

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15152

研究課題名(和文) ヒト腸内細菌叢の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of human intestinal microbiota

研究代表者

竹田 潔 (Takeda, Kiyoshi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20309446

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)：関節リウマチ(RA)など様々な疾患において腸内細菌叢の組成が健常人と異なっていることが明らかにされている。しかし、これが疾患の原因なのか結果なのかについては、理解されていない。RA患者の一部で健常人には見られないプレボテラ菌優位な腸内細菌叢のパターンが認められた。次に、関節炎モデルマウスであるSKGマウスに健常人およびRAの腸内細菌叢を定着させた。健常人腸内細菌叢を有するSKGマウスに比べて、RAの腸内細菌叢を有するSKGマウスは、強い関節炎を発症した。このマウスでは、所属リンパ節および大腸粘膜固有層のTh17細胞数が増加した。以上、腸内細菌叢の乱れが関節炎発症のトリガーになることが示された。

研究成果の概要(英文)：Composition of intestinal microbiota has been shown to be altered in several disorders including rheumatoid arthritis (RA). However, it remained unknown whether the altered composition of microbiota is a result or cause of RA. We found that a subpopulation of RA patients harbored Prevotella-dominated intestinal microbiota. We analyzed the altered composition of microbiota dominated by Prevotella contributes to the pathogenesis of arthritis in arthritis-prone SKG mice, which did not develop arthritis in the absence of microbiota. Germ-free SKG mice were colonized with human microbiota (RA-type and healthy control (HC)-type microbiota). RA-SKG mice developed severe arthritis compared to SKG mice harboring HC microbiota. The number of Th17 cells in regional lymph nodes and the colon was increased in RA-SKG mice. Thus altered composition of microbiota contributes to the pathogenesis of arthritis.

研究分野：免疫学

キーワード：関節リウマチ 腸内細菌 免疫

1. 研究開始当初の背景

近年、次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢の網羅的解析により、これまで培養することができず解析の進まなかった腸内細菌叢の組成の全貌が明らかになってきている。それに伴い、食環境によりヒトの腸内細菌叢の組成が異なること、また様々な疾患患者において腸内細菌叢の組成が健常人と異なっていることが明らかにされている。これらの疾患には、炎症性腸疾患のみならず、腸以外の組織の免疫疾患（関節リウマチ、多発性硬化症）や、肥満や糖尿病などの代謝性疾患が含まれている。さらに、腸内細菌叢が IgA 誘導や、エフェクター T 細胞および制御性 T 細胞の誘導を担っていることが明らかになり、腸内細菌叢が獲得免疫系の誘導を介して上述の疾患の病態に深く関わっていることが示唆されている。申請者は、これまでに日本在住の関節リウマチ患者の腸内細菌叢は年齢、性別の合致した健常人と比較して異なる組成を示すことを見出してしている。しかしながら、様々な疾患で腸内細菌叢の組成変化が報告されているものの、これが疾患の原因なのか結果なのかについては、まったく理解が進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

腸内細菌叢ヒト化マウス（無菌マウスにヒト腸内細菌叢を定着、再現させたマウス）を作成し、解析することで、ヒト腸内細菌叢が、炎症性腸疾患だけでなく関節リウマチなどの免疫疾患の発症の原因となる可能性を解析し、それを明らかにするとともに、その分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では下記の計画により研究を推進する。

- ・健常人および関節リウマチ患者の糞便サンプルの採取および腸内細菌叢解析を行う。
- ・上記で採取した、ヒト腸内細菌叢をマウスで再現させた腸内細菌叢ヒト化マウス（無菌マウスにヒト腸内細菌叢を定着、再現させたマウス）を作製する
- ・腸内細菌叢ヒト化 SKG マウス（関節炎モデルマウス）での関節炎感受性およびその分子機構を解析する。

4. 研究成果

発症2年以内の早期関節リウマチ(RA)患者と健常人の腸内細菌叢を、次世代シーケンサーを用いて、16S rRNA を標的とした OTU 解析を行った結果、一部の RA 患者で、健常人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。RA で認められる腸内細菌叢ではプレボテラ属細菌、特にプレボテラ・コプリ菌が優位に増加していた。RA で認められる腸内細菌叢の乱れが、RA の結果なのか原因となるのかを解析するため、関節炎のモデルマウス SKG マウスを用いた。SPF 環境下で飼育し

ている SKG マウスは、真菌成分を投与することにより、関節炎が発症するが、4 種の抗生物質を傾向投与し、腸内細菌を減少させると、関節炎を発症しなくなることから、SKG マウスの関節炎の病態には腸内細菌叢が深く関わっていることが明らかになった。そこで、SKG マウスを完全無菌化し、健常人タイプの腸内細菌叢と RA タイプの腸内細菌叢を移入したところ、ヒトの便中腸内細菌叢を再現することができた（図1）。

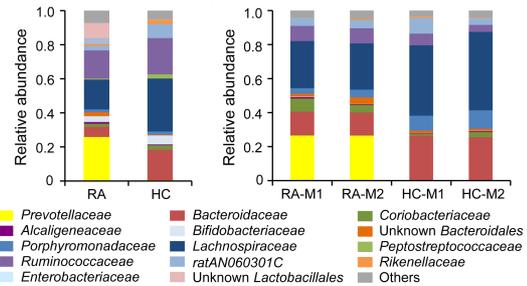


図1：(左) 関節リウマチ (RA) 患者と健常人 (HC) の糞便中腸内細菌叢の割合。(右) RA, HC のヒト腸内細菌叢を完全無菌 SKG マウスに定着させ、マウス糞便中の腸内細菌叢の割合を解析した。

腸内細菌叢ヒト化マウス（健常人タイプの HC-SKG マウスと RA タイプの RA-SKG マウス）に真菌成分を投与し、関節炎を惹起すると、RA-SKG マウスで関節炎が重症化した（図2）。

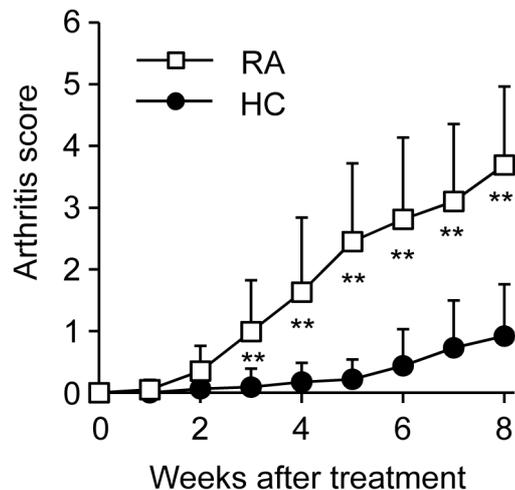


図2：RA 型の腸内細菌叢と健常人 (HC) 型の腸内細菌叢を持つ SKG マウスに真菌成分を投与し、関節炎を惹起させた後の arthritis score を示す。

以上の結果から、RA 型の腸内細菌叢の乱れが、関節炎の発症に深く関わっていることが明らかになった。

次に RA 型の腸内細菌叢の乱れが関節炎を誘導するメカニズムを解析した。SKG マウスで関節炎の発症に重要な役割を果たす Th17 細胞を解析したところ、RA-SKG マウスの大腸で Th17 細胞の数が増加していた。さらに、RA の病態に関わる自己抗原 RPL23A に対する T

細胞の反応性を解析すると、RA-SKG マウスの大腸の T 細胞が RPL23A 依存性の IL-17 産生が高くなっていった。このように、RA 型の腸内細菌叢を有すると、自己抗原に対する Th17 型の反応性が惹起され、関節炎を誘導することが示唆された。次に、Th17 が優位になるメカニズムを解析した。樹状細胞をプレボテラ・コプリ菌で刺激すると、Th17 細胞誘導に関わるサイトカイン IL-6, IL-23 が高産生された。さらに、プレボテラ・コプリ菌で刺激された樹状細胞と SKG マウス由来のナイーブ T 細胞を共培養すると Th17 細胞に分化した。以上の結果から、プレボテラ属細菌有意な腸内細菌叢が樹状細胞に作用し、SKG 遺伝子背景下で RA 関連自己抗原反応性 Th17 細胞を誘導することにより、関節炎を誘発することが示唆された。

次に、プレボテラ・コプリ菌を完全無菌 SKG マウスに単独定着させたマウスを作成した。このマウスでは、完全無菌 SKG マウスと異なり関節炎が惹起された (図 3)。

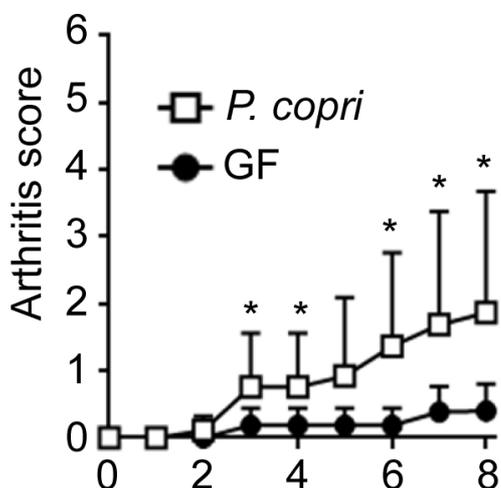


図 3 : 完全無菌 SKG マウス (GF) にプレボテラ・コプリ菌を定着させ、関節炎を惹起させ、arthritis score を測定した。

以上の結果から、プレボテラ属細菌が SKG マウスにおいて、関節炎の誘導に関わっていることが明らかになった。

以上、ヒト腸内細菌叢の解析から、RA でプレボテラ属細菌有意な腸内細菌叢の乱れが観察された。この腸内細菌叢の乱れが、SKG の遺伝子背景下で Th17 応答を増強し関節炎の発症の原因となることが明らかになった。

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 20 件)

1. Furuta Y, Tsai SH, Kinoshita M, Fujimoto K, Okumura R, Umemoto E, Kurashima Y, Kiyono H, Kayama H and Takeda K: E-NPP3 controls plasmacytoid dendritic cell numbers in the small

intestine. *PLOS ONE* 12, e0172509 (2017). doi:

10.1371/journal.pone.0172509

2. Motooka D, Fujimoto K, Tanaka R, Yaguchi T, Gotoh K, Maeda Y, Furuta Y, Kurakawa T, Goto N, Yasunaga T, Narazaki M, Kumanogoh A, Horii T, Iida T, Takeda K, and Nakamura S: Fungal ITS1 deep-sequencing strategies to reconstruct the composition of a 26-species community and evaluation of the gut mycobiota of healthy Japanese individuals. *Front. Microbiol.* In press
3. Yokota M, Tamachi T, Yokoyama Y, Maezawa Y, Takatori H, Suto A, Suzuki K, Hirose K, Takeda K, and Nakajima H: I BNS induces Muc5ac expression in epithelial cells and causes airway hyper-responsiveness in murine asthma models. *Allergy* in press
4. Kitada S, Kayama H, Okuzaki D, Koga R, Kobayashi M, Arima Y, Kumanogoh A, Murakami M, Ikawa M and Takeda K: BATF2 inhibits immunopathological Th17 responses by suppressing *I123a* expression during *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* In press doi: 10.1084/jem.20161076
5. Barman S, Kayama H, Okuzaki D, Ogino T, Osawa H, Matsuno H, Mizushima T, Mori M, Nishimura J and Takeda K: Identification of a human intestinal myeloid cell subset that regulates the gut homeostasis. *Int. Immunol.* 28, 533-545 (2016). DOI:10.1093/intimm/dxw034
6. Okumura, R. and Takeda, K.: Maintenance of gut homeostasis by the mucosal immune system. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 92, 423-435 (2016).
7. Fujimoto K, Kinoshita M, Tamura A, Tanaka H, Okuzaki D, Shimada Y, Kayama H, Okumura R, Furuta Y, Narazaki M, Hatakeyama S, Ikawa M, Tsuchiya K, Watanabe M, Kumanogoh A, Tsukita S, and Takeda K: Regulation of intestinal homeostasis by the ulcerative colitis-associated gene RNF186. *Mucosal Immunol.* 10, 446-445 (2017). doi: 10.1038/mi.2016.58.
8. Maeda Y, Kurakawa T, Umemoto E, Motooka D, Ito Y, Gotoh K, Hirota K, Matsushita M, Furuta Y, Narazaki M, Sakaguchi N, Kayama H, Nakamura S, Iida T, Saeki Y, Kumanogoh A, Sakaguchi S, and Takeda K: Dysbiosis contributes to arthritis development via activation of autoreactive T cells in the intestine.

- Arthritis Rheum.* 68, 2646-2661 (2016). doi: 10.1002/art.39783
9. Tsai, SH. and Takeda, K.: Regulation of allergic inflammation by the ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) on basophils and mast cells. *Semin. Immunopathol.* 38, 571-579 (2016).
 10. Bag S, Saha B, Mehta O, Anbumani D, Kumar N, Dayal M, Pant A, Kumar P, Saxena S, Allin KH, Hansen T, Arumugam M, Vestergaard H, Pedersen O, Pereira V, Abraham P, Tripathi R, Wadhwa N, Bhatnagar S, Prakash VG, Radha V, Anjana RM, Mohan V, Takeda K, Kurakawa T, Nair GB, Das B.: An improved method for high quality metagenomics DNA extraction from human and environmental samples. *Sci. Rep.* 6, 26775 (2016). doi: 10.1038/srep26775.
 11. Kawano H, Kayama H, Nakama T, Hashimoto T, Umemoto E, and Takeda K: IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma. *Int. Immunol.* 28, 489-501 (2016). Doi:10.1093/intimm/dxw012
 12. Okumura R, Kurakawa T, Nakano T, Kayama H, Kinoshita M, Motoka D, Gotoh K, Kimura T, Kamiyama N, Kusu T, Ueda Y, Wu H, Iijima H, Barman S, Osawwa H, Matsuno H, Nishimura J, Ohba Y, Nakamura S, Iida T, Yamamoto M, Umemoto E, Sano K, and Takeda K: Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. *Nature* 532, 117-121 (2016) doi: 10.1038/nature17406
 13. Takeda, K.: A metabolic bridge between microbiota and humans. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 206 (2016). doi:10.1038/nri.2016.18
 14. Takeda A, Kobayashi D, Aoi K, Sasaki N, Sugiura Y, Igarashi M, Tohya K, Inoue A, Hata E, Akahoshi, Hayasaka H, Kikuta J, Scandella E, Ludewig B, Ishii S, Aoki J, Suematsu M, Ishii M, Takeda K, Jalkanen S, Miyasaka M, and Umemoto E: Fibroblastic reticular cell-derived lysophosphatidic acid regulates confined intranodal T-cell motility. *eLife* 5, e10561 (2016). doi.org/10.7554/eLife.10561
 15. Kayama, H., and Takeda, K.: Functions of innate immune cells and commensal bacteria in gut homeostasis. *J. Biochem.* 159, 141-149 (2016).
 16. Ohshima, J., Sasai, M., Liu, J., Yamashita, K., Ma, J.S., Lee, Y., Bando, H., Howard, J.C., Ebisu, S., Hayashi, M., Takeda, K., Standley, D.M., Frickel, E.M., and Yamamoto, M.: RabGDI is a negative regulator of interferon- γ -inducible GTPase-dependent cell-autonomous immunity to *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 4581-4590 (2015). doi: 10.1073/pnas.1510031112
 17. Takeda, K., Tsai, S.H., and Kayama, H.: Regulation of immune responses by ATP-hydrolyzing ecto-enzymes. *Inflamm. Regeneration* 35, 172-177 (2015).
 18. Kashiwagi, I., Morita, R., Shichita, T., Komai, K., Saeki, K., Matsumoto, M., Takeda, K., Nomura, M., Hayashi, A., Kanai, T. and Yoshimura, A.: Smad2 and Smad3 inversely regulate TGF- α autoinduction in *Clostridium butyricum*-activated dendritic cells. *Immunity* 43, 65-79 (2015) doi:10.1016/j.immuni.2015.06.010
 19. Kayama, H. and Takeda, K.: Regulation of intestinal inflammation through interaction of intestinal environmental factors and innate immune cells. *Inflamm. Regeneration* 35, 28-41 (2015).
 20. Chinen I, Nakahama T, Kimura A, Nguyen NT, Takemori H, Kumagai A, Kayama H, Takeda K, Lee S, Hanieh H, Ripley B, Millrine D, Dubey PK, Nyati KK, Fujii-Kuriyama Y, Chowdhury K, Kishimoto T.: The aryl hydrocarbon receptor/microRNA-212/132 axis in T cells regulates IL-10 production to maintain intestinal homeostasis. *Int. Immunol.* 27, 405-415 (2015). doi: 10.1093/intimm/dxv015
- [学会発表](計 17 件)
1. Kiyoshi Takeda, Regulation of intestinal homeostasis by a colonic epithelial molecule, Lypd8., Microbiome R&D and business collaboration forum, Mar 1-2, 2017, Hong Kong
 2. 竹田 潔、腸内細菌叢と腸管炎症制御、第 28 回日本臨床微生物学会総会・学術集会、2017 年 1 月 20 - 22 日、長崎
 3. Kiyoshi Takeda, Regulation of intestinal homeostasis by epithelial barriers. International Symposium on Advanced Immunology. Nov. 1-2, 2016, Osaka
 4. Kiyoshi Takeda, Altered composition of microbiota contributes to arthritis development. The 1st International Symposium of Center for Integrative Rheumatoid Transcriptomics and Dynamics. Sep 30, 2016, Seoul, Korea
 5. Kiyoshi Takeda, Segregation of

- intestinal bacteria and epithelia by Lydp8. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sep 6-9, 2016, Hyogo.
6. 竹田 潔、腸管上皮バリアからみた腸管恒常性維持機構、第 53 回日本消化器免疫学会総会、2016 年 7 月 14 - 15 日、大阪
 7. Kiyoshi Takeda, Regulation of intestinal homeostasis through segregation of microbiota and epithelia. The 4th Annual Meeting of Asian Organization for Chron's & Colitis, July 8-9, 2016, Kyoto
 8. 竹田 潔、Shih-Han Tsai、腸管腔内アデノシン 3 リン酸 (ATP) による免疫応答とその制御、第 27 回日本生体防御学会学術集会、2016 年 7 月 7 - 9 日、福岡
 9. 竹田 潔、腸管炎症の制御機構、第 37 回日本炎症・再生医学会、2016 年 6 月 17 日、京都
 10. 竹田 潔、腸管免疫、第 61 回日本透析医学会学術集会総会、2016 年 6 月 12 日、大阪
 11. 竹田 潔、腸内細菌叢と疾患の ABC、第 60 回日本リウマチ学会総会学術集会、2016 年 4 月 22 日、横浜
 12. 竹田 潔、腸内フローラ異常による関節リウマチの発症誘導機構、第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 3 月 23-25 日、大阪
 13. Kiyoshi Takeda, Regulation of ATP-dependent immune responses The 43rd JSI Annual Meeting Nov 18-20, 2015、札幌
 14. Kiyoshi Takeda, The mechanism for segregation of intestinal bacteria and epithelia in the colon. The 43rd JSI Annual Meeting Nov 18-20, 2015、札幌
 15. Kiyoshi Takeda, Maintenance of gut homeostasis by intestinal epithelial cells. The 3rd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum, Oct 30-31, 2015, Berlin, Germany
 16. 竹田 潔、炎症性腸疾患の発症機構の解明をめざして、第 43 回日本臨床免疫学会、2015 年 10 月 22 日、神戸
 17. 竹田 潔、腸管炎症、アレルギー炎症の制御機構、第 75 回臨床アレルギー研究会、2015 年 6 月 27 日、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/ongene/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 潔 (TAKEDA, Kiyoshi)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 20309446

(3) 連携研究者

中村 昇太 (NAKAMURA, Shota)
大阪大学・微生物病研究所・特任准教授
研究者番号 : 90432434

(4) 研究協力者

前田 悠一 (MAEDA, Yuichi)