

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07428

研究課題名（和文）環境要因による腸内細菌叢変化がもたらす自己免疫制御異常の解析

研究課題名（英文）Analysis of autoimmune dysregulation caused by changes in intestinal microbiota due to environmental factors

研究代表者

早川 国宏（Hayakawa, Kunihiro）

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00573007

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：慢性的なTLR7シグナル活性化が腸内環境を変化させ、その後の自己免疫応答に関するかを検証した。TLR7アゴニスト刺激開始1週後に腸内細菌叢の変化が観察され、2週後がピークに達した。メタゲノム解析を試みたが、変化は刺激前の個体に依存していたため、具体的な菌種の変化を明らかにできなかった。また、抗生剤投与による腸内細菌叢の減少と腸管上皮バリアの保護を試み、自己抗体産生への影響を検証したが、自己抗体産生に変化は見られなかった。これらの結果から、TLR7シグナルの活性化は腸内細菌叢を変化させるが、その変化が自己免疫疾患と直接関連しているかはまだ明確ではない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、慢性的なTLR7シグナル活性化が腸内細菌叢を変化させることを明らかにし、ウイルス感染症等が腸内細菌叢を変化させることが示唆された。さらに、その変化が自己免疫疾患と関連しているかを検証したが、その関連性は明確ではなかった。しかし、この点を解明することは、自己免疫疾患の発症メカニズムを理解し、治療法を開発する上で重要である。また、腸内細菌叢の変化は個体によって異なるため、腸内細菌叢をターゲットとした治療戦略は、個々の患者に合わせた個別化医療として検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：This study investigated whether chronic activation of TLR7 signaling alters the intestinal environment and contributes to subsequent autoimmune responses. Changes in the intestinal microbiota were observed one week after the initiation of TLR7 agonist stimulation, peaking at two weeks. A metagenomic analysis was attempted, but the changes were dependent on the individual prior to stimulation, thus the details could not be elucidated specific bacterial species changes. Furthermore, we attempted to reduce the intestinal microbiota by administering antibiotics and protect the intestinal epithelial barrier, and examined the impact on autoantibody production. However, no changes were observed in autoantibody production. These results suggest that TLR7 signal activation alters the intestinal microbiota, but it is not yet clear whether this change is directly associated with autoimmune diseases.

研究分野：医歯薬科学・基礎医学・実験病理学

キーワード：自己免疫疾患 腸内細菌叢 環境要因 免疫寛容

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫応答の異常は多種多様な疾病を引き起こす可能性がある。特に、自己免疫疾患は、「自己」の成分に対する免疫反応が制御不能となり、その結果として発症する。自己免疫疾患の発症や悪化には、環境要因が深く関与していることが知られているが、その具体的なメカニズムはまだ明らかになっていない。

全身性エリテマトーデス (SLE) は代表的な自己免疫疾患であり、その自然発症モデルマウスの SLE 病態は、飼育環境により異なる。具体的には、環境中微生物やウイルスなどを制限した清潔な環境での飼育の場合、コンベンショナルな環境と比較して SLE 病態が軽減する。なぜ清潔な環境下で SLE が発症しにくいのか？この疑問に対する一つの仮説は、環境要因が大きく関与している可能性がある。もともと、時間経過とともに自己反応性が促進し、自然発症する SLE モデル動物であるため、この差異には大きく環境要因が関与していることが推測できる。ヒトにおいてもウイルスなどの感染症、紫外線、外傷、ストレスなどの環境要因や女性ホルモンが SLE の誘因として知られている。これらの環境要因がどのようにして自己反応性の促進に寄与するかは、まだ明らかになっていない。このような環境要因が免疫応答の活性化を惹起するメカニズムに関与しうる因子として、Toll 様受容体 7 (TLR7) に着目した。TLR7 は、自然免疫反応のウイルス受容体の一つであり、自己核酸の受容体としても機能する。TLR7 シグナルの慢性的な活性化は、SLE 発症のリスクであり、腸内細菌叢の変化も引き起こすことも報告され (Zegarra-Ruiz *et al. Cell Host Microbe* (2019)), 我々も実証している。それにもかかわらず、TLR7 活性化に伴う腸内細菌叢の変化が、自己反応性細胞の出現や自己抗体産生などに代表される免疫寛容の破綻に至るまでのメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、TLR7 の活性化に伴う腸内細菌叢変化が、自己反応性細胞の出現や自己抗体産生などに代表される免疫寛容の破綻に関与すること、さらにその機序を明らかにすることを目的とした。この研究成果を利用し、腸内細菌叢の制御によって免疫寛容破綻を惹起しない手段を検討することでヒトに応用、SLE やその他の自己免疫疾患の主に発症予防方法の開発を展望する。

3. 研究の方法

Yokogawa らの手法 (Yokogawa *et al. Arthritis Rheumatol* (2014)) を利用し、BALB/c マウスに R848 (TLR7 アゴニスト) を用いて自己免疫を誘導した。このマウスを利用し、以下の項目を検証した。

- (1) 自己免疫誘導モデルの自己抗体と B 細胞活性化因子 (BAFF) 産生の検証
自己免疫誘導開始後に採取した血清を利用し、自己抗体 (抗二本鎖 DNA (dsDNA) 抗体)、BAFF を ELISA 法で定量した。
- (2) 自己免疫誘導モデルの腸内細菌叢変化の検証
 - ① 糞便を採取し、便中に含まれる細菌 DNA を抽出し、定量的 PCR (qPCR) で *Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門の相対定量を行い、これらの経時変化を検証した。
 - ② 上記の結果を基に、16S rRNA メタゲノム解析を行った。
- (3) 自己免疫誘導モデルのリンパ球活性化の検証
 - ① (2)-①の結果を基に、脾臓のリンパ球活性化を検証した。
 - ② 脾臓 CD4⁺T 細胞は、RNA-seq 解析も併せて行った。
- (4) 自己免疫誘導によって変化した腸内細菌叢が生体へ及ぼす影響の検証
SLE において腸内細菌叢の体内移行は、症状の発症や悪化に関与する (Manfredo Vieira *et al. Science* (2018))。そこで、自己免疫誘導マウスに対し、抗生物質投与または腸上皮バリア保護を行い、腸内細菌叢が及ぼす影響を検証した。

4. 研究成果

(1) 自己免疫誘導モデルの自己抗体と BAFF 産生の検証

常法に従い、BALB/c マウスに R848 を継続的に塗布し、経時的に血清を採取し、血清中抗 dsDNA 抗体および BAFF を定量した。抗 dsDNA 抗体は、1 週目から自己免疫誘導群で非誘導群と比較し、わずかだが有意に増加した。自己反応性 B 細胞の増殖に参与する BAFF は、4 週目以降の自己免疫誘導群で増加した。

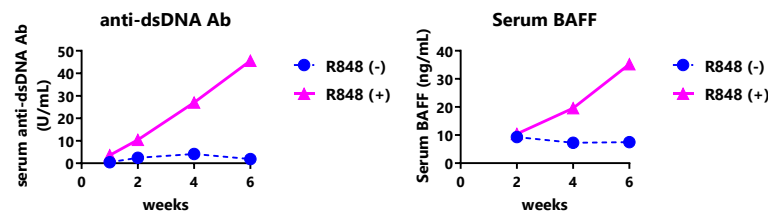


図 1 自己免疫誘導による血清中自己抗体 (左図) および BAFF (右図) の濃度の経時変化

(2) 自己免疫誘導モデルの腸内細菌叢変化の検証

自己免疫誘導による抗 dsDNA 抗体と BAFF の変化から、誘導開始から 4 週間までの間の腸内細菌叢の変化に着目した。まず、簡易的に腸内細菌叢の変化の有無を検証するため、糞便中に含まれる *Bacteroidetes* 門および *Firmicutes* 門の DNA を qPCR を用いて相対定量を行った。その結果、非誘導群と誘導群では、誘導 1 週目から *Bacteroidetes* 門の増加、*Firmicutes* 門の減少が見られ、2 週目で最も差が大きかった (図 2)。

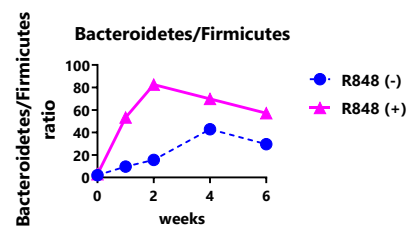


図 2 腸内細菌叢の経時変化

さらに詳細に腸内細菌叢の変化を解析するため、2 週目の 16S rRNA メタゲノム解析を行った。α 多様性、主座標分析 (PCoA) によって β 多様性を視覚化した結果、群間で顕著に変化することを明らかにした。さらに、*Lachnospiraceae* 科、*Ruminococcaceae* 科の減少、*Lactobacillaceae* 科の増加が顕著だった。しかし属以下の変化は同定できなかった。

(3) 自己免疫誘導モデルのリンパ球活性化の検証

腸内細菌叢の差が大きかった誘導 2 週目のマウスより、脾臓を採取し、細胞構成と活性化マーカーの発現をフローサイトメーターで解析した。細胞組成の変化は、特に誘導群において B 細胞、形質細胞、形質芽細胞の増加が顕著だった。T 細胞、特に CD4⁺T 細胞の動態変化に着目すると、CD44^{lo}CD62L^{hi}細胞の減少や CD69、PD-1 の発現が自己免疫誘導群で顕著だった。B 細胞は抗体産生にシフトしていることが示唆され、CD4⁺T 細胞は、活性化されており、誘導 2 週目の時点で、自己免疫反応が顕著に活性化していることが示唆された。しかし、この時点では、BAFF 産生は増加していなかったが、誘導期間の延長とともに増加することから、変化した腸内細菌叢が何らかの役割を担っている可能性がある。

次に自己免疫誘導 2 週目のマウスの脾臓から CD4⁺T 細胞を分取し、RNA-seq 解析を行った。発現が変動した遺伝子群を抽出し、遺伝子群がどのような機能に参与しているのかをさらに解釈するため、ジーンオントロジー解析を行った。その結果自己免疫誘導群では顕著な細胞の活性化 (接着、移動、傷害活性) を示す遺伝子群の濃縮が見られた。

(4) 自己免疫誘導によって変化した腸内細菌叢が生体へ及ぼす影響の検証

まず、自己免疫誘導によって体内へのバクテリアまたはバクテリア成分の移行の時期を検証するため、血清中のリポ多糖結合タンパク質 (LBP) を測定した。その結果、LBP は、自己免疫誘導 2 週目では非誘導群と差はなかったが、4 週目には有意に増加していた。したがって、2 週目から 4 週目の間において腸管バリアの破綻が示唆された。次に、実際にバクテリアの体内移行を 2 種類のアプローチで阻害した。

① 抗生物質投与による腸内細菌叢の減菌

アンピシリン、ネオマイシン、バンコマイシン、メトロニダゾールの 4 種類混合の広域スペクトル抗生物質の自然飲水投与による腸内細菌叢の減菌を試みたが、マウスがメトロニダゾールを強く嫌ったため、これを除く 3 種の抗生物質投与で実験を行った。その結果、血中自己抗体価は、抗生剤投与群でわずかに、しかし有意に増加していた (図 3)。一方で、CD4⁺T 細胞の活性化等の遺伝子発現は、抗生剤投与の有無で変化は見られなかった。

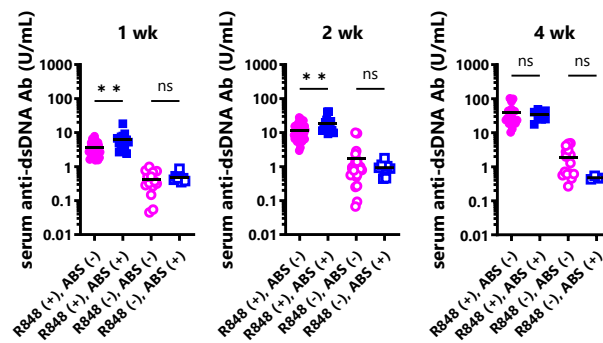


図 3 抗生物質投与による自己抗体産生への影響

**: $p < 0.01$, ns: not significant, ABS: antibiotics

② 腸上皮保護剤投与による腸内細菌叢の体内移行阻害

次に、腸管上皮バリアの保護を行い、菌体成分の体内移行を阻害することで、同様に自己抗体産生へ影響があるかを検証した。しかし、自己抗体産生に変化は見られなかった。

本研究課題を遂行した結果、TLR7 シグナル活性化による自己免疫誘導によって腸内細菌叢が変化することを明らかにしたが、その変化が自己抗体産生に与える影響についてはまだ明確ではない。他の報告から考えると、腸内細菌叢が変化することで、腸内細菌自体 (成分) や代謝産物が宿主へ影響している可能性は高いと推測される。したがって、腸内細菌叢のコントロールが、自己免疫疾患の発症予防に役立つ見込みがある。しかしながら、本研究結果にもある通り、腸内細菌叢のコントロールによって自己抗体が増加する可能性もあるため、さらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hayakawa Kunihiro, Fujishiro Maki, Yoshida Yuko, Kataoka Yuko, Sakuma Shota, Nishi Takuya, Ikeda Keigo, Morimoto Shinji, Takamori Kenji, Sekigawa Iwao	4. 巻 208
2. 論文標題 Exposure of female NZBWF1 mice to imiquimod-induced lupus nephritis at an early age via a unique mechanism that differed from spontaneous onset	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 33 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cei/uxac012	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 Dankers Wendy, Northcott Melissa, Bennett Taylah, D' Cruz Akshay, Sherlock Rochelle, Gearing Linden J., Hertzog Paul, Russ Brendan, Miceli Iolanda, Scheer Sebastian, Fujishiro Maki, Hayakawa Kunihiro, Ikeda Keigo, Morand Eric F., Jones Sarah A.	4. 巻 13
2. 論文標題 Type 1 interferon suppresses expression and glucocorticoid induction of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1034880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.1034880	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 該当する

1. 著者名 Matsuoka Yuki, Morimoto Shinji, Fujishiro Maki, Hayakawa Kunihiro, Kataoka Yuko, Suzuki Satoshi, Ikeda Keigo, Takamori Kenji, Yamaji Ken, Tamura Naoto	4. 巻 39
2. 論文標題 Metformin repositioning in rheumatoid arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Rheumatology	6. 最初と最後の頁 763 ~ 768
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.55563/clinexprheumatol/zn2u9h	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 Yoshida Yuko, Hayakawa Kunihiro, Fujishiro Maki, Ikeda Keigo, Tsushima Hiroshi, Hirai Takuya, Kawasaki Mikiko, Tominaga Mitsutoshi, Suga Yasushi, Takamori Kenji, Watanabe Yoshifumi, Sekigawa Iwao, Morimoto Shinji	4. 巻 529
2. 論文標題 Social defeat stress exacerbates atopic dermatitis through downregulation of DNA methyltransferase 1 and upregulation of C-C motif chemokine receptor 7 in skin dendritic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1073 ~ 1079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.157	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西卓也、藤城真樹、早川国宏、鈴木智、池田圭吾、森本真司、山路健、田村直人
2. 発表標題 末梢血細胞分画変動及びB細胞内シグナルへの影響から検証したベリムマブの役割
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hayakawa K, Fujishiro M, Yoshida Y, Kataoka Y, Sakuma S, Nishi T, Ikeda K, Morimoto S, Sekigawa I
2. 発表標題 Imiquimod induced lupus nephritis in NZBWF1 mice is developed through a unique mechanism different from spontaneous onset.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshida Y, Oikawa M, Hayakawa K, Watanabe Y
2. 発表標題 Modification by Liver-derived Fibroblast growth factor (FGF) 21 of the b-klotho protein (KLB) expression in the central nerve system.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芳田祐子、及川茉那、早川国宏、渡辺恵史
2. 発表標題 マウス新生児期における肝臓由来FGF21の神経系への作用
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hayakawa K, Fujishiro M
2. 発表標題 Analysis of the relationship between changes in the gut microbiota and the production of autoantibodies
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2024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
研究協力者	藤城 真樹 (Fujishiro Maki)		

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
---------	---------