

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H01030

研究課題名(和文)自己免疫疾患における腸内細菌叢の役割の研究

研究課題名(英文)The impact of gut microbiota on autoimmune diseases

研究代表者

大野 博司 (Ohno, Hiroshi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50233226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症に関しては、そのマウスモデルであるEAEを用いて、小腸に多く存在する2種の菌、*Lactobacillus reuteri*ならびにErysipelotrichaceae科菌が、自己抗原類似ペプチドの提示ならびに炎症性Th17細胞分化誘導をそれぞれ担うことにより、相乗的にEAEを増悪させることを明らかにした。1型糖尿病に関しては、マウス腸管寄生虫によるストレプトゾトシン誘導糖尿病モデルの発症抑制、ならびにヒト1型糖尿病患者の試験から、トレハロースがRuminococcus属菌の増加を介してCD8+制御性T細胞を増加させることが藤ラ氏島の自己免疫性破壊を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性硬化症(EAE)に関する研究は、一般誌であるNatureに論文発表した(Nature 2020; doi: 10.1038/s41586-020-2634-9)。また1型糖尿病においても、マウスモデルおよびヒト患者から得られた研究成果は論文発表しており(Nat Commun 2020; doi: 10.1038/s41467-020-15857-x)、ともにプレス発表し、上毛新聞、朝日新聞(Web版)にも取り上げられるなど、社会的インパクトも大きいと自覚している。特に1型糖尿病に関しては、トレハロースやルミノコッカス属菌による1型糖尿病の予防・治療への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：For multiple sclerosis, using its mouse model, EAE, we found that two bacteria abundant in the small intestine, *Lactobacillus reuteri* and a Erysipelotrichaceae family strain, presented self-antigen-mimic peptides and induced inflammatory Th17 cell differentiation, respectively, to synergistically exacerbate EAE pathogenesis. For type 1 diabetes, from studies of intestinal helminth-induced suppression of streptozotocin-induced diabetes in mice as well as observations in human type 1 diabetic patients, trehalose increases CD8+ regulatory T cells through an increase in Ruminococcus spp ultimately suppresses autoimmune destruction of pancreatic islet beta cells to prevent type 1 diabetes.

研究分野：腸管免疫学

キーワード：腸内細菌叢 多発性硬化症 EAE(実験的自己免疫性脳脊髄炎) 1型糖尿病 寄生虫 トレハロース
ルミノコッカス属菌 CD8+制御性T細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

対外環境との境界をなす皮膚や粘膜には膨大な数の細菌が常在菌として定着している。中でも腸管、特に大腸には 500~1000 菌種、総計 40 兆個以上もの「腸内細菌叢」が棲息し、われわれ宿主の生理や病理に大きな影響を与えていると考えられる。

近年の次世代シーケンサーの登場とともに腸内細菌叢全体のゲノムを丸ごと解析する、いわゆる「メタゲノム解析」が普及した結果、腸内細菌叢は炎症性腸疾患や消化器がんなどの消化器疾患のみならず、アレルギーや自己免疫疾患などの免疫疾患、病的肥満や糖尿病、動脈硬化性疾患などの代謝内分泌疾患、さらには多発性硬化症や自閉症スペクトラムなどの脳神経疾患にも関与することが示唆されている。どのような腸内細菌がどのようにして疾患発症に関与するかは基礎研究としての重要は言うに及ばず、疾患の制御・予防に直結する。しかし、腸内細菌叢と疾患発症との因果関係や発症に関わるメカニズムは、一部の疾患を除いて全貌の解明にはまだ遠い。

2. 研究の目的

研究代表者は長年にわたり腸管免疫系と腸内細菌の関連を研究する中で、宿主-腸内細菌相互作用の研究において、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、メタボロームなど異なる階層の網羅的解析を組み合わせた「統合オミクス手法」が有用であることに世界に先駆けて着目し、宿主-腸内細菌相互作用の分子機構について世界をリードする研究成果を挙げてきた (Nature 2009; Nature 2011; Nature 2013)。本研究提案では現在の研究をさらに発展させる目的で、腸内細菌による多発性硬化症や 1 型糖尿病といった自己免疫疾患の発症やその制御の分子機構について研究を進めることとした。得られた成果は基礎研究として重要なばかりでなく、腸内細菌をターゲットにしたこれら自己免疫疾患の新たな治療法や予防法の開発に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 多発性硬化症

多発性硬化症の動物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、複数の抗生物質を単独投与することで、EAE の発症を抑制あるいは促進する抗生物質を見出す。さらに、その抗生物質により影響を受ける免疫細胞の種類とその組織分布を検討する。また、その抗生物質によりどの様な腸内細菌が変化するか、またそれらの菌の腸管内での分布を検討する。

影響される菌が得られたら、それらの菌がどのようにして変化を受けている免疫細胞を制御するかを、遺伝子発現、サイトカインタンパク質発現 (ELISA、FACS 等) などを用いて検証する。

多発性硬化症における食物繊維のえいきをけんとうするために、EAE マウスに高繊維餌、低繊維餌を与え、EAE の発症を観察する。影響が見られたら、餌の違いにより変化する代謝物を同定し、それらの EAE に対する影響を検証する。

(2) 1 型糖尿病

1 型糖尿病のマウスモデルであるストレプトゾトシン誘導糖尿病モデルにおいて、マウス腸管寄生虫 *Heligmosomoides polygyrus* (Hp) 経口感染が糖尿病発症を抑制することを見出している。そこで、そのメカニズムに迫るため、寄生虫感染で変化する腸内細菌および代謝物を、菌叢解析、メタボローム解析により同定を試みる。代謝物や菌が同定されたら、それらを投与することで糖尿病モデルの発症への影響を検討する。また、FACS 解析によりその際に変化する免疫細胞の同定を試みる。

マウスで見られた変化がヒト 1 型糖尿病でも見られるかを、1 型糖尿病患者および健常対照群ボランティアの採血および便最終により検証する。

4. 研究成果

(1) 多発性硬化症

複数の抗生物質の比較から、Ampicillin (Amp) が EAE 発症を特異的に抑制すること、Amp で特異的に減少する菌として小腸から分離した *Erysipelotrichaceae* 科の菌株 OTU0002 を無菌マウスに定着させると EAE の増悪と同時に炎症性 Th17 細胞の分化・活性化に関与すること、さらに、同じく小腸に存在する *Lactobacillus reuteri* 菌株 OTU0001 が、中枢神経系ミエリン自己抗原と交叉反応を示すペプチドをコードするタンパク質 UvrA を発現することで、OTU0002 による Th17 細胞の活性化を増強するとともに EAE をさらに増悪させることが、UvrA 欠損株を作成することで明らかとなった。OTU0001 単独では、小腸に移行してきたミエリン特異的 T 細胞の増殖を誘導するが、炎症性の Th17 細胞への分化は誘導されないために EAE を発症しない。一方、OTU0002

単独では小腸に移行してきたミエリン特異的T細胞の増殖は起きないが、Th17細胞への分化が誘導されるためEAEは誘導される。OTU0001/0002の両者の存在下では、増殖した自己抗原特異的T細胞からより多くの炎症性Th17細胞分化誘導が引き起こされることで、より重篤なEAEの誘導が見られる。このように、2種の異なる小腸常在細菌が相乗的に働くことで、EAEが悪化することが明らかとなった(Nature 2020; doi: 10.1038/s41586-020-2634-9)。

低繊維餌群では高繊維餌群と比較してEAEの増悪が認められた。菌による食物繊維の主要な代謝物は短鎖脂肪酸であることから、低繊維餌で減少した短鎖脂肪酸のEAE感受性への影響を検討するために、酪酸セルロース、プロピオン酸セルロース、酢酸セルロースをSPFマウスに摂取させ、EAEを発症誘導した。いずれの短鎖脂肪酸付加セルロース摂取においてもEAEの症状緩和は認められなかったことから、FF食によるEAE感受性増加に腸管内短鎖脂肪酸の変動は大きく寄与しないと結論付けた。

そこで低繊維餌によるEAE増悪に関与する他の因子を探索するため、繊維含有餌群・低繊維餌群マウスから血清および小腸・大腸内容物を回収し、差のある代謝産物をLC-MS/MSで網羅的に解析した。その結果、血清で46、小腸内容物で87、大腸内容物で90の代謝産物において群間での有意な差が認められ、2-ヒドロキシイソ酪酸(2-HIBA)をはじめとするいくつかの代謝産物については、血清および腸管内容物のいずれのサンプルにおいてもFF食群で有意な増加が認められた。そこでSPFマウスに2-HIBAを飲水投与した後にEAEを発症誘導しEAE感受性への影響を検討した結果、2-HIBA投与群のマウスはより重篤なEAEを発症することが明らかになった。

(2)1型糖尿病

代謝物メタボローム解析の結果、Hpがトレハロースを産生しており、トレハロースをマウスに経口投与すると腸内細菌叢に作用することで*Ruminococcus*属菌が増加すると共に、脾臓や膵臓局所のCD8+制御性T細胞が増加し、この細胞が1型糖尿病発症を抑制すること、トレハロース投与マウスの糞便からトレハロース依存的に増加する*Ruminococcus*属菌を単離し、マウスに投与することにより1型糖尿病を抑制する菌を同定した。さらに、1型糖尿病患者群では健常対照群と比較して、末梢血中のCD8+制御性T細胞の減少、ならびに便中の*Ruminococcus*属菌の減少が認められることから、ヒトにおいても*Ruminococcus*属菌およびCD8+制御性T細胞が1型糖尿病発症制御に関与していることが示唆された(Nat Commun 2020; doi: 10.1038/s41467-020-15857-x)。

これらの結果を踏まえて、1型糖尿病の病態改善に寄与することが示唆されるヒト腸内細菌を同定する目的で、無菌マウスにヒト糞便細菌検体を投与し、ストレプトゾトシンにより1型糖尿病患者を誘導した。検体136と138を比較したところ、136群は138群に比べ血糖値の上昇が抑制され、糖尿病発症率もは有意に低下した。そこで、小腸および大腸粘膜固有層の免疫担当細胞プロファイルを解析した結果、小腸では差はみられなかったが、大腸の制御性T細胞やROR γ 陽性T細胞、さらにIFN- γ 産生CD4およびCD8T細胞がK136群で有意に増加していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyachi Eiji, Kim Seok-Won, Suda Wataru, Kawasumi Masami, Onawa Satoshi, Taguchi-Atarashi Naoko, Morita Hidetoshi, Taylor Todd D., Hattori Masahira, Ohno Hiroshi	4. 巻 585
2. 論文標題 Gut microorganisms act together to exacerbate inflammation in spinal cords	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 102 ~ 106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-020-2634-9	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 Shimokawa Chikako, Kato Tamotsu, Takeuchi Tadashi, Ohshima Noriyasu, Furuki Takao, Ohtsu Yoshiaki, Suzue Kazutomo, Imai Takashi, Obi Seiji, Olia Alex, Izumi Takashi, Sakurai Minoru, Arakawa Hirokazu, Ohno Hiroshi, Hisaeda Hajime	4. 巻 11
2. 論文標題 CD8+ regulatory T cells are critical in prevention of autoimmune-mediated diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1922
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15857-x	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 6件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Ohno H
2. 発表標題 Impact of Gut Microbiota in Autoimmune Diseases
3. 学会等名 24th SANKEN International Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野博司
2. 発表標題 腸内細菌と自己免疫疾患
3. 学会等名 第29回腸内フローラシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ohno H
2. 発表標題 Impact of small intestinal bacteria on the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis
3. 学会等名 Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology (KSBMB) International Conference 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohno H
2. 発表標題 Impact of small intestinal bacteria on the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis
3. 学会等名 13th INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE ON PROBIOTICS, PREBIOTICS, GUT MICROBIOTA AND HEALTH (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohno H
2. 発表標題 Gut microbiota and autoimmune diseases
3. 学会等名 The Korean Association of Immunologists International Meeting 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohno H
2. 発表標題 Gut microbiota and autoimmune diseases
3. 学会等名 17th International Congress of Immunology (IUIS2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

腸内細菌が中枢神経系炎症を促進する仕組みを解明 - 多発性硬化症の予防・治療に新たな可能性 -
https://www.riken.jp/press/2020/20200827_1/index.html
寄生虫が自己免疫疾患の発症を抑える仕組みを解明 - 1型糖尿病の予防・治療に新たな光 -
https://www.riken.jp/press/2020/20200422_1/index.html
所属機関による研究室紹介ページ
https://www.riken.jp/research/labs/ims/intest_ecosys/
研究室独自のウェブページ
<https://www.yokohama.riken.jp/ies/>

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
研究分担者	中西 裕美子 (Nakanishi Yumiko) (10614274)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・客員研究員 (82401)	
研究分担者	宮内 栄治 (Miyachi Eiji) (60634706)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員 (82401)	
研究分担者	下川 周子 (Shimokawa Chikako) (60708569)	国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官 (82603)	
研究分担者	加藤 完 (Kato Tamotsu) (20632946)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------