

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2015

課題番号：24229006

研究課題名(和文)多発性硬化症と腸内細菌・腸管免疫の関連に関する研究

研究課題名(英文)Study on the role of gut microbiota and gut immunity in multiple sclerosis

研究代表者

山村 隆 (Yamamura, Takashi)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所免疫研究部・部長

研究者番号：90231670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 112,400,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)は、近年増加傾向が著しい中枢神経系の自己免疫疾患である。本研究では、MS増加の要因として、生活習慣の欧米化、腸内細菌叢変化、腸管免疫の変調が関与する可能性を検証した。嫌気性細菌の多い腸内細菌叢を、ゲノム科学的手法で解析し、MS患者における細菌叢構成の偏倚(dysbiosis)を確認した。短鎖脂肪酸を生成するクロストリジウム菌のMS糞便での減少は、MS発症との関連を示唆した。今回新たに発見したCD4陽性上皮内リンパ球(regulatory IEL)は、腸内細菌の影響を強く受け、同細胞の研究はMS予防法の開発において重要である。

研究成果の概要(英文)：Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system, of which prevalence is remarkably increasing in developed countries for unknown reason. Here we explored if the increase of MS could be explained by alterations in gut immune system, caused by altered gut microbiota associated with westernization. Using next generation sequencer, we have analyzed the gut microbiota compositions in MS patients as compared with healthy individuals. This analysis showed a significant dysbiosis in MS, which may promote development of MS. Most notably, we found a reduction of certain bacterial species in MS known to generate short chain fatty acids capable of inducing regulatory T cells. Furthermore, we were able to demonstrate the presence of gut flora-dependent CD4+ intraepithelial lymphocytes (IEL), which can inhibit development of animal MS model. Collective data supports the validity of our original idea that the increase of MS could be caused by westernization.

研究分野：神経内科学

キーワード：脳神経疾患 細菌 ゲノム 免疫学 トランスレーショナルリサーチ

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おり、その原因解明は急務である。腸内常在細菌叢 (commensal flora) と免疫系の密接な相互関係が明らかになってきたが、我々は日本における生活習慣の欧米化 (westernization) が腸内細菌叢の変化、腸管免疫の変調、さらには全身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きた。

この仮説の妥当性を示す証拠として、我々は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 の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) が軽症化することを 2008 年に報告した (Yokote et al. *Am J Pathol.* 2008)。海外でも我々の研究結果を追試確認する研究や我々のアイデアを支持する研究成果が相次ぎ、MS と腸内細菌叢の関連について研究の機運が高まっていた。

2. 研究の目的

1000 種類以上と言われる腸内細菌の多くは培養困難な嫌気性細菌であり、そのために腸内細菌叢 (gut microbiota) の解析に遅れが見られた。本研究では網羅的・定量的なゲノム科学の手法 (次世代シーケンサー利用) 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することを第一の目的とした。さらに MS 患者で数の異常の見られた細菌については、*in vivo* における意義をマウス投与実験によって検証した。また腸内細菌異常と自己免疫疾患発症を橋渡しする、腸内細菌依存性の制御性リンパ球を新たに同定し、今後の研究の礎を確保することも目的とした。

3. 研究の方法

本研究では MS 患者の贈剤細菌叢異常と免疫機能異常を対応させ、特定の菌種の異常が免疫病態を修飾するメカニズムを探る。常在菌の多くは培養不可能な嫌気性細菌であり DNA 配列が未知のものが多い。本研究では MS 患者、対照健常者の腸常在細菌叢を、16S リボソーム遺伝子 (16S) の遺伝子配列およびメタゲノム情報から解析した。これらの配列情報は次世代シーケンサー (NGS) を用いて網羅的に取得し、既知の遺伝子情報に基づく様々な解析手法や統計学的手法によって、MS における腸内細菌叢構成の異常を UniFrac Principal Coordinate (PCoA) 解析や UniFrac distance 解析によって評価した。また細菌の量的な変化を門、属、種のレベルで解析した。MS の糞便試料は、臨床診断が確実で再発寛解型 MS の病型を示す 20 例を選択し、対照は 40 例の健常人サンプル (単回採取) あるいは 18 名の健常人から繰り返し得られた、計 158 サンプルを用いた (以上の方法の詳細については PLOS ONE 論文

Miyake et al. *PLOS ONE* 2015 doi.org/10.1371/journal.pone.0137429 を参照)。

MS で減少の見られた細菌について、入手可能なものについては B6 マウスに経口的に反復投与し、その免疫系に対する効果を、EAE を誘導することによって評価した。EAE は MOG35-55 ペプチド/完全フロイントアジュバントをマウスの皮下に接種することによって誘導した。

上皮内リンパ球 (intraepithelial lymphocytes: IEL) の免疫制御法の評価については、EAE を自然発症する MOG35-55 特異的 TCR のトランスジェニックマウス (2D2) を用いた。IEL の flow cytometer による分離・解析、細胞移入、制御機能評価、DNA マイクロアレイ解析などの詳細については、*Nature Comm* 論文 (Kadowaki et al. *Nature Comm* doi:10.1038/ncomms11639) を参照。

4. 研究成果

安定期にある再発寛解型 MS 20 例と健常者 40 例の比較検討し、さらに同一の健常者より複数回採取された糞便試料を対照として、最終的に MS 患者で増加あるいは減少している細菌種を同定した。

3000 種類の 16S リードのクラスター解析に基づき、各糞便サンプルの Operational taxonomic units (OTUs) 数を決定して、菌種の多様性 (diversity) と豊潤度 (richness) を評価した。この結果、MS 患者は腸内細菌の菌数や菌種数において健常日本人に匹敵し、腸内細菌の多様性 (richness) という観点からは健常者と差異がないことが明らかになった。これは菌叢多様性の低下している IBD とは大きく異なる所見であり、MS では腸管炎症を認めないことが一因ではないかと考えた。次に細菌叢菌種の構造については、UniFrac 解析の結果、MS 患者と健常者、あるいは MS 患者同志の細菌構造は、健常者間の細菌構造の均一性に比較して、有意な偏倚があることが確認された。MS と健常者は異なるクラスターを形成する傾向を認め、MS の腸内細菌叢では中程度の細菌構造異常 (dysbiosis) が存在すると結論づけられた。

さらに細菌叢の菌種組成を門 (phylum) レベルで比較した (Firmicutes 門、Actinobacteria 門、Bacteroidetes 門、Proteobacteria 門)。MS で Bacteroidetes 門の低下傾向が認められたが、有意な差ではなかった。属 (genus) レベルの菌種組成の比較では、MS において *Faecalibacterium*、*Prevotella*、*Anaerostipes* の有意な減少が観察された。これらの細菌属は、酪酸発酵 (butyrate fermentation) に関係するため、腸管制御性 T 細胞の誘導にとっては不利な変化ではないかと推測された (後述)。

個々の細菌種では、MS で増加している

細菌 2 種類と減少している細菌 19 種類を確認した。これらの細菌については定期的な糞便採取が可能であった 18 例の健常者から得られた試料について再解析を行い、MS と健常者間の差異が健常者のサンプリングのタイミングには左右されないことを確認した。MS 患者において減少している菌種の大部分 (15 種) は Firmicutes 門の菌で、なかでもクロストリジウム属の Clostridia Cluster group a と group 1 に属する菌がほとんどを占めた。そのうち Faecalibacterium prausnitzii、Eubacterium rectale については、IBD においても減少している細菌であり、MS と IBD の発症機序に共通の機序が存在する可能性を示唆した。

Clostridia Cluster group a と group 1 の他の細菌が、炎症性リンパ球に対して抑制的に機能するリンパ球 (制御性 T 細胞; T reg) を効率よく誘導することが、Atarashi らによって報告されている。この機序については食物繊維を発酵させて生じた酪酸などの SCFAs が関与する。最近になって、SCFAs を投与することによって、マウスのみならずヒトにおいても T reg が誘導されることが報告されている (Gold R ら 2016)。今回同定された細菌種も同様の機能を持つ可能性が考えられる。

Firmicutes 属以外で減少していた菌種は、Bacteroides (B. stercoris, B. coprocola, and B. coprophilus)、Prevotella (P. copri), and Sutterella (S. wadsworthensis) であった。Bacteroides の減少は IBD でも報告されており、共通のメカニズムが示唆される。

MS 患者で減少している細菌の混合物をマウスに投与して EAE を誘導したところ、対照マウスに比較して EAE が軽症化することがわかった。投与された細菌に、自己免疫疾患の発症を阻害する機能を有する菌が含まれる可能性を示唆するが、現在詳細な検討を進めている (三宅ら。未発表)。また SCFAs の原料となる水溶性食物繊維の経口投与による EAE の抑制も確認された。

以上の結果を統合すると、近年の日本では、westernization により、食物繊維が少なく (diet fiber-low)、動物性脂質の多い (animal fat-high) 食生活が普及し、その結果 SCFAs 産生を介在する腸内細菌が減少し、その結果 SCFAs の減少さらには腸管 T reg 誘導が阻害されて、MS が発症しやすくなった可能性がある。

しかし我々は、本研究プロジェクトを推進する過程で、新たな制御性リンパ球 (regulatory IEL) を発見した (Kadowaki et al. Nature Comm 2016)。Regulatory IEL は westernization と MS の増加をつなぐ alternative pathways の存在を示唆する可能性があり、これからの研究に大きな期待がかかっている。

我々は EAE を自然発症する 2D2 マウスの小腸腸管上皮内に MOG35-55 に対する自己反応性を示すリンパ球が多数存在することを見出し、このリンパ球の機能に興味を持った。IEL は TCR を高発現する細胞と低発現する細胞に分けられたが、前者のなかで CD4 陽性のリンパ球は、細胞移入によって EAE を著明に抑制する機能のあることを明らかにし、この細胞を regulatory IEL と命名した (Nature Comm 2016)。Regulatory IEL は中枢神経系の炎症の場において、LAG3 分子を強く発現し、regulatory IEL の機能は LAG3、CTLA4、TGFβ などに依存することが明らかになった。驚いたことに、このリンパ球は腸内細菌に依存し、またキャベツやカリフラワーなどに含まれる Arylhydrocarbon receptor (AHR) ligand によって増殖することがわかった。この結果から、westernization によって変化する腸内細菌の中に、regulatory IEL に影響を与える細菌があるか否か、また AHR ligand を含む食餌が MS の予防に有効か否かという、興味ある可能性が提起された。

[結論]

日本人 MS 患者の増加には、食生活の変化による腸内細菌の変化が関係する可能性がある。クロストリジウム細菌、SCFAs、AHR ligand、regulatory IEL は、MS の治療や予防戦略を考える際に、重要なキーワードとなり、今後さらに一層の研究が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

Kadowaki, A., S. Miyake, R. Saga, A. Chiba, H. Mochizuki & T. Yamamura: Gut environment-induced intraepithelial autoreactive CD4⁺ T cells suppress central nervous system autoimmunity via LAG-3. **Nature comm** 7:11639, 2016 査読有 DOI: 10.1038/ncomms11639

Kimura, K., M. Nakamura, W. Sato, T. Okamoto, M. Araki, Y. Lin, M. Murata, and T. Yamamura: Disrupted balance of T cells under natalizumab treatment in multiple sclerosis. **Neurol: Neuroimmun & Neuroinflamm** 3, no.2 e210, April 2016 査読有 DOI:10.1212/NXI.0000000000000210

山村 隆: 腸内細菌と多発性硬化症。診断と治療 104: 187-190, 2016 査読無

Miyake, S., S. Kim, W. Suda, K.

Oshima, M. Nakamura, T. Matsuoka, N. Chihara, A. Tomita, W. Sato, S.W. Kim, H. Morita, M. Hattori, and T. Yamamura: Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. **PLOS ONE** 10: e0137429, 2015
査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0137429

Raveney, J.E.B., S. Oki, H. Hohjoh, M. Nakamura, W. Sato, M. Murata, and T. Yamamura: Eomesodermin-expressing T-helper cells are essential for chronic neuroinflammation. **Nature Comm** 6:8437, 2015
査読有 DOI: 10.1038/ncomms9437

Ota, M., N. Sato, T. Okamoto, T. Noda, M. Araki, T. Yamamura, H. Kunugi: Neuromyelitis optica spectrum disorder and multiple sclerosis: Differentiation by a multimodal approach. **MS and Related Dis** 4: 515-520, 2015 査読有
DOI:10.1016/j.msard.2015.08.006

門脇 淳, 山村 隆: 多発性硬化症と腸内細菌. *Medical Science Digest* 41: 150-153, 2015 査読無

山村 隆: 多発性硬化症. 特集 マイクロバイオームとウィローム. *臨床と微生物*. 42: 745-749, 2015 査読無

〔学会発表〕(計 8 件)

山村 隆: 多発性硬化症と腸内細菌. シンポジウム 2. 腸内細菌と疾患. 第 1 1 3 回日本内科学会講演会. 東京, 2016.4.16

Nakamura M, Hirakawa Y, Araki M, Lin Y, Sato W, Okamoto T, Murata M, Miyake S, and Yamamura T: IL-6 signal blockade may suppress plasmablast-mediated inflammation in multiple sclerosis through skewing its differentiating pathways . FOCIS 2015 . San Diego, USA 6.26, 2015

Kadowaki A, Miyake S, Saga R, and Yamamura T: Gut intraepithelial autoimmune CD4+ T cells exhibit a potential to suppress extraintestinal autoimmunity in LAG-3 dependent manner . FOCIS 2015 . San Diego, USA 6.26, 2015

Raveney B., Oki S, Nakamura M, Sato W, and Yamamura T: Identification of Pathogenic T helper cells in chronic

autoimmune neuroinflammation . FOCIS 2015 . San Diego, USA 6.25, 2015

Kimura K, Nakamura M, Sato W, Okamoto T, Araki M, Lin Y, Murata M, Takahashi R, and Yamamura T: Effect of Natalizumab on inflammatory and regulatory T cells in multiple sclerosis . FOCIS 2015 . San Diego, USA 6.25, 2015

山村 隆: 腸内細菌と多発性硬化症. シンポジウム 24. 解析がすすむ腸内フローラと疾患の関わり. 第 1 5 回日本抗加齢医学会総会. 5.31, 2015

Raveney B., S. Oki, T. Yamamura: NR4A2 modulation during autoimmune inflammation of the central nervous system reduces pathogenic T cell responses and ameliorates clinical disease. The 12th International Congress of Neuroimmunology, Mainz Germany, 11/11—14, 2014

山村 隆: 多発性硬化症と腸内細菌叢. 第 2 3 回腸内フローラシンポジウム. ヤクルトホール, 東京, 10.31, 2014

〔図書〕(計 3 件)

門脇淳, 山村 隆: 腸管免疫を標的とした免疫療法で免疫性神経疾患の治療は可能か. 免疫性神経疾患 病態と治療のすべて (アクトリアル 脳・神経疾患の臨床) 出版社: 中山書店 (2016.3.12 刊)

佐藤和貴郎, 山村 隆: 腸内細菌叢と多発性硬化症: ヒトマイクロバイオーム研究最前線, NTS, 第 3 編 第 7 章, 251-263, 2015

山村 隆: 腸内細菌叢と多発性硬化症. 腸内フローラと難病・自己免疫疾患. 腸内フローラシンポジウム 23. 神谷茂編. 医薬出版. pp 63-65, 2015

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称: 自己免疫疾患の診断方法、自己免疫疾患の診断用バイオマーカー、及び自己免疫疾患の予防又は治療剤

発明者: 山村 隆、三宅幸子、服部正平、森田英利

権利者: 国立精神・神経医療研究センター、学校法人順天堂、東京大学、麻布獣医学園

番号: 特願 2015-167839

出願年月日: 平成 2 7 年 8 月 27 日

国内外の別: 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 隆 (YAMAMURA Takashi)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター
神経研究所免疫研究部・部長

研究者番号：90231670

(2) 研究分担者

三宅 幸子 (MIYAKE Sachiko)

順天堂大学医学部免疫学講座・教授

研究者番号：50266045

服部 正平 (HATTORI Masahira)

早稲田大学理工学術院先進理工学研究科・教授

研究者番号：70175537

森田 英利 (MORITA Hidetoshi)

岡山大学大学院環境生命科学研究科・教授

研究者番号：70257294