

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08779

研究課題名(和文) 腸管神経系と免疫系の相互作用による全身性エリテマトーデスの病態制御機構の解明

研究課題名(英文) Interaction between Enteric Nervous System and Immune System in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus

研究代表者

大和田 高義 (Owada, Takayoshi)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：30456016

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)：ホメオボックス遺伝子Ncxの欠損(KO)マウスの腸管で一酸化窒素(NO)の産生増加に伴う腸内細菌叢の異常が誘導される。自己免疫疾患に対するNcxの機能を解明する目的でSKGマウスの遺伝子型をバックグラウンドとするNcx-KOマウスの自己免疫疾患モデルを解析した。SLEモデルの病態にNcxの関与を認めなかったが、RAモデルではKOマウスの大腸LPLにおいてTregの増加とIL-17産生T細胞の減少が関節炎の軽減に關与すると考えられた。SKGマウスの関節炎に対するNcxの病理的意義は明らかでないが、腸管NOの産生が関節炎誘導腸内細菌叢の変換を通してRA様関節炎の軽減に關与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、SLEなど自己免疫疾患の新規治療法の開発に大いに貢献し、さらに様々な免疫性疾患の病態の分子メカニズムの解明することに学術的意義がある。また新規分子標的治療法の開発へとつながる点に社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Dysbiosis with increased nitric oxide (NO) production are induced in the intestinal tract of mice lacking (KO) the homeobox gene Ncx. To elucidate the function of Ncx in autoimmune diseases, we analyzed Ncx-KO mouse models of autoimmune diseases using the SKG mouse genotype as a background and found that Ncx was not involved in the pathogenesis of SLE models, but in RA models, increased Tregs and decreased IL-17 producing T cells in the colonic LPL of KO mice were associated with reduced arthritis. Although the pathological significance of Ncx in arthritis in SKG mice is not clear, the production of intestinal NO may be involved in the reduction of RA-like arthritis through conversion of arthritis-induced dysbiosis.

研究分野：Rheumatology

キーワード：NCX Autoimmune disease Rheumatoid arthritis

1. 研究開始当初の背景

近年、膠原病に対して、免疫機構修飾を目的とした新たな戦略により治療成績が向上した。しかし、いまだ根治的治療法は存在しないことから、その病態の解明と新規の根治的治療の開発が必要とされている。自己免疫の疾患の発症や病態の維持において環境要因は極めて重要であると考えられ、その中で特に腸内細菌叢の変化が最近注目されている。腸管免疫系において消化管関連リンパ組織の免疫系細胞が中心となって形成される自然・獲得免疫ネットワークは、腸管組織における病原性微生物に対する生体防御と非病原性微生物との共生による恒常性の維持に極めて重要な役割を果たしている。そして、ある種の遺伝的因子や dysbiosis などの環境因子の作用により腸管免疫の生体防御機構やトレランスが破綻すると腸管免疫異常が生じ、さらに全身性免疫の異常へ進展して自己免疫疾患の発症に繋がると考えられている。最近、自己免疫性関節炎モデルである BALB/c 系 SKG マウス (Hashimoto, et al, *J Exp Med*, 2010) に関節炎の誘導に関与する T 細胞受容体と対応自己抗原が特定された (Ito et al, *Science*, 2014)。さらに、関節リウマチ (RA) 患者で認められる dysbiosis が自己反応性 T 細胞の活性化を介して関節炎の発症に関与することを RA 患者の糞便を定着させた SKG マウスの解析から明らかにしており、dysbiosis で認められる腸内細菌叢の中で *Prevotella copri* の増加が RA 発症に関与することを示唆している (Maeda et al, *Arthritis Rheumatol*, 2016)。また最近、SLE においても、ループス腎炎と特定の腸内細菌に対する免疫の関連が報告され (Azzouz et al, *Ann Rheum Dis*, 2019), SLE 患者の糞便中でも *Prevotella copri* の増加が認められている (He, et al, *Gut Pathog*, 2016, Kasselmann et al, *Atherosclerosis*, 2018)。研究分担者の幡野は神経堤細胞に特異的に発現しているホメオボックス遺伝子 *Ncx* を同定し、腸管で一酸化窒素 (NO) 産生神経が増加することを報告している。最近、幡野や研究分担者の有馬らは *Ncx*-ノックアウト (KO) マウスにおいて dysbiosis を認め、NO の無毒化酵素 Nitric Oxide reductase flavohemoglobin をコードする遺伝子 *NorV* 陽性の腸内細菌の優勢を認めている。そこで、学問的問いとして、自己免疫疾患の病態制御機構に対する腸管粘膜免疫系の役割を解明するため、SLE や RA を代表とする膠原病の病態基盤である全身免疫系に対する、(1) 腸管神経系と粘膜免疫系の相互作用、(2) NO 合成酵素異常を介した粘膜免疫系機能の病理的意義、(3) 腸管免疫と膠原病の病理的関係性について SLE と RA の相違について解析を行った。

2. 研究の目的

自己免疫疾患の発症・進行に様々な要因が関与すると考えられている。特に最近、環境因子として腸内 dysbiosis の重要性が注目されており、腸管免疫機構が自己免疫性関節炎の誘導に関与することが国内外の研究グループによって報告されている。しかし、dysbiosis の誘導要因についてはまだ十分に明らかにされていない。本研究は、マウスの SLE モデルや RA モデルの解析を通して、自己免疫疾患の発症・維持機構における腸管の神経・免疫系制御機構や NO の役割を解明し、さらに新規治療の開発に繋がる探索・基盤的研究を行うことを目的とする。

3. 研究方法

BALB/c 系 SKG マウスは、T 細胞受容体刺激伝達分子 ZAP-70 の点変異により、T 細胞受容体のシグナルの強度を弱める。その結果、胸腺における負の選択異常より CD4⁺CD8⁺ double-positive T 細胞 (DPT) が増加する。そして排除から回避した自己反応性 T 細胞により、関節炎が惹起されることから RA モデルとして用いられている (J Exp Med, 2010;207:1135-

1143). 最近, C57BL6 系の SKG マウスが SLE 様臓器病変および免疫学的異常を呈することが報告された. 本研究は自己免疫性疾患の病態に対する腸管神経系-粘膜免疫系-全身免疫系の相互作用を明らかにするために, SKG-Ncx- KO, SKG-Ncx-ヘテロ (Het), および SKG-Ncx-野生型 (WT) マウスを用いて SLE モデルおよび RA モデルを用いて作製し, それぞれモデルについて比較解析を行った.

(1) 自己免疫性疾患 (SLE および RA) モデルの作製

SKG-Ncx-KO マウスと SKG-Ncx-WT マウスに対して SLE 様病態を誘導するために, 8~10 週齢マウスに Toll 様受容体 7 のアゴニストであるイミキモドを週 3 回, 6 週間耳介塗布後に SLE モデルとして解析した. RA モデルとして SKG-Ncx-KO マウスと SKG-Ncx-WT マウスに対してマンナンを腹腔内投与した後に解析を行った. また, SKG マウス脾臓由来ナイーブ CD4⁺ 細胞を Ncx-WT と Ncx-KO マウスに養子移入した後にマンナンを腹腔内注射し, 関節炎誘導時期において同様に解析した. 関節炎スコアは, 手 (両側 2 か所) と手指 (両側 8 か所), 足 (両側 2 か所) と足趾 (両側 10 か所) について点数化して評価した (Sakaguchi N, et al. Nature. 2003 Nov 27;426(6965):454-60). 関節病理スコアは, Rooney スコアを改変し, 各項目と軟骨傷害の総スコアを調べた (Rooney M, et al. Arthritis Rheum. 1988 Aug;31(8):956-63.).

(2) 免疫学的解析

腸管, リンパ組織, 関節滑膜を含軟部組織, および消化酵素処理した後に各組織内からセルソーターで純化した CD4⁺T 細胞から抽出した RNA についてサイトカイン (I/II/III タイプ, IL-6, IL-10, IL-21, IL-23, GM-CSF, TGF β , IFN α) の遺伝子発現動態をリアルタイム RT-qPCR 法で解析した. また, 血清中の抗 dsDNA 抗体やリウマチ因子 (RF-IgM) を ELISA で測定した. また炎症マーカーである血清 CRP を測定した.

(3) 腎炎の解析

臨床的評価は試験紙法による尿蛋白の定性結果をスコアして評価した. 病理学的解析は腎糸球体補体 (C3) および IgG の沈着について免疫組織化学的に解析して評価した. 腎糸球体の形態解析は HE, PAS, PAM 染色によって評価した.

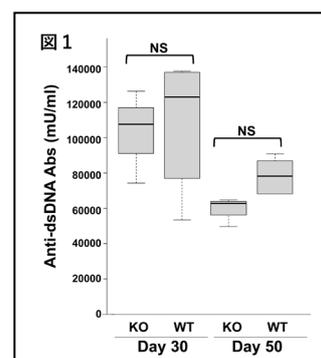
(4) リンパ組織の病理学的解析および細胞生物学的解析

腸管粘膜免疫系としてパイエル板 (PP), 上皮細胞間リンパ球 (IEL), 粘膜固有層リンパ球 (LPL) について免疫組織化学的に検討した. また, 各組織内 (小腸, 大腸) からセルソーターで抽出純化した T 細胞をフローサイトメトリー法で解析した.

4. 研究成果

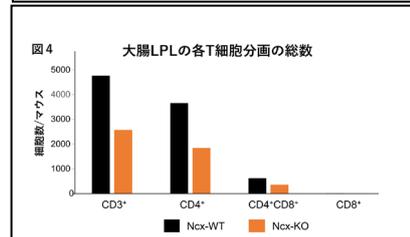
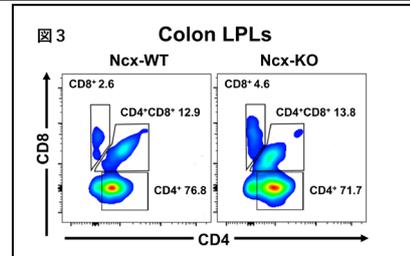
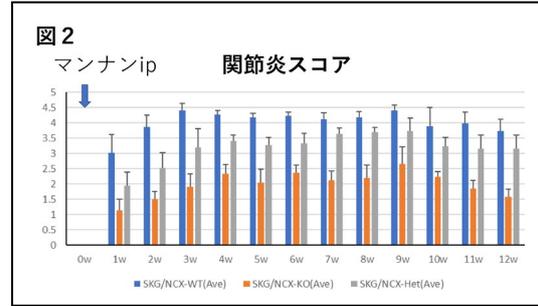
(1) SLE モデル

SKG-Ncx-KO マウスと SKG-Ncx-WT マウスのイミキモド誘導 SLE モデルを解析した. いずれのマウスもイミキモド投与後の血清中抗 dsDNA 抗体価の増加を認めたが両マウス間で有意差を認めなかった (図 1). また, 腎障害について WT マウスの尿蛋白スコアは 2.5 ± 0.5 , KO マウスのスコアは 3.5 ± 1.5 で有意差を認めなかった. 腎臓の病理学的解析において, いずれのマウスでも腎病変の所見は明らかでなかったが, 免疫組織学的解析の結果, いずれのマウスも腎糸球体において IgG, IgM, C3 の沈着を同様に観察された. 以上より予想に反して SKG-Ncx-KO マウスと SKG-Ncx-WT マウスで誘導された SLE 様病態に NCX の明らかな関与は認められなかった.



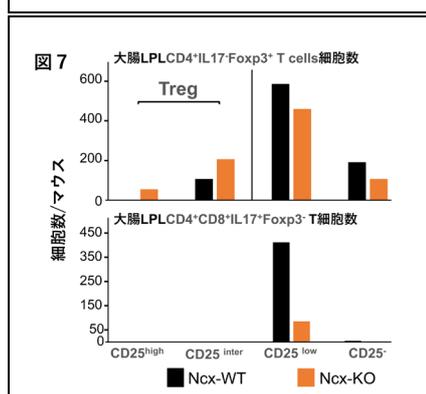
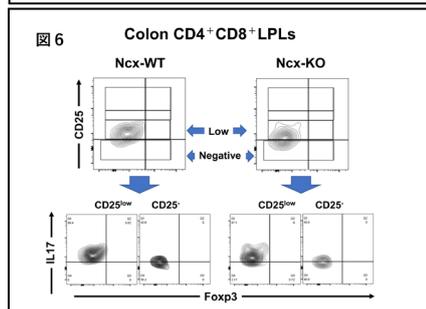
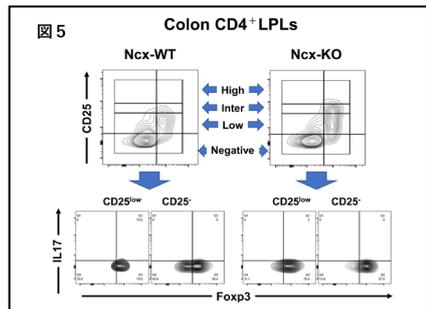
(2) RA モデル

SPF 環境下で SKG-Ncx-WT , SKG-Ncx-KO および SKG-Ncx-Het マウスに対してマンナン 20mg を腹腔内投与 14 週後に解析した結果, Ncx-KO の関節炎スコア値は, 関節炎誘導後は常に Ncx-WT よりも有意に低値であった. また, Ncx-Het の関節スコア値は, Ncx-WT と Ncx-KO の中間を示した (図 2). 関節炎誘導 2 週間および 12 週間後の関節病理スコアは SKG-Ncx-WT マウスに比べて SKG-Ncx-KO マウスにおいて有意に低値 (2 週間後) または低値の傾向 (12 週間後) であった. また, Ncx-WT マウスと比べて Ncx-KO マウスは関節炎の軽減に伴って CRP も有意に減少した. 以上の結果より NCX の欠損は, その遺伝子発現低下量に依存して病原性 CD4⁺T 細胞依存的に発症する関節炎を軽減することが明らかになった. 一方, SKG-Ncx-KO マウスと SKG-Ncx-WT マウスにおける血清 RF-IgM 抗体価は, SKG-Ncx-KO マウスと SKG-Ncx-WT マウスで有意な差異を認めなかった.

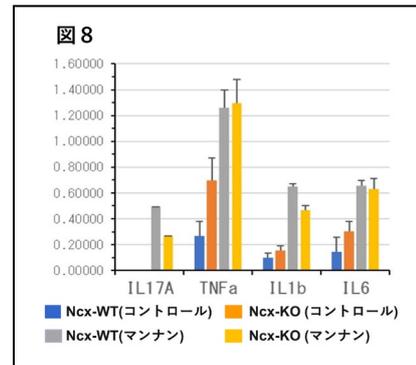


(3) RA モデルにおける NCX の腸管免疫系に対する役割

今まで, 他のグループから SKG マウスのマンナン誘導性関節炎の解析により, 関節炎は大腸由来の病原性 IL-17⁺CD4⁺T 細胞の局所集積が病態に関与し, さらに DSS による薬剤誘発性腸炎により IL-17⁺CD4⁺T 細胞の病原性が増強することが報告されている. 一方, RA の病態に環境要因の重要性が考えられ, その中で特に腸内細菌叢の変化が最近注目されている. 自己免疫性関節炎の発症は, 感染による免疫系の不活化や何らかの要因で誘導された dysbiosis による免疫交差反応により腸管免疫系で活性化された自己免疫性 T 細胞による関節滑膜の局所免疫過剰応答の進展から発症する病態の可能性が推定されている. 研究分担者の幡野らは Ncx-KO マウスでは dysbiosis により NO 耐性病原性腸内細菌の優勢が認められていることや, 過剰な NO 産生による大腸粘膜上皮の損傷, そして IL-6 や IL-1 の産生増加および, マクロファージや好中球が増加し, さらに野生型マウスと比べて DSS 大腸炎が増悪することを認めている (投稿中). また, SKG マウスのマンナン誘導関節炎は DSS 大腸炎に伴い大腸由来自己免疫性 IL-17 産生 T 細胞の関節内遊走により増悪することが報告されている. そこで, NO は炎症性疾患の病態を制御して炎症性腸疾患や RA 滑膜炎に関与すると考えられていることから SKG-Ncx-KO マウスの関節炎の増悪が予想された. しかし, 実際には SKG-Ncx-KO マウスの



関節炎は野生型マウスと比較して軽症化が認められたことから、RA モデルにおける Ncx の腸管免疫システムに対する役割をさらに解析を進めた。マンナン投与後関節炎誘導時期の腸管 PP および小腸と大腸の各 LPL についてフローサイトメトリー法で CD3⁺CD4⁺CD8⁺T 細胞 (CD4⁺T), CD3⁺CD4⁺CD8⁺T 細胞 (CD8⁺T), および DPT について IL-17 産生細胞と Foxp3 陽性細胞 (Treg) に焦点をあてて解析した。PP, 小腸 LPL および大腸 LPL の IL-17 産生細胞は CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞いずれのマウスにお



いても同定されなかった。また Foxp3⁺細胞は CD8⁺T 細胞では認めなかった。PP において DPT 細胞は LPL と異なり明らかな分画をいずれのマウスでも認めなかった。PP において Ncx-WT マウスに対して、Ncx-KO マウスの CD3⁺T 細胞 (全 T 細胞) と CD4⁺T 細胞の総数は約 20~30% の減少, CD8⁺T 細胞の総数は約 50~60% の減少を認めた。Ncx-KO マウスの CD8⁺T 細胞の全 T 細胞に対する割合は Ncx-WT と比較して約 50% の減少を認めたが, Ncx-KO マウスの CD4⁺T 細胞の割合は Ncx-WT と同程度であった。一方, Ncx-KO マウスの CD25^{high~intermediate} Foxp3⁺CD4⁺T 細胞の総数は Ncx-WT と比較して約 20~30% の減少を認めたが, 全 CD4⁺T 細胞に対する割合は Ncx-WT と同程度であった。小腸の LPL における Ncx-KO マウスの全 T 細胞の総数, CD4⁺T 細胞, CD8⁺T 細胞の総数は Ncx-WT マウスと比較して約 40~50% の減少を認めたが, DPT 細胞は Ncx-WT マウスと同程度であった。また全 T 細胞に対する Ncx-KO マウスの CD4⁺T 細胞, CD8⁺T 細胞の割合は Ncx-WT と比較して同程度であったが, DPT 細胞の割合は Ncx-WT マウスと比べて約 3~4 倍であった。小腸の LPL における Ncx-KO マウスの CD25^{high~intermediate} Foxp3⁺CD4⁺T 細胞の総数は Ncx-WT と比較して約 50~70% の減少を認めたが, 全 CD4⁺T 細胞に対する割合は Ncx-WT とほぼ同程度であった。DPT 細胞については Ncx-KO マウスの CD25^{high} Foxp3⁺T 細胞総数は Ncx-WT マウスの約 5~6 倍増加した。一方, IL-17 産生 CD25^{low}T 細胞総数は Ncx-WT マウスと同程度であった。大腸の LPL はいずれのマウスにおいても, その 90% 以上は CD4⁺T 細胞と DPT 細胞で構成され, Ncx-KO マウスの全 T 細胞の総数, CD4⁺T 細胞, CD4⁺CD8⁺T 細胞の総数は Ncx-WT マウスと比較して約 40~50% の減少を認めた (図 3, 図 4)。CD4⁺T 細胞において Ncx-KO マウスの CD25^{high~intermediate} Foxp3⁺CD4⁺T 細胞の総数は Ncx-WT と比較して約 2~3 倍の増加を認めた (図 5, 図 7)。一方, IL-17 産生 CD25^{low}T 細胞総数は Ncx-WT マウスに対して約 70~80% の減少を認めた (図 6, 図 7)。

SKG マウスに対するマンナン誘導性関節炎における腸内細菌叢に反応する大腸内自己免疫性 CD4⁺T 細胞について, 我々の研究では CD4⁺T 細胞や DPT 細胞の CD25^{high~intermediate} Foxp3⁺細胞が Treg 分画と考えられ, IL-17 産生細胞は主に CD25^{low~negative} DPT 細胞分画に存在すると考えられた。また, Ncx-KO マウスの関節滑膜における IL-17 の mRNA の発現は, Ncx-WT マウスに対して約 2 倍の増加をみとめたことから (図 8), Ncx-KO マウスの大腸 LPL において Treg の増加と IL-17 産生 T 細胞の減少が関節炎の軽減に関与すると考えられた。SKG マウスの関節炎に対する Ncx の病態制御の病理的意義は明らかにされていないが, 腸管の NO の産生が関節炎誘導性腸内細菌叢の変換を通して RA 様関節炎の軽減に関与することが示された。一方, SLE モデルの病態制御において Ncx の関与は認められなかったが, 腸内の環境変化による免疫システムの制御は様々な自己免疫疾患の病態に深く関与する可能性があるため, 腸管免疫系-全身免疫系ネットワークによる免疫疾患制御機構の解明についてさらなる研究が現在も継続進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Owada Takayoshi, Kurasawa Kazuhiro, Endou Hitoshi, Fujita Tomoe, Anzai Naohiko, Hayashi Keitaro	4. 巻 109
2. 論文標題 LAT1-specific inhibitor ameliorates severe autoimmune arthritis in SKG mouse	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 108817 ~ 108817
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.intimp.2022.108817	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大和田高義
2. 発表標題 自己免疫疾患のトピックス 関節リウマチと間質性肺疾患
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大和田高義
2. 発表標題 関節リウマチと臨床診断され治療された患者の、手足X線検査による関節リウマチ診断の再確認
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大和田高義
2. 発表標題 Ncx遺伝子欠損による腸管神経形成異常は関節炎の重症化を抑制する
3. 学会等名 第67回日本リウマチ学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Owada T, Tanaka A, Hirata H, Arima M, Fukushima Y, Kurasawa K
2. 発表標題 The Association Between Continuous Decreases in Serum RF Titers and Radiographic Remission of Joint Damage in RA Patients Treated with Biological or Targeted Synthetic DMARDs.
3. 学会等名 ACR(American College of Rheumatology 's Annual Meeting), (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tanaka A, Owada T, Hasegawa A, Hiyama T, Takamura Y, Miyao T, Yamazaki R, Arai S, Maezawa R, Arima M, Kurasawa K.
2. 発表標題 TCZ might be a risk factor for worsening of ILD, particularly of chronic ILD.
3. 学会等名 EULAR (European League Against Rheumatism) (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究分担者	有馬 雅史 (Arima Masafumi) (00202763)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	
研究分担者	幡野 雅彦 (Hatano Masahiko) (20208523)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	倉沢 和宏 (Kurasawa Kazuhiro) (30282479)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	

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