

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20595

研究課題名（和文）感染症としての関節リウマチ発症機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the pathogenesis of rheumatoid arthritis as infectious disease

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ患者の糞便から単離したP. copri(RA-P. copri)が、健康人由来P. copri (HC-P. copri)より重篤な関節炎マウスモデルで惹起した。RA-P. copriは樹状細胞を強く活性化しTh17細胞を多く誘導したwhole genome sequenceを実施し、RA-P. copri株には、約100 kbのゲノム領域が挿入されていることが明らかになった。このゲノム領域は、ドランスポゾンに特有の配列を有していた。これらの結果から、RA-P. copriは、水平伝播により本領域を獲得していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、関節リウマチ患者には、関節炎を強く誘導するP. copri(RA-P. copri)が腸管内に多く定着していること、RA-P. copriには、健康人のP. copri (HC-P. copri)にはないゲノム領域が挿入されていることを見出した。本領域はHC-P. copriには存在しないことから、病原性を担っていることが示唆された。以上の結果は、関節リウマチが病原性を有するプレボテラ菌の腸管内定着（感染）により発症することを示しており、今後、本病原性プレボテラ菌を標的とした関節リウマチの治療、予防法の開発につながるものと考えられ、その学術的、社会的意義は大きいものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We found that a P. copri strain isolated from the faeces of rheumatoid arthritis patients (RA-P. copri) induced more severe arthritis than P. copri from healthy individuals (HC-P. copri) in two different mouse arthritis models. As a molecular mechanism, we found that RA-P. copri strongly activated dendritic cells and induced more Th17 cells. Furthermore, whole genome sequencing of RA-P. copri and HC-P. copri was performed, which revealed that a genomic region of approximately 100 kb was inserted in the RA-P. copri strain. This genomic region had sequences specific to the transposon. These results indicate that RA-P. copri acquired this region by horizontal gene transfer. The absence of this region in HC-P. copri suggests that it may be responsible for pathogenicity.

研究分野：免疫学

キーワード：関節リウマチ 腸内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) の発症には、遺伝要因と環境因子の双方の関与が示唆されている。環境要因の中では、喫煙、歯周病、性ホルモンとの関連が示唆されている。古くより、ミノサイクリンなどの抗菌薬が抗リウマチ薬として使用されていること、サラゾスルファピリジンなどの抗菌作用を持つ薬剤が抗リウマチ薬として使用されていることから、RA の病態に腸内細菌を含む微生物の感染が関与していると考えられている。我々は、これまでの研究で関節リウマチ患者の腸内細菌叢で *Prevotella copri* 菌が増加していることを発見し、無菌マウスにヒト腸内細菌叢を再現することにより、関節リウマチ患者由来の *Prevotella copri* 菌が関節炎の発症に関与することを示した (Maeda Y et al. Arthritis Rheumatol. 2016; 68:2646-2661.)。しかし、世界に目を向けると、穀物を主体とする地域では、健常者でも *P. copri* 菌が腸内細菌の半分以上を占めるほどに増加していることが報告されている。さらに、最近の報告では、同じ *P. copri* でも性質が株により異なることが報告されている (Cell Host Microbe. 2019 ;25:444-453.e3.)。これらのことから、健常者は宿主に有益な *P. copri* 菌を持っているが、関節炎惹起能の高い病原性の *P. copri* 菌が感染し腸内で増殖すると RA を発症するという仮説が考えられた。

2. 研究の目的

Helicobacter pylori の感染が胃潰瘍の原因となるのと同じように、病原性 *Prevotella copri* 菌の感染が関節リウマチの発症の原因となる、すなわち、関節リウマチが感染症により発症するという仮説のもと、同菌による関節炎誘導の分子機構を明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) *Prevotella copri* 菌の単離

はじめに、関節リウマチ (RA) 患者及び健常者の便から嫌気培養法にて *Prevotella copri* 菌を単離する。具体的には、RA 患者及び健常者の便を嫌気下で研究室まで輸送し、段階希釈液を作製し、血液寒天培地で培養する。得られたコロニーを *Prevotella* 属の primer で PCR を行い、PCR 産物を電気泳動し、増幅産物が得られていることを確認する。増幅産物を精製し、シークエンス PCR を行い、シークエンスにて 16S rRNA 配列を解析する。データベースサーチにより、菌種を同定し、*P. copri* 菌であることを確認する。

(2) 関節炎モデルマウスへの *P. copri* 菌の移入実験

単離した RA 患者由来の *P. copri* (以下 RA-*P. copri*) と健常者由来の *P. copri* (以下 HC-*P. copri*) を嫌気下で培養し、保存する。それぞれを関節炎モデルマウスに投与し感受性を評価する。具体的には、DBA/1 マウスに 4 種類の抗生剤を 5 日間投与し腸内細菌を死滅させた後に、培養した RA-*P. copri* と HC-*P. copri* を 5 日間連続で経口投与する。糞便を回収し、それぞれの *P. copri* がマウスに定着しているのを確認するとともに、型コラーゲンとアジュバントの混合したエマルジョンを DBA/1 マウスに皮内投与する。3 週間後にブースターとして、型コラーゲンとアジュバントの混合したエマルジョンを再投与してマウスの関節炎のスコアを経時的に評価する。また、異なる関節炎モデルマウスでも解析する。SKG マウスを完全無菌化し、培養した RA-*P. copri* と HC-*P. copri* をそれぞれ経口投与する。糞便を回収し、それぞれの *P. copri* がマウスに定着しているのを確認する。ザイモザン投与し、関節炎を誘発し、マウスの関節炎のスコアを経時的に評価する。

(3) RA-*P. copri* の関節炎重症発症機構の解析

上記の計画で実施するコラーゲン誘導性関節炎、SKG マウスとも関節炎の発症に Th17 細胞が関与することが知られている。そこで、RA-*P. copri* と HC-*P. copri* の Th17 細胞誘導能を比較解析する。骨髄由来樹状細胞を RA-*P. copri* と HC-*P. copri* の死菌で刺激し、Th17 細胞誘導に関わるサイトカイン IL-6、IL-23 の産生能を比較解析する。RA-*P. copri* と HC-*P. copri* の死菌で刺激した樹状細胞とナイーブ CD4 陽性 T 細胞を共培養し、IL-17 産生性 T 細胞誘導能を比較解析する。

(4) *P. copri* 菌の whole genome sequence 解析

RA-*P. copri*、HC-*P. copri* の whole genome sequence 解析を行う。RA-*P. copri* と HC-*P. copri* のゲノム配列の比較解析を行い、RA-*P. copri* 特異的なゲノム配列を同定する。

4. 研究成果

(1) *Prevotella copri* 菌の単離

関節リウマチが、病原性 *Prevotella copri* の感染により発症することを証明するため、健常人、関節リウマチ患者の糞便よりそれぞれ *P. copri* 株を単離した。5 名の関節リウマチ患者より 12 株 *P. copri* (RA-*P. copri*) を単離した。また、5 名の健常人より 16 株の *P. copri* (HC-*P. copri*) を単離した。これらの単離株と購入した reference 株を whole genome sequence 解析した。その結果、複数種の *P. copri* は同株であることが判明し、RA-*P. copri* は 5 種の異なる株、HC-*P. copri* は 8 種の異なる株であった。

(2) 関節炎モデルマウスへの *P. copri* 菌の移入実験

DBA/1 マウスに 4 種類の抗生剤を 5 日間投与し腸内細菌を死滅させた後に、培養した RA-*P. copri* と HC-*P. copri* を 5 日間連続で経口投与した。糞便を回収し、それぞれの *P. copri* がマウスに定着しているのを確認した後、型コラーゲンとアジュバントの混合したエマルジョンを DBA/1 マウスに皮内投与し、3 週間後にブースターとして、型コラーゲンとアジュバントの混合したエマルジョンを再投与してマウスの関節炎のスコアを経時的に評価した。その結果、2 回目の投与後 5-8 週において、RA-*P. copri* を投与したマウスは HC-*P. copri* を投与したマウスと比較して、重篤な関節炎を認めた (図 1)。

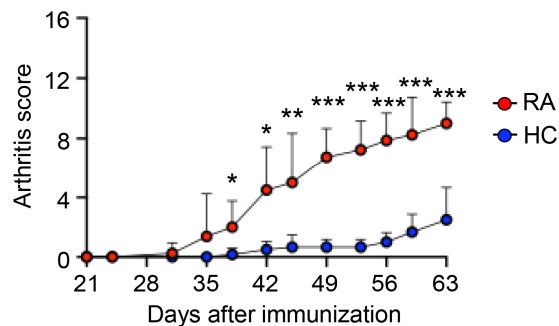


図 1

さらに、異なる関節炎モデル(SKG マウスモデル)を用いて検証した。完全無菌の SKG マウスに、RA-*P. copri*、HC-*P. copri* をそれぞれ定着させることができた。関節炎の重篤度を観察すると RA-*P. copri* を定着させた SKG マウスがより重篤な関節炎を発症した (図 2)。

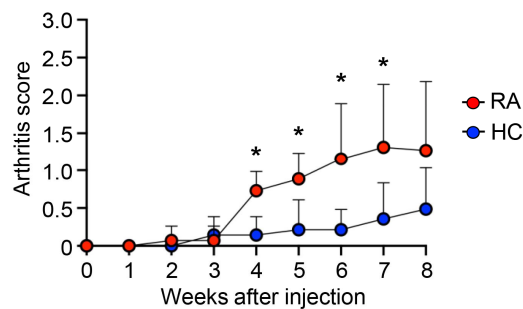


図 2

以上の結果から、RA-*P. copri* は、関節炎発症という観点から病原性の高い腸管定着性の細菌であることが明らかになった。

(3) RA-*P. copri* の関節炎重症発症機構の解析

次に、RA-*P. copri* による関節炎重篤化のメカニズムを解析した。RA-*P. copri*、HC-*P. copri* を定着させた SKG マウスの大腸、所属リンパ節、関節から T 細胞を回収し、IFN-gamma, IL-17 を指標に Th1/Th17 応答をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、RA-*P. copri* を定着させたマウスで、Th17 細胞が増加することを見出した。骨髄由来樹状細胞を RA-*P. copri* および HC-*P. copri* の死菌で刺激すると、RA-*P. copri* で刺激した樹状細胞が、Th17 関連サイトカインである IL-6, IL-23 を高産生した。また、RA-*P. copri* で刺激した樹状細胞をナイーブ CD4 陽性 T 細胞と共培養すると、Th17 細胞への分化が強く誘導された。以上の結果から、RA-*P. copri* は、腸管に定着すると自然免疫細胞を強く活性化し、Th17 応答を強く惹起することが明らかになった。

(4) *P. copri* 菌の whole genome sequence 解析

P. copri 菌の whole genome sequence の結果を詳細に解析した。その結果、RA-*P. copri* には、5 種の菌株に共通して約 100 kb のゲノム領域が挿入されていることを見出した (図 3)。このゲノム領域は、ドランスボゾンに特有の配列を有していた。これらの結果から、RA-*P. copri* は、水平伝播により本領域を獲得していることが明らかになった。本領域は、HC-*P. copri* には存在しないことから、病原性を担っている可能性が示唆された。

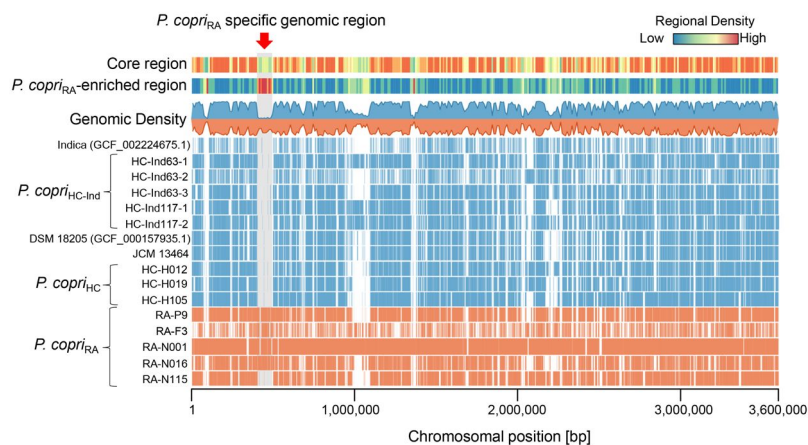


図 3

RA-*P. copri* (*P. copri*_{RA})には、HC-*P. copri* (*P. copri*_{HC-ind}, *P. copri*_{HC})にないゲノム領域(*P. copri*_{RA}-specific genomic region)が存在する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tani H, Li B, Kusu T, Okumura R, Nishimura J, Okuzaki D, Motooka D, Arakawa S, Yoshihara T, Ogino T, Tsai SH, Furuta Y, Muneta M, Nakamura S, Fukusaki E, Yamamoto K, Yagita H, Kayama H and Takeda K	4. 巻 118
2. 論文標題 The ATP-hydrolyzing ectoenzyme E-NTPD8 attenuates colitis through modulation of P2X4 receptor-dependent metabolism in myeloid cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 e2100594118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2100594118	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 Hsu CC, Okumura R, Motooka D, Sasaki R, Nakamura S, Iida T, Takeda K	4. 巻 18
2. 論文標題 Alleviation of colonic inflammation by Lypd8 in a mouse model of inflammatory bowel diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int Immunol	6. 最初と最後の頁 359-372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab012	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 Sakaguchi T, Okumura R, Ono C, Okuzaki D, Kawai D, Okochi Y, Tanimura N, Murakami M, Kayama H, Umemoto E, Kioka H, Ohtani T, Sakata Y, Miyake K, Okamura Y, Baba Y, Takeda K	4. 巻 10
2. 論文標題 TRPM5 negatively regulates calcium-dependent responses in lipopolysaccharide-stimulated B lymphocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell reports	6. 最初と最後の頁 107755
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.107755	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 Ogawa T, Okumura R, Nagano K, Minemura T, Izumi M, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Maeda Y, Kumanogoh A, Tsutsumi Y, Takeda K	4. 巻 534
2. 論文標題 Oral intake of silica nanoparticles exacerbates intestinal inflammation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 540-546
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.11.047	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 Kayama H, Takeda K	4. 巻 50
2. 論文標題 Manipulation of epithelial integrity and mucosal immunity by host and microbiota-derived metabolites.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur. J. Immunol.	6. 最初と最後の頁 921-931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.201948478	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 Nii Takuro, Maeda Yuichi, Motooka Daisuke, Naito Mariko, Matsumoto Yuki, Ogawa Takao, Oguro-Igashira Eri, Kishikawa Toshihiro, Yamashita Makoto, Koizumi Satoshi, Kurakawa Takashi, Okumura Ryu, Kayama Hisako, Murakami Mari, Sakaguchi Taiki, Das Bhabatosh, Nakamura Shota, Okada Yukinori, Kumanogoh Atsushi, Takeda Kiyoshi	4. 巻 82
2. 論文標題 Genomic repertoires linked with pathogenic potency of arthritogenic Prevotella copri isolated from the gut of patients with rheumatoid arthritis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 621 ~ 629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/ard-2022-222881	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 Yokoi T, Murakami M, Kihara T, Seno S, Arase M, Wing JB, Sondergaard JN, Kuwahara R, Minagawa T, Oguro-Igashira E, Motooka D, Okuzaki D, Mori R, Ikeda A, Sekido Y, Amano T, Iijima H, Ozono K, Mizushima T, Hirota S, Ikeuchi H, Takeda Kiyoshi	4. 巻 120
2. 論文標題 Identification of a unique subset of tissue-resident memory CD4+ T cells in Crohn's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2204269120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2204269120	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 Otake-Kasamoto Yuriko, Kayama Hisako, Kishikawa Toshihiro, Shinzaki Shinichiro, Tashiro Taku, Amano Takahiro, Tani Mizuki, Yoshihara Takeo, Li Bo, Tani Haruka, Liu Li, Hayashi Akio, Okuzaki Daisuke, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Okada Yukinori, Iijima Hideki, Takeda Kiyoshi, Takehara Tetsuo	4. 巻 219
2. 論文標題 Lysophosphatidylserines derived from microbiota in Crohn's disease elicit pathological Th1 response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20211291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20211291	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 Maeda Yuichi, Motooka Daisuke, Kawasaki Takahiro, Oki Hiroya, Noda Yoshimi, Adachi Yuichi, Niitsu Takayuki, Okamoto Shota, Tanaka Kentaro, Fukushima Kiyoharu, Amiya Saori, Hara Reina, Oguro-Igashira Eri, Matsuki Takanori, Hirata Haruhiko, Takeda Yoshito, Kida Hiroshi, Kumanogoh Atsushi, Nakamura Shota, Takeda Kiyoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Longitudinal alterations of the gut mycobiota and microbiota on COVID-19 severity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12879-022-07358-7	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11件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Kiyoshi Takeda
2. 発表標題 Host-microbiota Interaction for the Maintenance of Gut Homeostasis
3. 学会等名 World Microbe Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kiyoshi Takeda
2. 発表標題 Regulation of intestinal homeostasis
3. 学会等名 16th Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kiyoshi Takeda
2. 発表標題 Bacterial metabolites that mediate the host-microbiota interaction
3. 学会等名 he 53rd Annual Meeting of the French Society for Immunology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹田潔
2. 発表標題 腸内細菌叢と宿主の相互作用機構
3. 学会等名 第34回日本バイオフィルム学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹田潔
2. 発表標題 Role of microbiota in immune disorders
3. 学会等名 第62回日本消化器病学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹田潔
2. 発表標題 口腔内、腸内細菌叢と免疫疾患
3. 学会等名 第46回日本脳卒中学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹田潔
2. 発表標題 ディスバイオシスと免疫疾患
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kiyoshi Takeda
2. 発表標題 The host-microbiota interaction for the maintenance of intestinal homeostasis.
3. 学会等名 Conference on "Human Microbiome in Health and Disease" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kiyoshi Takeda
2. 発表標題 Identification of bacterial metabolites that exacerbate intestinal inflammation in Crohn's disease patients.
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kiyoshi Takeda
2. 発表標題 Microbiota-derived metabolites regulate intestinal homeostasis
3. 学会等名 9th Congress of International Human Microbiome Consortium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹田潔
2. 発表標題 腸管炎症の制御機構の解析
3. 学会等名 第59回日本消化器免疫学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
インド	THSTI			