マウス・IL-1ra-CCR2 重複欠損マウスでの腸内細菌叢さらには腸管免疫機能を関節炎の発症・進展と対比検討することを通して、腸内細菌叢・腸管免疫の RA の発症および進展における役割を解明することを目指す。さらに、これらの解明を通して、腸内細菌叢を標的とした RA 治療法の可能性も検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス糞便細菌叢の PCR 法による定量
関節炎発症前の 3 週齢から 20 週齢まで経時的に野生型マウス、CCR2 欠損マウス、IL-1ra 欠損マウス、IL-1ra-CCR2 重複欠損マウスより糞便を採取した。糞便からの DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出し、Balb/c マウスの主要な腸内細菌叢及び関節炎と関連が疑われる細菌である細菌 (群) (以下) に対する特異的プライマーを用いて、PCR 法にて細菌 (群) を定量し、比較検討した。

1. Bacteroides group
2. Firmicutes
3. Lachnospiraceae
4. Clostridium coccoides group
5. Clostridium leptum
6. Lactobacillaceae
7. Segmented filamentous bacteria
8. Bifidobacterium

(2) 抗生剤投与による関節炎の予防及び治療実験

3 週齢あるいは 10 週齢の IL-1ra 欠損マウスをドリペネム 0.25g/L 及びバンコマイシン 0.5g/L で給水し、自由飲水とした。抗生剤は 24 週齢まで継続した。関節炎スコア、ノギスによる関節径の測定、体重測定、CT による骨密度の測定、継時的な関節の組織学的評価を行った。菌量の確認のため盲腸壁を含めた盲腸内容物採取した後、DNA を採取し、リアルタイム PCR を行った。全細菌については大腸菌 K12-MG1655 をリファレンスの細菌として、糞便グラムあたりの total bacteria のコピー数を求めた。SFB について一つのサンプルをスタンダードとして、相対的な遺伝子発現量を算出した。

(3) 関節免疫担当細胞の構成及び機能評価
抗生剤投与後 IL-1ra 欠損マウスの糞便を採取する時期に合わせ関節組織を採取し、関節組織より single cell suspension を作成し、フローサイトメトリー法による細胞分画の解析を行った。

(4) サイトカイン測定

四肢関節を採取後、RIPA バッファーでホモジナイズしたあとに遠心し、関節液上清を採取した。関節液上清および血清のサイトカイン濃度を測定した。GM-CSF, IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, TNF, CXCL1, MCP-1, MCP-3, MIP1, MIP1 β を測定した。タンパク濃度を測定し、サイトカイン濃度は pg/mg(protein) で算出した。

4. 研究成果

(1) マウス糞便細菌叢の PCR 法による定量
IL-1ra-/-CCR2-/-マウスにおいて、4 週齢、20 週齢共に Bacteroidetes、Firmicutes は DNA の比率が減少しており、Clostridium

coccioides は DNA の比率が増加していた。しかし、WT と CCR2、IL-1ra^{-/-} と IL-1ra^{-/-}CCR2^{-/-} マウスで一致した増減が認められた菌は同定できなかった。20 週齢の IL-1ra^{-/-} マウスと IL-1ra^{-/-}CCR2^{-/-} マウス各 10 匹の関節炎スコアと細菌 DNA の比率に相関があるカスピアマン順位相関係数検定をおこなった。いずれの菌 DNA も関節炎スコアと相関が認められないと判断された。SFB の DNA 量と関節炎の p 値は 0.066 であり、関節炎と関連する傾向が認められた。

(2) 抗生剤投与による関節炎の予防及び治療実験

盲腸壁及び内容物における total bacteria DNA は抗生剤を 3 週あるいは 10 週に開始しても開始後 8% 以下に減少していた。SFB の DNA 量は抗生剤投与で明らかな変化は見られなかった。関節炎発症前 (3 週齢) に抗生剤を投与すると 8 週から 15 週まで一時的に関節炎スコアが改善した。一方、発症後投与では関節炎はむしろ増悪した。(図 1) 発症前から抗生剤を投与したところ、12 週から 16 週まで骨密度が改善した。発症後から抗生剤を投与した群では骨密度は改善しなかった。発症前投与では、12 週齢において細胞浸潤、骨破壊、軟骨破壊スコアの改善がみられた。発症後投与では改善しなかった。

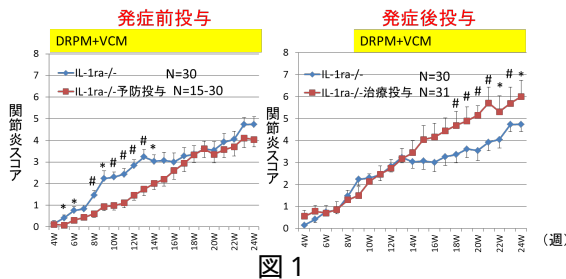


図 1

(3) 関節免疫担当細胞の構成及び機能評価

発症前投与では、12 週で関節内の好中球、T リンパ球、マクロファージ、樹状細胞の減少が認められた。経過を通して T リンパ球の減少がみられた。発症後投与では 12, 20 週で好中球、12, 16, 20 週でマクロファージの増加が認められた。(図 2)

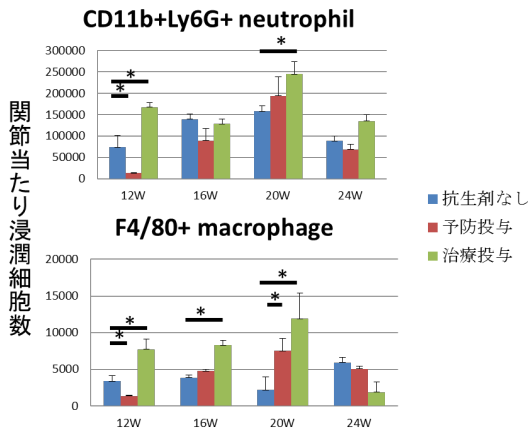


図 2

(4) サイトカイン測定

発症前投与における関節内好中球減少時期と一致して、関節内 CXCL1 の減少が認められた。発症後投与では好中球増加時期と一致して CXCL1 の増加が認められた。IL-17 について有意な変化はみられなかった。発症後投与群において、M の増加と一致して MCP-3、MIP-1、MIP-1 が抗生剤非投与群と比較して上昇していた。

(図 3)

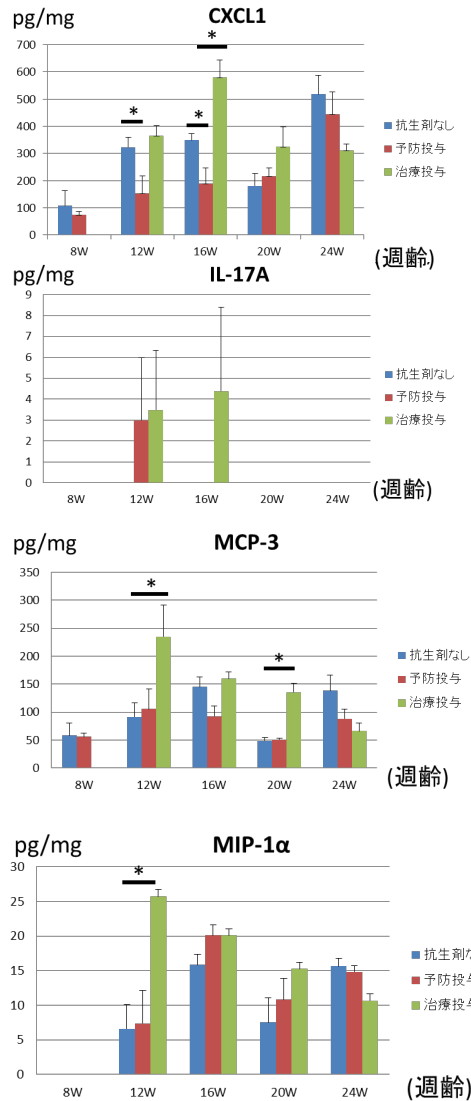


図 3

血液中のサイトカインを評価したところ、発症前投与において血清中の CXCL1 の減少が認められた発症後投与において血清中の IL-1、TNF- の増加が認められ、関節内 CXCL1、MCP-3、MIP の濃度に影響を及ぼした可能性が示唆された。

(結果のまとめ)

関節炎発症前に広域抗生剤を投与することで関節炎は抑制されたが、一時的であった。関節炎発症後の投与では関節炎は増悪した。抗生剤投与による関節炎の修飾に、CXCL1、MCP-3、MIP の関与することが示唆された。

腸内細菌の修飾を関節炎の治療に応用する場合、投与時期と長期経過に注意する必要がある可能性がある。

今後の課題として、発症前投与及び発症後投与において細菌の構成に変化がないかメタゲノム解析を行う予定である。また、サイトカイン変動に影響を及ぼしたメカニズムを検討する必要がある。

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)

[学会発表](計 1 件)

藤井 博、濱野 良子、川野 充弘 長期抗生剤投与が IL-1 receptor antagonist 欠損マウス関節炎に与える影響 第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会 福岡国際会議場(福岡) 2017 年 4 月 21 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 博 (FUJII Hiroshi)
金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：20596895