

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号： 3 2 6 2 0
研究種目： 奨励研究
研究期間： 2022 ~ 2022
課題番号： 2 2 H 0 4 3 6 6
研究課題名 LMVの病態改善に寄与する腸内細菌叢由来代謝産物の同定

研究代表者

藤城 真樹 (Fujishiro, Maki)

順天堂大学・大学院医学研究科・技術補助員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000 円

研究成果の概要：全身性エリテマトーデスに合併するループス腸間膜血管炎(以下、LMV)は、血管炎を主因とし腸管の出血を伴う場合は予後が悪い。我々が確立したヒトのLMV病態を再現する誘導マウスモデルは、LMVを発症させる過程で、腸内細菌叢が顕著に変動していたことから、腸内環境の変化がLMVの発症に関与すると仮説を立てた。

本研究では、誘導LMVマウスモデルを用いてLMV誘導により変動する腸内細菌叢由来代謝産物を解析した。特に腸内の代謝産物を反映する糞便中の短鎖脂肪酸に着目し分析した結果、LMV誘導によって、プロピオン酸が有意に増加することを明らかにした。今後、プロピオン酸の増加が血管炎に与える影響について検証する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LMV病態の発症によって腸内細菌叢が顕著に変動し、それらを反映する腸内細菌叢由来代謝産物であるプロピオン酸が有意に増加することが、我々が確立したLMV誘導マウスモデルを利用することで明らかになった。このような増加したプロピオン酸がLMV病態に与える影響、特に血管炎に与える影響を明らかにできれば、将来的には、腸内のプロピオン酸濃度をコントロールする方法を提唱し、LMV病態の予防や改善、しいては患者QOLの向上に寄与できる可能性がある。

研究分野： 免疫学、病理学

キーワード： ループス腸間膜血管炎 (LMV) 腸内細菌叢由来代謝産物 プロピオン酸

1. 研究の目的

ループス腸間膜血管炎（以下、LMV）は、全身性エリテマトーデス（以下、SLE）に合併する病態である。症状は一般的な感染性腸疾患と類似しているが、血管炎を主因とし、腸管出血を伴う場合は予後が悪い。我々は、以前作成した誘導 LMV マウスモデルを利用し、LMV 病態の解析を進めている。その解析過程で、LMV を誘導すると腸内細菌叢が顕著に変動することを明らかにした。近年、腸内環境のバランスが崩れることにより自己免疫性疾患や炎症性疾患など、病態の悪化につながるといった報告がある。したがって、LMV 誘導でみられた腸内環境の変化が、LMV の病態に関与すると仮説を立てた。そこで、本研究では、LMV 病態に関与する因子を同定するため、腸内細菌の代謝産物に着目し、LMV 誘導により変動する糞便中の短鎖脂肪酸を分析した。

2. 研究成果

これまでの LMV 誘導マウスモデルの解析結果から、LMV 誘導によって腸内細菌叢が顕著に変動することを明らかにしている。したがって、腸内細菌叢由来代謝産物も同様に変動している可能性がある。そこで、LMV を誘導し、特に腸内細菌の代謝産物を反映する糞便に含まれる代謝産物の解析を行った。具体的には、まず LMV を、SLE で高値を示す自己抗体である抗 dsDNA 抗体がまだ上昇していない若齢の B/Wf1 マウス (SLE 自然発症モデルマウス) に、Toll 様受容体 7 (TLR7) アゴニストであるレジキモド (R848) を週 3 回、継続的に内耳に塗布して誘導した。特に、LMV 誘導 2 週間後より腸内細菌叢が変化していたため、誘導 3 週間後の糞便を採取し、これに含まれる短鎖脂肪酸に着目した解析を行った。結果、LMV 誘導群の糞便では、プロピオン酸が有意に増加していた。また、同時期に採取した糞便から DNA を抽出し qPCR を行ったところ、プロピオン酸産生菌が含まれる *Bacteroidetes* 門が増加することを明らかにした (Figure 1)。

Figure 1

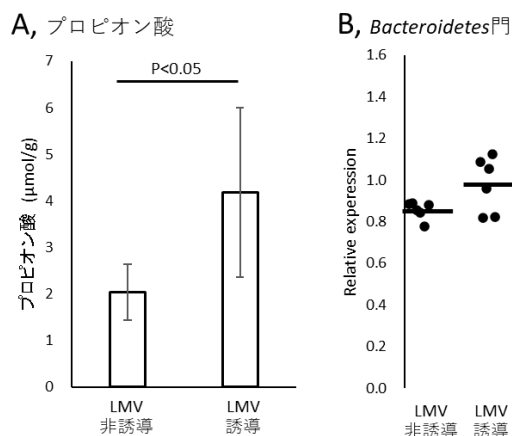


Figure 1

LMV誘導マウスモデルの誘導群の糞便中では、プロピオン酸と *Bacteroidetes*門の細菌群が増加
LMV誘導3週間後の糞便を用いて、非誘導群と誘導群を比較した
A, 糞便中の短鎖脂肪酸分析
B, 糞便中DNAのqPCR

これまでの LMV 誘導マウスモデルの解析で、LMV 誘導 3 週間後には病理組織学的に血管炎を伴う腸管出血が観察されることを明らかにしている。今回の分析で増加していた腸内細菌叢由来代謝産物のプロピオン酸は、腸内で過剰に増加し、腸管の毛細血管の血管炎の悪化に関与すると仮説を立て、血管内皮細胞株である HUVEC を用いて、血管内皮細胞に対する過剰量のプロピオン酸の影響を検討した。

血管内皮細胞の炎症を惹起するため、HUVEC に炎症性サイトカインである IL-1 β で刺激し、そこに高容量のプロピオン酸を添加後 24 h 刺激し、細胞から RNA を抽出した。そして、qPCR にて無刺激群、IL-1 β 刺激群、IL-1 β 刺激+プロピオン酸群で、血管内皮細胞の炎症で上昇する Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) の発現を比較した。HUVEC は、IL-1 β 刺激群で顕著に VCAM-1 の発現が増加したが、プロピオン酸の添加によって大きく VCAM-1 の発現が減少し、血管内皮細胞の炎症応答が抑制される傾向を示した (Figure 2)。

Figure 2

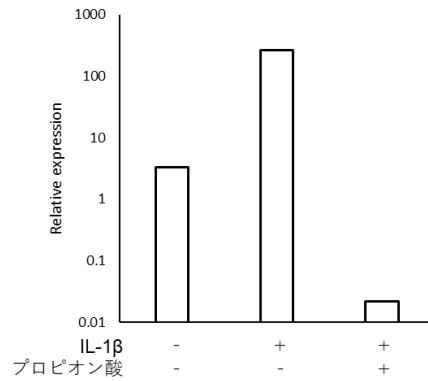


Figure 2

高容量のプロピオン酸は血管内皮細胞の炎症を抑制する傾向がある
HUVECにIL-1βで刺激し、そこに高容量のプロピオン酸を添加24h後に、
qPCRでVCAM-1の発現を比較した

また、プロピオン酸の増加が、血小板の活性化を引き起こす (Sanchez, *Nat Commun*, 2020) といった報告や、異常な血小板の活性化は、血管内皮細胞の炎症を惹起する (Nhek, *Arterioscler Thromb*, 2017) といった報告がある。さらに、我々は、LMV 誘導マウスにおいて、血管炎発症前より血小板が活性化することを明らかにしている (未発表データ)。しかし、HUVEC を用いた実験の結果では、高容量のプロピオン酸は血管内皮細胞に対して抗炎症作用を示した。したがって、*in vivo* では、過剰量のプロピオン酸が直接、血管炎を惹起しているのではなく、他の細胞に影響を与え、それらから放出される因子等が間接的に血管内皮細胞の炎症を惹起している可能性がある。

本研究では、LMV 誘導によって糞便中のプロピオン酸が増加することを明らかにした。今後、過剰量のプロピオン酸が LMV 病態の発症や悪化に関与するのか検討する。特に、血管炎の発症機序に着目し、高容量のプロピオン酸が血小板の活性化に関与し、間接的に血管内皮細胞に与える影響を検討する。将来的には、体内のプロピオン酸量を調節することにより、LMV 病態の予防やコントロールに役立てられる方法を探索していく。

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 1件/うちオープンアクセス 2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 |

〔学会発表〕 計1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ペリムマブの役割 |
| 3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

| | |
|----|--------|
| 氏名 | ローマ字氏名 |
|----|--------|