

腸内細菌による自己免疫応答制御作用の解明 —超高齢化社会に向けた自己免疫疾患制御—

1. 研究の目的

(1) 研究背景

- ① 我が国では少子高齢化に伴い、65歳以上の高齢者人口が2025年には約30%、2050年には約40%にも達する超高齢化社会の到来が予想されている。この社会構造や生活習慣の変化により、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなど何らかの自己免疫疾患を有する患者の増大が予想されている。このうち、特に慢性関節リウマチは、現時点でも約70万人と国内患者数が多く、毎年1.5万人が新たに患者として認定されている。さらに、「手足の関節が痛む」という疾患予備群は560万人（人口の4.5%）におよび、国民病となりつつある。慢性関節リウマチは、リウマトイド因子をはじめとする自己抗体の産生を特徴とし、関節の滑膜に炎症が生じることで病態が進行する。その病因・病態は未だ十分に解明されたとはいえず、効果的な対症療法はあるものの、根治療法は確立されていないのが現状である。
- ② 近年、腸内細菌の異常が関節リウマチなど自己免疫疾患の発症に関わることが示唆されている。ヒトの大腸には100兆個以上もの腸内細菌が定着しており、消化液では分解できない食物繊維などを腸内発酵により分解し、生体にとって有用な短鎖脂肪酸に作り替える働きをしている。しかし、ひとたび腸内細菌叢のバランスに異常をきたすと、炎症性腸疾患や大腸癌などの消化器疾患に加えて、アレルギーや自己免疫性疾患、さらには精神性疾患や生活習慣病といった全身性の疾患が誘導されることが示唆されている。つまり腸内共生バランス失調は各種疾患の発症に関わる鍵因子であると想定されているが、その病態メカニズムは不明である。

(2) 研究目的

- ① 炎症性腸疾患、関節リウマチ、肝硬変、メタボリックシンドロームなど炎症反応を伴う疾患で共通して見られる異常の一つは、酪酸産生菌種の減少である。申請者はこれまでの成果として、関節リウマチ患者の便中において実際に酪酸産生量が低下しており、自己免疫性関節炎モデルにおいて、酪酸は関節炎の発症を顕著に抑制することを見出した。さらに、酪酸は、リンパ濾胞内に存在する濾胞制御性T (follicular regulatory T: Tfr) 細胞を誘導することで、自己抗体の産生を抑制していることを明らかにした。
- ② これら一連の研究成果は、『Tfr細胞を増加することで全身性の自己免疫応答を制御することができる』という新たな疾患制御法の同定につながるものであった。その実現に向け、2年目には、Tfr細胞の*in vitro*誘導条件を世界に先駆けて確立するとともに、Tfrレポーターマウスを用いてTfr細胞分化誘導活性のハイスループットスクリーニング系の構築を試みた。3年目以降は本スクリーニング系を用いて、Tfr誘導物質の探索を行うとともに、Tfr細胞の分化誘導メカニズムの解明を試みた。

2. 研究の計画

(1) Tfr 分化誘導活性スクリーニング系の感度の向上

- ① 2019年度に確立した培養条件を元に作出した*in vitro* Tfr細胞（以下iTfr細胞）が生体内のTfr細胞と同様の生理活性を示すかどうかについて機能解析を実施した。
- ② Tfr細胞の分子マーカーのレポーターマウスを導入し、検出方法も変えることで分化誘導活性スクリーニングの検出感度の向上を試みた。

(2) 腸内代謝物ライブラリーを用いたスクリーニングの実施

- ① 腸内代謝物候補を同定するために、無菌マウスに腸内細菌叢を定着させたコンベンショナル化マウスより糞便を経時的に回収し、腸内細菌依存的に増加する代謝物をCE-MS/MS法により一斉解析を実施した。これらの腸内代謝物に関して(1)－②に示した評価系を

用いて、Tfr分化誘導活性スクリーニングを行った。

- ② 既存薬を用いたドラックリポジショニングは安全性などの面で薬剤開発への障害が少ないことから、既存薬ライブラリーであるSCADs 標準阻害剤キットについて同様にTfr分化誘導活性スクリーニングを実施した。またTfr分化誘導メカニズムについても検討を行った。
- ③ iTfr誘導活性を有する化合物の薬効評価として関節リウマチモデルにおける予防および治療効果を調べた。

3. 研究の成果

(1) Tfr 分化誘導活性スクリーニング系の感度の向上

- ① *in vitro*で誘導したiTfr細胞は、生体内のTfr細胞と同等の自己免疫抑制機能を有することを立証するために、関節リウマチモデルを作出し、iTfr細胞を移植したところ、自己抗体の産生が有意に抑制され、関節炎の症状が緩和することを証明した。これらのデータを元に、学内の知財検討委員会の審査を経て特許を出願した（「濾胞性制御性T細胞の製造方法」特願2019-185826）。
- ② スクリーニング系の感度を高めるために、Bcl-6-tdTomatoレポーターマウス（東京理科大・原田陽介先生より供与）の脾臓よりナイーブT細胞をFACSソーティング後、iTfr分化誘導条件下で培養を行った。その際に、試験化合物を加えて5日間培養を行った後、蛍光蛋白質であるtdTomatoの発現を指標としてTfr細胞を定量した。評価系としての妥当性を評価するために、ポジティブコントロールである酪酸を添加したところ、Bcl-6陽性iTfr細胞の数が増加することを確認した。さらに当初計画していた検出器であるCell Insight CX5 (Thermo Fisher) は、操作性や検出感度が不十分であったことから、代わりにBZ-800Xオールインワン型蛍光顕微鏡 (Keyence, 研究室設備) を用いた。本顕微鏡に付属のイメージサイトメーターモジュール BZ-H4XIを用いてウェルを撮影後に、画像解析機能を利用することでtdTomato陽性細胞数の定量並びに発現量の解析を行うことで簡便かつハイスループットにBcl-6 (iTfr細胞マーカー) 陽性細胞をスクリーニングすることが可能となった。

(2) 腸内代謝物ライブラリーを用いたスクリーニングの実施

- ① 本解析により腸内細菌由来と予想されるアミン類、有機酸、インドール類など多数の代謝物を同定し、このうち、76種については標品を購入し代謝物ライブラリーとして整備した。本ライブラリーを用いて、iTfr細胞誘導活性を評価したところ、酪酸以外にもカダベリンやプトレシンといったポリアミン系代謝物に有意なiTfr誘導活性を見出している。しかしながら、カダベリンやプトレシンをマウスに投与しても、生体内においてTfr細胞の増加は観察されなかった。そこで、②合成化合物ライブラリーを用いたスクリーニングをさらに実施した。
- ② 既存薬ライブラリーであるSCADs標準阻害剤キットについてハイスループットスクリーニングを実施した。SCADs標準阻害剤キットは、文部科学省新学術領域研究・がんの特性等を踏まえた総合支援活動・化学療法基盤支援活動により配布されている既知の阻害剤を集めた化合物ライブラリーである。スクリーニングの結果から、16種類のiTfr細胞誘導活性を持つ化合物を同定した。これらの化合物は主に、①T細胞受容体シグナル伝達に関わる分子群の阻害剤、②エネルギー代謝に関わる分子群の阻害剤、③エピゲノム修飾酵素の阻害剤という3つのカテゴリーに分類された。このうち、①と②に関してはT細胞全般に広く作用しiTfr細胞への特異的な効果を期待できないことから、③に焦点を当てて研究を進めることとした。③には特にヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) 阻害剤であるScriptaidとその誘導耐であるVorinostatが含まれていた。HDACにはアイソザイムが11種類 (HDAC1~HDAC11) 存在するが、これらの化合物はクラスIに分類されるHDAC1, 2, 3, 8をいずれも阻害するため特異性は低い。そのため、副作用が強く、皮膚T細胞性リンパ腫の治療薬としてVorinostatが承認されているのみである。そこで、どのHDACアイソザイムを阻害することで、Tfr分化が促進するかを検討した。その結果、新たに合成したHDAC2の選択的阻害剤 (大阪大学産業科学研究所・

鈴木孝禎教授との共同研究)が最も強力なTfr分化誘導活性を示した。

- ③ 本HDAC2選択的阻害剤について薬物動態試験を行った結果、本薬剤は経口吸収性も良好であり、細胞毒性も低いことが判明した。続いて、コラーゲン誘導性関節リウマチモデル (collagen-induced arthritis: CIA) における薬効の検証を行った。実験期間中に本薬剤を経口投与 (3 mg/kg) したところ、関節炎の発症を有意に抑制した。さらに、これらの群では血清中の総IgG量の著明な減少を認めた。続いて、コラーゲン抗体誘導性関節リウマチモデル (collagen antibody-induced arthritis: CAIA) における薬効評価を行った。本モデルでは炎症の最終段階における薬剤の効果を検証することが可能であり、効果が認められた場合には治療薬として期待ができる。HDAC2選択的阻害剤を経口投与した群では、関節炎の発症が抑制された。さらに、関節炎に伴う血清中のTNF- α 濃度の減少も認めた。以上の結果より、本薬剤の関節炎に対する治療効果に関するPOCを得た。

4. 研究の反省・考察

(1) Tfr 分化誘導活性スクリーニング系の感度の向上

- ① これまで *in vitro* におけるTfr細胞の分化誘導系は確立されておらず、本研究によって、生体内のTfr細胞に匹敵する免疫抑制効果を有するiTfr細胞を効率的に誘導する系を初めて構築した。
- ② 当初計画していた野生型マウス由来T細胞を用いる場合には、Bcl-2の染色が必要となり、煩雑な作業が必要とされたが、レポーターマウス由来の細胞を用いる事でスループット性が大幅に改善した。また検出法を変えることでより精確な評価を行うことが可能となった。一方で、画像データの処理にはある程度の時間が必要とされるため、大量に得られたデータの処理方法については今後の課題と言える。

(2) 腸内代謝物ライブラリーを用いたスクリーニングの実施

- ① いくつかの腸内代謝物はiTfr誘導活性を示したものの、生体内では誘導活性が認められなかった。その理由として、各代謝物が分解しやすく、十分な血中濃度が得られない事が示唆された。
- ② Tfr分化誘導のための分子標的として新たにHDAC2を見出した。また従来HDAC2の選択的阻害剤の開発は難しいとされてきたが、幸い共同研究者である鈴木教授が新規に創出された薬剤を用いることができた。HDAC2の選択的阻害はTfr細胞を顕著に誘導することが判明した。
- ③ HDAC2選択的阻害剤はCIAおよびCAIAモデルにおいて関節炎を抑制した。CAIAモデルはコラーゲンに対する抗体を直接注射することで発症するため、HDAC2選択的阻害剤は抗体産生抑制以外の部分でも効果を発揮している可能性が示唆された。その薬効発現メカニズムについては現在検証中である。HDAC2阻害剤の毒性は従来の汎HDAC阻害剤と比較して低いことから、関節リウマチ治療薬としての期待が持てる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Kurashima Y, Hase K, Kiyono H. et al. Pancreatic glycoprotein 2 is a first line of defense for mucosal protection in intestinal inflammation. **Nat Commun.** 2021, 12:1067.
- ② Okawa T, Nagai M, Hase K. Dietary Intervention Impacts Immune Cell Functions and Dynamics by Inducing Metabolic Rewiring. **Front Immunol.** 2021, 11:623989.
- ③ Takahashi D, Hase K. et al. Microbiota-derived butyrate limits the autoimmune response by promoting the differentiation of follicular regulatory T cells. **EBioMedicine**, 2020, 58: 102913.
- ④ Nakamura A, Hase K. et al. Polyamines polarized Th2/Th9 cell-fate decision by regulating GATA3 expression. **Arch Biochem Biophys.** 2020, 693:108587.
- ⑤ Nakamura A, Hase K. et al., Symbiotic polyamine metabolism regulates epithelial proliferation and macrophage differentiation in the colon. **Nat Commun.** 2021,

12:2105.

- ⑥ Kinashi Y, Hase K. Partners in Leaky Gut syndrome: intestinal dysbiosis and autoimmunity. **Front Immunol.** 2021 Apr 22;12:673708.
- ⑦ Kurohara T, Tanaka K, Takahashi D, Ueda S, Yamashita Y, Takada Y, Takeshima H, Yu S, Itoh Y, Hase K., Suzuki T. Identification of novel histone deacetylase 6-selective inhibitors bearing 3,3,3-trifluorolactic amide (TFLAM) motif as a Zinc binding group. **Chembiochem.** 2021, 22:3158-3163.
- ⑧ Matsumoto R, Hase K. et al., A Retinoid X Receptor agonist directed to the large intestine ameliorates T-cell-mediated colitis in mice. **Front Pharmacol.** 2021, 12:715752.
- ⑨ Aoki R, Hase K. et al., Commensal microbe-derived acetate suppresses NAFLD/NASH development via hepatic FFAR2 signalling in mice. **Microbiome.** 2021, 9:188.
- ⑩ Oya Y, Hase K. et al., Characterization of M Cells in Tear Duct-Associated Lymphoid Tissue of Mice: A Potential Role in Immunosurveillance on the Ocular Surface. **Front Immunol.** 2021, 12:779709.
- ⑪ Li Y, Hase K., Wang JY. et al., Glia maturation factor- γ is involved in S1P-induced marginal zone B-cell chemotaxis and optimal IgM production to type II T-independent antigen. **Int Immunol.** 2022, 34:35-43.

(2) 口頭発表

- ① Koji Hase, Immune surveillance on the mucosal surface: Physiological impact and beyond. Edinburgh Immunology Group Webinar. 2021/3/25, 国外 (ウェビナー), 口頭
- ② Koji Hase, Immune surveillance on the mucosal surface: Physiological impact and beyond. Fudan University Department of Immunology Seminar. 2020/11/27, 国外 (ウェビナー), 口頭
- ③ Koji Hase, Nutritional Signals regulate lymphocyte homing to gut-associated lymphoid tissue. The Korean Association of Immunologists (KAI) International Meeting 2020 Virtual. 2020/11/11-13, 国外 (ウェビナー), 口頭
- ④ Koji Hase, Gut microbiota and diet shape the gut immune system. The 7th Cancer Epigenomics Symposium & Seminar on Hematologic Malignancies and Epigenetics. 2020/11/13, 国内, 口頭
- ⑤ 長谷耕二, 腸内微生物による免疫修飾機構. 第23回日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会, 2020/9/12, 国内, 口頭
- ⑥ 長谷耕二. 腸内代謝物による免疫制御. 第95回日本感染症学会 2021年5月7~9日. オンライン開催. 口頭
- ⑦ Koji Hase, Symbiotic polyamine metabolism maintains gut immune homeostasis by regulating macrophage differentiation. The 27th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (MMCB2020+1). 2021. 6. 16. Osaka. 口頭
- ⑧ Koji Hase, Maternal microbiota during pregnancy facilitates metabolic programming of offspring. International DOHaD Society Webinars for 2021. 2021/ 7/7. オンライン開催. 口頭
- ⑨ 長谷耕二. 腸管免疫系における絶食応答. 第94回日本生化学会. 2021年11月3日. オンライン開催. 口頭
- ⑩ Koji Hase, Maternal gut microbiota in pregnancy influences metabolism. 53rd Annual Meeting of the French Society for Immunology. 2021/12/8. オンライン開催. 口頭

(3) 出版物

なし