

科学研究費助成事業(基盤研究(S))公表用資料 [研究進捗評価用]

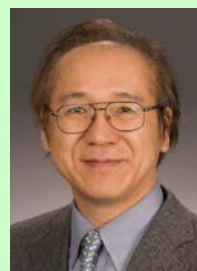
平成24年度採択分
平成26年3月19日現在

多発性硬化症と腸内細菌・腸管免疫の関連に関する研究

Study on the relationship between multiple sclerosis and gut microbiome

山村 隆 (YAMAMURA TAKASHI)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・
神経研究所免疫研究部・部長



研究の概要

多発性硬化症 (MS) は近年増加傾向が明らかな自己免疫疾患である。研究代表者はMS増加の背景に、食生活の欧米化による腸内細菌叢偏倚が関与する可能性を提唱してきた。この仮説を証明するためにMSの常在細菌叢を最新のゲノム解析手法で網羅的に解析し、MS発症に関連する腸内細菌異常を同定し、その矯正等による新たな予防・治療法を開発する研究である。

研究分野：医菌薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経病態免疫学

1. 研究開始当初の背景

近年我が国では難治性神経疾患である多発性硬化症 (MS) 患者数の顕著な増加傾向を認めている。我々は生活習慣 (特に食生活) の欧米化が腸内細菌叢の変化、ひいては免疫系の変調につながり、その結果MSが増加している可能性を提唱して来た。この仮説の根拠として、腸内細菌叢を抗生物質で偏倚させることによって、自己反応性Th17細胞の活性が抑制され、MSの動物モデルが軽症化することを報告した (Am. J Pathol. Yokote et al. 2008)。

2. 研究の目的

網羅的・定量的なゲノム解析を導入することによってMS患者の常在細菌叢偏倚の実態を明らかにし、MSの動物モデルで得られた腸内細菌と自己免疫病態連関に関する知見を、世界ではじめてMS患者で証明することにある。また得られた知見をもとに、MSの診断・予防・治療につながるような知見を獲得することも目的としている。

3. 研究の方法

本研究ではMS患者の常在細菌叢異常と免疫機能異常を対応させ、特定の菌種の増減が免疫病態を修飾するメカニズムに迫る。常在菌の多くは培養が困難でありDNA配列が未知のものが多い。本研究ではMS患者、対照疾患、健常者の腸管および口腔内常在細菌叢を

16S リボゾーム遺伝子 (16S) およびメタゲノム情報から解析する。これらの配列情報は次世代シーケンサーを用いて網羅的に取得する。平行して患者血液リンパ球サブセットの偏倚をフローサイトメーター解析で証明し、菌種の変化との対応を解析する。また腸内細菌と自己免疫の関連を、EAEモデルにおいて解析する。

解析に用いる試料 (血液、糞便、唾液) は国立精神・神経医療研究センター病院通院中の患者より、文書に寄る説明と同意を確認した上で採取する。

4. これまでの成果

MS患者糞便試料の解析：ロシュ社454GS Jrシーケンサーを用いて、16S rRNA遺伝子 (16S) のV1-V2領域のシーケンシング解析を行った。得られた16Sリードのうち、low qualityリードを除き、3,000リード/サンプルを用いて、菌種数の見積りと菌種組成解析を行った。菌種組成解析では、16Sリードのクラスタリング (UCLUSTプログラムを使用) によるOTU解析によって得られたOTUsの16Sデータベース (RDP) への相同検索による菌種帰属と菌種組成比 (門と属レベル) を求めた。さらに、これらMSデータを健常コントロール群データとの比較解析を行った。

MSと炎症性腸疾患の異同：炎症性腸疾患では、炎症性腸疾患 (IBD) の腸内フローラに検出されるOTU数は有意に低下する (健常者の2/3程度) ことが知られて

いる。MSと健常者の腸内細菌叢の比較では、菌種組成の多様性に関しては有意な差異を認めなかった。

MSの菌種組成：Bacteroidetes、Firmicutes、Actinobacteria、Proteobacteriaの4門が主たる構成細菌種であり、これらは優占する構成菌種の種類は健常者群と同様であった。

腸内細菌叢の組成：MS群から作成した種レベルの系統樹を健常者群と比較（UniFrac距離解析）したところ、MS群の腸内フローラの全体構成が有意に健常者と異なる結果を得た。すなわち、MSの腸内フローラは、健常者群との比較において、種レベルでの構成細菌種の有無及びその存在比に有意な違いがあることが示唆された。

MSにおいて減少・増加する菌種：健常者と比較してMSで減少または増加する菌種を、それぞれ約20種同定した（菌種の詳細は論文に掲載予定）。比較的少ないサンプル数で有意差が得られた菌種である。未治療の患者、インターフェロンβやステロイド治療を受けている患者を含んでいるが、治療との関連は見いだせなかった。

医学・生物学的意義：炎症性腸疾患で減少する菌種の一部が、MSにおいても減少していることを確認した。この菌種は抗炎症性サイトカインであるIL-10産生を促す機能を有し、MS患者における腸管免疫の偏倚に関わる可能性が示唆された。

免疫制御性脂質を発現する菌種の一部が、MSで減少することを確認した。MSではさまざまな制御性リンパ球の異常が確認されているが、腸内細菌異常と関連づけられる可能性があり、今後の研究が重要である。

[まとめ]

腸内細菌叢のゲノム解析によって、MS発症の背景に腸内細菌の乱れが存在することが確認された。MSで減少または増加している細菌種の中には、Crohn病で減少している細菌種を初めとして、機能的な意義を有する細菌種が含まれていた。異なる免疫病（例えばMSとCrohn病）の発症に共通の遺伝素因が関与することが明らかになっているが、遺伝因子とともに、共通の腸内細菌叢、腸内環境の関与することが、今回の研究によって明らかになったと考えられる。

腸内細菌、腸内環境と免疫異常の関連を解析することによって、病態に即した予防・治療法の開発されることが期待できる。

5. 今後の計画

- ・健常者とMSの両群間で有意に変動した菌種/OTUsについて、統計検定及び他の健常者群のデータセットとの比較解析からより正確で信頼できるMS-associated speciesを絞り込む。これら菌種の性質について、そのゲノム情報や他疾患におけるこれら菌種の挙動/変動などを調べる。
- ・唾液常在菌の解析を進めて臨床レベルで利用可能な測定系の確立を目指す。
- ・MSの発症関連細菌種を発現するノトビオートマウス作製の試みを継続する。

6. これまでの発表論文等

- 1) 山村 隆：多発性硬化症と腸内細菌叢。実験医学増刊。常在細菌叢が操るヒトの健康と疾患（編集 大野博司、服部正平）。32: 800-804, 2014
- 2) 服部正平：ヒトマイクロバイオームの大規模シーケンス解析。実験医学増刊。常在細菌叢が操るヒトの健康と疾患（編集 大野博司、服部正平）。32: 680-687, 2014
- 3) Yamamura, T. and S. Miyake: Diet, gut flora, and multiple sclerosis: Current research and future perspectives. *Multiple Sclerosis Immunology*. (Edited by Takashi Yamamura & Bruno Gran), Springer pp115-126, 2013
- 4) 山村 隆：マイクロバイオームと神経疾患。医学のあゆみ。246: 1103-1106, 2013
- 5) Chiba, A., R. Tajima, C. Tomi, Y. Miyazaki, T. Yamamura, and S. Miyake: Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum* 64:153-161, 2012
- 6) Sato, W., A. Tomita, D. Ichikawa, Y. Lin, H. Kishida, S. Miyake, M. Ogawa, T. Okamoto, M. Murata, Y. Kuroiwa, T. Aranami, and T. Yamamura: CCR2+CCR5+ T cells produce matrix metalloproteinase-p and osteopontin in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Immunol.* 189: 5057-5065, 2012
- 7) Miyazaki, Y., S. Miyake, A. Chiba, O. Lantz, and T. Yamamura: Mucosal-associated invariant T cells regulate T helper type 1 response in multiple sclerosis. *Int Immunol* 23:332-337, 2011
- 8) Chihara, N., T. Aranami, W. Sato, Y. Miyazaki, S. Miyake, T. Okamoto, M. Ogawa, T. Toda, and T. Yamamura: Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *PNAS* 108 : 3701-3706, 2011

ホームページ等

http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_men/yamamura-e.html