

# 腸内代謝システムによる免疫制御機構の解明

慶應義塾大学薬学部生化学講座

長谷 耕二

## 1. 背景

ほ乳類は、出生直後に生涯で最も激しい環境変化を経験する。すなわち、無菌状態の子宮内で維持されたほ乳類の胎児は、生後直ちに膨大な数の環境微生物にさらされる。その一部は、粘膜や皮膚に定着し終生維持される。特に、ヒトの大腸には約40兆個もの腸内細菌が定着し、消化液では分解できない食物繊維などを微生物発酵（腸内発酵）により分解し、生体にとって有用な代謝産物に作り替える働きをしている。申請者らはこれまでに、腸内発酵によって産生される酪酸が、炎症やアレルギー反応を抑制する制御性T細胞（以下Treg）が増加する現象を見出した<sup>1</sup>。酪酸はヒストン脱アセチル酵素（HDAC）に対する阻害作用を有しており、この作用を通じてTreg細胞分化を司る*Foxp3*遺伝子領域のヒストンアセチル化を高め、遺伝子発現を促進することを明らかにしてきた。Rag1欠損マウスへCD45RB<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup>T細胞を移入することで誘導した実験的大腸炎モデル<sup>2</sup>に、酪酸化スターチ添加飼料を与えると大腸炎の症状が緩和する<sup>1</sup>。この作用は、酪酸によるTreg細胞の誘導に依存している。以上の研究より、腸内細菌は、発酵代謝産物の作用により宿主側の遺伝子発現をエピジェネティックに調節することで、免疫担当細胞の分化を制御し、結果的に免疫系のホメオスタシス維持に寄与していることを明らかにした。さらに、多発性硬化症や関節リウマチなど自己免疫疾患性患者においても、酪酸産生菌の低下に代表される腸内細菌バランス失調が認められることから、腸内で産生された酪酸は体内に取り込まれ、全身免疫系を調節している可能性が示唆される。そこで、本研究ではコラーゲン誘導性関節炎をモデルとして、自己免疫応答の制御における腸内代謝物の重要性を検証した。

## 2. 方法

II型コラーゲン誘導性関節炎は、過去の報告に従って誘導した<sup>3</sup>。すなわち、II型コラーゲンを二回、アジュバントとともにDBA/1マウスに皮下注射し、コラーゲンに対する自己免疫応答を惹起した。その際に、マウスに酪酸化スターチ添加飼料または対照スターチ飼料を給餌した。糞便中および血清中の短鎖脂肪酸濃度は、それぞれHPLC法およびLC-MS/MSを用いて測定した。免疫後、四肢の指関節の曲がり具合に基づき、経時的にスコアリングを行った。骨の形状はμCT画像解析システムを用いてイメージングを行った。血清中のコラーゲン特異的IgG抗体価はELSIAにより測定した。脾臓、関節滑膜および所属リンパ節より細胞を調整し、フローサイトメーターにより解析を行った。

## 3. 結果

### 1) 酪酸が自己免疫応答に与える影響

酪酸化スターチの投与群の糞便中の酪酸濃度は、対照スターチ摂取群に比べ、有意な増加が認められた。血清中の酪酸濃度も、酪酸化スターチの摂取によって約2倍に増加した、ものの、血清中の酪酸濃度は糞便中濃度に比べて数百分の1と非常に低い値であった。対照スターチ摂取群にコラーゲンを2回免疫すると、2週間以内に100%のマウスが関節炎を発症したが、酪酸化スターチを用いて大腸内酪酸濃度を高めることで、関節炎の発症率が有意に低下した。さらに関節炎のスコアにおいても、酪酸化スターチ摂取群で有意な改善が認められた。μCTによるイメージングでは、対照スターチ群では骨破壊が顕著であったが、酪酸化スターチ群では骨破壊は軽度にしかなかった。以上の観察結果より、酪酸は自己免疫性関節炎の発症を抑制する作用があることが判明した。

### 2) 酪酸による自己免疫応答抑制メカニズム

腸管腔内における酪酸の増加による関節炎抑制効果のメカニズムを調べるために、まず、免疫学的性状解析を実施した。炎症部位である関節の滑膜、所属リンパ節、および、脾臓より細胞を取得し、病態形成に関わる17型ヘルパーT細胞（Th17細胞）と、炎症を抑制する制御性T細胞（Treg細胞）の存在比率をフローサイトメトリーにより検出した。その結果、酪酸化スターチ群では対照スターチ群と比べてわずかにTreg細胞の増加が認められた。Th17細胞については両群で差が認められなかった。続いて、血清中のコラーゲン特異的IgG価を測定した結果、酪酸化スターチ群において抗体価の低下が観察された。

#### 4. 考察

近年、関節リウマチ患者において腸内細菌の異常(ディスバイオーシス)が報告されている<sup>4-6</sup>。関節リウマチ患者ディスバイオーシスの特徴として*Prevotella copri*の増加が最もよく知られている。*P. copri*はTh17細胞誘導作用があることが知られている<sup>6</sup>。Th17細胞は滑膜細胞からのRANKL発現を促す。RANKLは、破骨細胞の分化と活性化を促し、炎症性サイトカインを分泌させるため、骨破壊と炎症を促進する。無菌化したSKGマウス(関節リウマチ自然発症マウス)に関節リウマチ患者由来の腸内細菌を移植すると、健常人由来の糞便を定着させた場合に比べて、関節炎の病態スコアが悪化する。SKGマウスはTh17細胞依存的に発症するモデルである。

一方、今回の研究で解析したコラーゲン誘導性関節炎モデルは、細胞性免疫であるTh17細胞の活性化に加えて、液性免疫であるコラーゲン特異的抗体の産生も関節炎の発症に関与している。酪酸は、滑膜や所属リンパ節におけるTh17細胞を抑制する作用は認められなかったが、これは血清中の酪酸濃度が低いことから腸管外組織におけるTreg誘導作用は少ないためと思われる。酪酸は腸上皮の主要なエネルギー源であり、また肝臓においても代謝されるため、腸から全血への移行は少ない。酪酸は自己抗体の産生を抑制したが、これは腸管関連リンパ組織における応答を抑制したと想定されるが、現在、その詳細なメカニズムを検討中である。

以上の知見より、腸内細菌によって産生された酪酸は、腸管局所の炎症のみならず、全身性の自己免疫応答を抑制することが判明した。関節リウマチ患者では*P. copri*の増加以外に、酪酸産生菌が多く含まれるLachnospiraceaeの低下が認められる<sup>6</sup>。今後、関節リウマチの制御における酪酸の役割について更なる解析を行う予定である。

#### 5. 参考文献

1. Furusawa, Y. *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**, 446–450 (2013).
2. Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddle, L. B. & Coffman, R. L. Phenotypically distinct subsets of CD4<sup>+</sup> T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int. Immunol.* **5**, 1461–1471 (1993).
3. Brand, D. D., Latham, K. A. & Rosloniec, E. F. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc* **2**, 1269–1275 (2007).
4. Scher, J. U. *et al.* Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife* **2**, e01202 (2013).
5. Bernard, N. J. Rheumatoid arthritis: *Prevotella copri* associated with new-onset untreated RA. *Nat Rev Rheumatol* **10**, 2 (2014).
6. Maeda, Y. *et al.* Dysbiosis contributes to arthritis development via activation of autoreactive T cells in the intestine. *Arthritis Rheumatol* (2016).