

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10009

研究課題名(和文) ヒト末梢血T細胞トランスクリプトームと腸内細菌叢の生理的・病理的関連検討

研究課題名(英文) Elucidation of pathological relationship between gut microbiota and peripheral T cell function in human inflammatory diseases

研究代表者

清水 潤 (Jun, Shimizu)

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年の研究の進展によって、腸内細菌の種類や菌遺伝子機能とヒトの健康・疾病との関連が徐々に明らかになってきている。本研究は、腸内細菌叢メタゲノミクスのデータ(菌種・菌遺伝子機能)と末梢血T細胞機能の、生理的・病理的相関をヒト免疫疾患にて検討するものである。

我々は、指定難病「ベーチェット病」および「再発性多発軟骨炎」にて研究を実施した結果、腸内細菌叢メタゲノミクスおよびT細胞機能ともに、健康人に比較した明らかな異常を世界に先駆けて報告することができた。さらにこの二つの病理の関連を考察・論文化し、評価を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には、2種のヒト免疫疾患にて腸内細菌叢メタゲノミクスと末梢血T細胞機能を病的に連結させ、その病態関与の考察を世界で初めて実施したところに意義がある。今後双方において経過観察をする予定であり、診断・治療指針の確立にとって貴重なものがあると推察している。腸内細菌叢メタゲノミクスに関する3論文は、すでに計64論文に引用された(Google scholar調べ)。

社会的には、研究内容を健康管理へと発展させ、市民公開講座や医療講演等で啓蒙を図った。また米国や欧州の再発性多発軟骨炎患者より食事等について医療相談を受ける機会を得て、アドバイスや専門医への紹介等を実施した。

研究成果の概要(英文)：Recent advances in the fields of gut microbiota have revealed the relationships between gut microbe composition/gene function and human health. In this study, we compared the metagenomic data with peripheral T cell function in two rare inflammatory diseases, namely Behcet's disease and relapsing polychondritis. We found that gut microbe numbers decreased and peripheral T cells were overactivated in patients with Behcet's disease. On the contrary, gut microbe numbers increased and peripheral T cells showed reduced responses against stimulation in patients with relapsing polychondritis. We suggest that gut microbe compositional and functional alteration may relate to skewed T cell responses, and subsequent inflammation of the tissues in patients with the two human diseases. We believe that these results propose a new mechanism by which gut microbes affect systemic immune function in several human inflammatory diseases.

研究分野：医学

キーワード：腸内細菌叢メタゲノミクス T細胞機能 ベーチェット病 再発性多発軟骨炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸内細菌叢と免疫機能

腸内細菌叢はその代謝産物を介してヒトの生体恒常性の維持に関与する。近年になり、この恒常性の乱れが、代謝、免疫、神経等の疾患を惹起していると考えられるようになってきた。腸内細菌による免疫機能の制御については、次のような機序が推察されている。

ヒトの常在菌の9割は大腸に存在し、総数は約40兆個と見積もられる。一方の免疫細胞は全身の半数程度が消化管に所属するリンパ組織に存在すると推察されている。つまりこの高い細胞密度による頻回接触が腸内細菌による免疫制御を可能にしているという仮説がその一つである。

もう一つは多量の腸内細菌代謝物の存在である。ホストは栄養素の吸収を小腸までに終了し、大半の腸内細菌が存在する大腸には難消化性多糖を中心とした、いわゆる食物繊維が到達する。腸内細菌はそれらから発酵にて「短鎖脂肪酸」を産生する。短鎖脂肪酸(酢酸、プロピオン酸、酪酸)は消化管上皮細胞の主要なエネルギー源であり、恒常性維持に不可欠である。他にも様々な腸内細菌代謝物がホスト-腸内細菌連関を形成しているが、影響の大きさという点では短鎖脂肪酸を指摘する報告が多い。

(2) 短鎖脂肪酸と Th17 細胞/制御性 T (Treg) 細胞

自己免疫疾患モデルでは、T細胞機能の変化により腸内細菌叢が変動し、逆に疾患腸内細菌叢はT細胞の分化異常を誘導し、疾患重症度を悪化させる。この連動において、短鎖脂肪酸はエピゲノムによってTreg細胞分化を促進しTh17細胞を抑制することで、生体免疫反応への制御機能を発揮する(図1A)。自己免疫疾患患者では健常者と比較して、腸内細菌叢菌種組成や菌遺伝子機能において差異が認められるが、Th17細胞/Treg細胞のバランスの関与が考察されている。

(3) 腸内細菌叢メタゲノミクスの発展

上記の所見が明らかになって来たのは、腸内細菌叢メタゲノミクスの発展による所見が大きい。これ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スする方法である。2008年に日本も参加する国際コンソーシアムが設立され包括的な研究が開始された。本研究の前身である「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」(2013-2015年度)にて我々は腸内細菌叢メタゲノミクスを開始したが、その時点に比べると現在では安定してデータを得ることが可能となっている。これは当初よりこの研究を精力的に開発されてきて、前述の国際コンソーシアムのメンバーでもある理研服部正平教授に負うところが大きい。我々の研究にもご教授いただき、以来安定したデータを得ている。

(4) 我々のT細胞機能研究

本研究機関は、30年以上にわたってヒト免疫・炎症性疾患におけるT細胞機能研究を継続してきた。2000年代に入ってTh17細胞/Treg細胞が提唱された際にも、速やかに研究を開始することが可能であった。具体的なヒト免疫・炎症性疾患としては、本研究機関が班研究において代表研究機関を実施した、「ベーチェット病」および「再発性多発軟骨炎」があげられる。今回これらの疾患において、腸内細菌叢メタゲノミクスを実施するにあたって、患者さんへの負担減を主眼に、簡便で安定した末梢血T細胞解析方法を選択した。

2. 研究の目的

腸内細菌叢メタゲノミクスの発展は著しく、腸内細菌叢の消化管免疫に果たす役割も解明されつつある。病態の多くが不明のまま残されているヒト免疫疾患・炎症性疾患において、腸内細菌

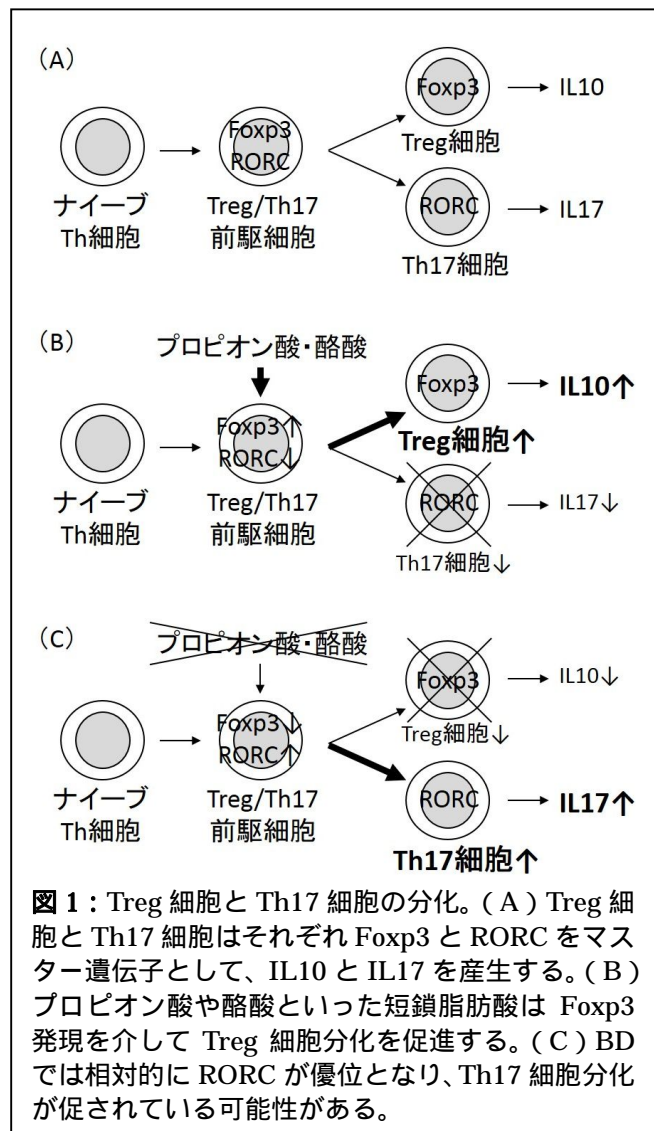


図1: Treg細胞とTh17細胞の分化。(A) Treg細胞とTh17細胞はそれぞれFoxp3とRORCをマスター遺伝子として、IL10とIL17を産生する。(B) プロピオン酸や酪酸といった短鎖脂肪酸はFoxp3発現を介してTreg細胞分化を促進する。(C) BDでは相対的にRORCが優位となり、Th17細胞分化が促されている可能性がある。

菌叢と末梢免疫機能の関連を探索することは、喫緊の課題であると考えられる。

本研究では、これを我々の確立した研究方法を利用して、腸内細菌叢と末梢免疫機能をダイレクトに関連付けることを試みる。これは単純な発想ながら現在まで試みられた研究はそれほど多くない。ほとんどの現行治療が経口または経末梢血管であることを考慮すると、精密医療・新規医療の確立に欠くことのできない情報であると確信している。

3. 研究の方法

(1) 腸内細菌叢メタゲノミクス

今回は 16S rRNA 増幅法を用いて実施した。前述の服部正平教授らより開発された酵素法によってゲノムの精製・抽出を実施した¹⁾。その後、同じく服部教授によって開発されたユニバーサルプライマーを使って、ゲノムを増幅した後にライブラリを作成し配列解析した。

菌種解析は QIIME ソフトウェアにて実施したのちに、同データを PICRUST ソフトウェアにて再解析して菌遺伝子機能データを得た。

(2) 末梢血 T 細胞機能解析

BD は我々の研究機関にて Th17 細胞/Treg 細胞研究を開発する必要性があったため、抗体を用いたフローサイトメーター解析、培養細胞を用いた遺伝子発現解析、皮膚組織を用いた免疫組織染色にて関連サイトカイン動向を検討した。

RP ではこの中より、所見が安定して得られかつ簡便な「培養細胞を用いた遺伝子発現解析」を選択した。

4. 研究成果

(1) ベーチェット病 (BD) の腸内細菌叢メタゲノミクス

健康人に比較して、BD において細菌叢菌種構成比および遺伝子機能の明瞭な変化を認めた。すなわち菌叢構成比では、疾患において *Bifidobacterium* 属や *Lactobacillus* 属に含まれる菌種が有意に優勢であった^{2,3)}。逆に BD では、*Megamonas hypermegale* と *Butyrivibrio* species といった短鎖脂肪酸産生菌の減少がみられた³⁾。BD 腸内細菌叢メタゲノミクスの先行研究でも、短鎖脂肪酸産生菌の減少と、便中の短鎖脂肪酸 (酪酸) 濃度の低下を観察している⁴⁾。

菌叢遺伝子機能の探索では、BD にてペントースリン酸経路の遺伝子機能の上昇が顕著であった。短鎖脂肪酸産生には解糖系や TCA 回路の代謝を要するが、それを制限している可能性がある」と推察している (図 2A)。

(2) BD の末梢血 T 細胞機能解析

我々も BD において、健康人に比較して、末梢血にて Th17 細胞および Th1/Th17 細胞 (Th17 細胞から Th1 細胞へ変化している細胞) がともに増加している^{5,6)}、Th1 細胞、Th17 細胞、Th1/Th17 細胞が皮膚紅斑局所にてそれぞれ独立して認められる⁶⁻⁸⁾、末梢血 Th 細胞は採血時にすでに IL-12 や IL-23 に対して過反応を示す状態にある^{5,6)}、末梢血 Th17 細胞数と IL-23 レセプター陽性細胞数は正相関を示す⁵⁾、末梢血 Th 細胞に、IL-23 とともに炎症性サイトカイン IL-1、IL-6 および TNF を加えて培養すると、大量の IL-17 を産生するようになる⁵⁾等の、Th1 と Th17 細胞両方の機能亢進を観察した。腸内短鎖脂肪酸の減少が惹起しているものと推察している^{2,3)} (図 1C)。

(3) 再発性多発軟骨炎 (RP) の腸内細菌叢メタゲノミクス

RP 腸内細菌構成比では、BD とは逆に *Veillonella parvula* や *Bacteroides fragilis* といったプロピオン酸産生に関連する菌種が有意に増加していた⁹⁾。

RP 腸内細菌叢で増加している菌遺伝子機能には、これも BD とは対照的に、クエン酸回路等のコハク酸・プロピオン酸産生経路に関連するものを多く認めた (図 2B)。

(4) RP の末梢血 T 細胞機能解析

プロピオン酸は、消化管にて IL-10 産生性 Treg 細胞分化を促進する (図 1B のパターン)¹⁰⁾。そこで末梢血単核細胞の採取時および培養下での IL-10 遺伝子発現を検討した⁹⁾。採取時では、

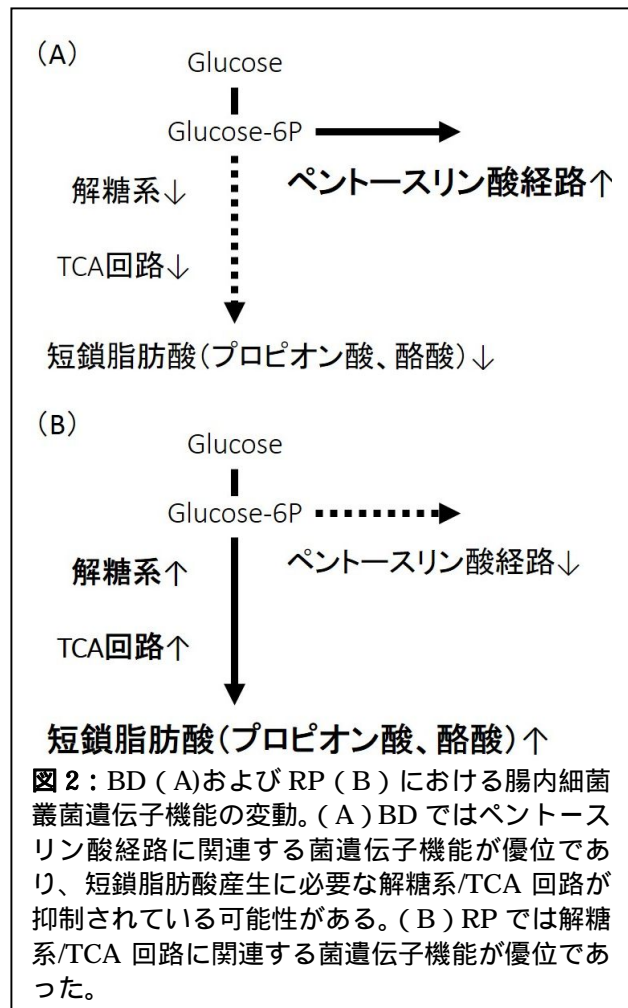


図 2: BD (A) および RP (B) における腸内細菌叢菌遺伝子機能の変動。(A) BD ではペントースリン酸経路に関連する菌遺伝子機能が優位であり、短鎖脂肪酸産生に必要な解糖系/TCA 回路が抑制されている可能性がある。(B) RP では解糖系/TCA 回路に関連する菌遺伝子機能が優位であった。

RPにて健常人に比し有意にIL-10遺伝子発現は高値であった。しかし培養6時間後には、RPにて健常人に比し有意にIL-10遺伝子発現は低値となり、この低値は24時間まで継続していた。我々は、RPのT細胞へのプロピオン酸によるTreg細胞惹起性刺激の継続が、培養刺激に対するTreg細胞の不応性を誘導している可能性があると考えた。

同時に同細胞は、マイトジェン刺激に対する炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF α)の遺伝子発現についても、特異的な反応が認められた⁹⁾。ピボにおけるTreg細胞亢進=イフェクター系T細胞機能抑制が、この反応を誘導している可能性があると考えられる。

以上の所見より、BDとRPは腸内細菌叢の面でも末梢免疫機能の面でも好対照をなすことが判明した。我々はこの2疾患が、腸内細菌叢・免疫機能連関でのスペクトラムの一環を形成しているのではないかと考えている。すなわち、「腸内細菌叢の短鎖脂肪酸産生能と末梢免疫機能の連関は、健常人を中心として疾患を超えて観察される」という仮説を立てた。今回我々が観察したように、腸内短鎖脂肪酸量が多くても少なくとも免疫疾患を起こす可能性がある。

この仮説は、例えば治療を考える上で有用である。BDではT細胞のエフェクター機能を抑制する、すなわちIL17やIL23(R)を抑えることが効果的であるかもしれない。T細胞機能不全と自然免疫亢進のみられるRPでは、IL1b、IL6、TNF α 抑制の効果が期待される。今後も、特に治療に関して2疾患の対比を軸に解析を継続する。またさらに他疾患での検討を試み、この「スペクトラム」の立証を試みたい。

近年のメタゲノミクスにトランスクリプトームやプロテオームを加えた網羅的縦断解析によると、2型糖尿病でも発症時においては「腸内細菌叢/免疫機能連関」の関与が疑われている¹¹⁾。今後の研究開発が求められている分野であると推察する。

引用文献

- 1) Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, et al. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat Biotechnol.* 2017; 35:1069-76.
- 2) Shimizu J, Kubota T, Takada E, et al. Bifidobacteria abundance-featured gut microbiota compositional change in patients with Behcet's disease. *PLoS One.* 2016; 11: e0153746.
- 3) Shimizu J, Kubota T, Takada E, et al. Relative abundance of *Megamonas hypermegale* and *Butyrivibrio* species decreased in the intestine and its possible association with the T cell aberration by metabolite alteration in patients with Behcet's disease. *Clin Rheumatol.* 2019; 38: 1437-45.
- 4) Consolandi C, Turrone S, Emmi G, et al. Behçet's syndrome patients exhibit specific microbiome signature. *Autoimmun Rev* 2015; 14: 269-76.
- 5) Shimizu J, Takai K, Takada E, et al. Possible association of proinflammatory cytokines including IL18 and TNF α with enhanced Th17 cell differentiation in patients with Behçet's disease. *Clin Rheumatol.* 2016; 35: 1857-63.
- 6) Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, et al. Excessive CD4+ T cells co-expressing interleukin-17 and interferon- γ in patients with Behçet's disease. *Clin Exp Immunol.* 2012; 168: 68-74.
- 7) 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 Behçet's disease. *Genet Res Int.* 2013; 2013: 363859.
- 8) Shimizu J, Izumi T, Arimitsu N, et al. Skewed TGF β /smad signalling pathway in T cells in patients with Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2012; 30: s35-9.
- 9) Shimizu J, Kubota T, Takada E, et al. Propionate-producing bacteria in the intestine may associate with skewed responses of IL10-producing regulatory T cells in patients with relapsing polychondritis. *PLoS One.* 2018; 13: e0203657.
- 10) Smith PM, Howitt MR, Panikov N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science.* 2013; 341: 569-73.
- 11) Zhou W, Sailani MR, Contrepois K, et al. Longitudinal multi-omics of host-microbe dynamics in prediabetes. *Nature.* 2019; 569: 663-71.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shimizu J, Kubota T, Takada E, Takai K, Fujiwara N, Arimitsu N, Murayama MA, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N.	4. 巻 13
2. 論文標題 Propionate-producing bacteria in the intestine may associate with skewed responses of IL10-producing regulatory T cells in patients with relapsing polychondritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0203657.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1371/journal.pone.0203657.	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 Shimizu J, Yamano Y, Kawahata K, Suzuki N.	4. 巻 97
2. 論文標題 Relapsing polychondritis patients were divided into three subgroups: patients with respiratory involvement (R subgroup), patients with auricular involvement (A subgroup), and overlapping patients with both involvements (O subgroup), and each group had distinctive clinical characteristics.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore).	6. 最初と最後の頁 e12837.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1097/MD.00000000000012837.	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 Shimizu J, Kubota T, Takada E, Takai K, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N.	4. 巻 38
2. 論文標題 Relative abundance of Megamonas hypermegale and Butyrivibrio species decreased in the intestine and its possible association with the T cell aberration by metabolite alteration in patients with Behcet's disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 1437-1445
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s10067-018-04419-8.	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 Shimizu J, Yamano Y, Yudoh K, Suzuki N.	4. 巻 70
2. 論文標題 Organ involvement pattern suggests subgroups within relapsing polychondritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arthritis Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 148-149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/art.40330.	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 -

1. 著者名 Suzuki N, Arimitsu N, Shimizu J, Takai K, Hirotsu C, Ueda Y, Wakisaka S, Fujiwara N, Suzuki T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Neuronal cell sheets of cortical motor neuron phenotype derived from human iPSCs.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Transplant.	6. 最初と最後の頁 1355-1364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1177/0963689717720280.	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 -

1. 著者名 清水 潤、鈴木 登	4. 巻 43
2. 論文標題 ヒト末梢血T細胞分化関連遺伝子発現と腸内細菌叢の病的関連検討	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 653-656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Shimizu J, Suzuki N.	4. 巻 14
2. 論文標題 Associations of intestinal dysbiosis and T cell dysfunctions in patients with collagen related diseases, such as Behcet's disease and relapsing polychondritis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 130-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Shimizu J, Suzuki T, Hirotsu C, Ueno H, Takada E, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki N.	4. 巻 14
2. 論文標題 Interaction between SDF1 and CXCR4 promotes photoreceptor differentiation via upregulation of NF- κ B pathway signaling activity in Pax6 gene-transfected photoreceptor precursors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ophthalmic Research	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1159/000503929.	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Jun Shimizu, Noboru Suzuki.
2. 発表標題 Japanese relapsing polychondritis patients with airway involvement were mutually exclusive with those with ear involvement in the clinical characteristics
3. 学会等名 米国リウマチ学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Shimizu, Takao Kubota, Noboru Suzuki.
2. 発表標題 Regulatory T cells with skewed responses and propionate-producing gut bacteria increased simultaneously in patients with relapsing polychondritis
3. 学会等名 米国リウマチ学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水 潤、久保田孝雄、鈴木 登
2. 発表標題 再発性多発軟骨炎で認められた特徴的な腸内細菌叢と免疫異常 - 健常人およびベーチェット病と比較して
3. 学会等名 日本リウマチ学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimizu J, Kubota T, Suzuki N
2. 発表標題 An abundance of butyrate-producing bacterium in the intestine and increased Foxp3 gene expression of T cells in patients with relapsing polychondritis
3. 学会等名 米国リウマチ学会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清水 潤、久保田孝雄、鈴木 登
2. 発表標題 ペーチェット病で認められた腸内細菌叢のDysbiosis
3. 学会等名 日本内科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shimizu J, Kawahata K, Yamano Y, Suzuki N.
2. 発表標題 A third of relapsing polychondritis patients with ear involvement at presentation had airway involvement at the last followup with a high mortality rate.
3. 学会等名 米国リウマチ学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水潤、山野嘉久、川畑仁人、鈴木登.
2. 発表標題 再発性多発軟骨炎は気道軟骨炎および耳介軟骨炎の有無により2群に分類される.
3. 学会等名 日本内科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水潤、山野嘉久、川畑仁人、鈴木登.
2. 発表標題 再発性多発軟骨炎における気道軟骨炎・耳介軟骨炎の有無による群間検討の重要性.
3. 学会等名 日本リウマチ学会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----