

## 第 43 回総会ポスター受賞記念論文

総 説 (推薦論文)

推薦者: 第 43 回総会長 佐野 統

## 関節リウマチ患者における腸内細菌叢の異常

前田 悠一<sup>\*1,2,3</sup>, 熊ノ郷 淳<sup>\*1</sup>, 竹田 潔<sup>\*2,3</sup>

## Altered composition of gut microbiota in rheumatoid arthritis patients

Yuichi MAEDA<sup>\*1,2,3</sup>, Atsushi KUMANOGH<sup>\*1</sup> and Kiyoshi TAKEDA<sup>\*2,3</sup><sup>\*1</sup>Department of Respiratory Medicine, Allergy and Rheumatic Diseases, Graduate School of Medicine, Osaka University<sup>\*2</sup>Laboratory of Immune Regulation, Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Medicine, Osaka University<sup>\*3</sup>Department of Mucosal Immunology, WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University

(Accepted December 18, 2015)

## summary

Manifestation of rheumatoid arthritis (RA) can be attributed to both genetic and environmental factors. Some researchers have been focusing on intestinal microbiota which is thought to be one of the environmental factors that may enhance the development of RA. The advancement of culture-independent, high throughput microbial DNA sequencing had enabled us to understand the interplay between intestinal microbiota and host immune systems. In this study, we have reviewed the previous findings in animal and human studies with respect to the role of intestinal microbiota in RA. Mouse models of arthritis have demonstrated that gut microbiota plays a critical role in the disease development. K/BxN and IL-1 receptor-antagonist knock-out mice did not develop disease in germ free condition, however, colonization of particular intestinal bacteria was sufficient to induce arthritis. Moreover, the dysbiosis was observed in the human RA patients from United States, China and Finland. Thus, we believe that endeavors to improve the dysbiosis would serve as a novel therapeutic or preventive strategy in RA patients.

**Key words**——microbiota; rheumatoid arthritis; animal models of arthritis; dysbiosis

## 抄 録

関節リウマチに代表される自己免疫疾患の発症には遺伝的要因、環境要因の関与が示唆される。環境要因の一つとして、腸内細菌叢の変化について研究が進められている。腸内細菌が注目されている理由の一つに解析方法の進歩が挙げられる。16S rRNA を標的とした次世代シーケンス法により、難培養細菌の DNA 配列レベルでの菌種同定が可能になった。本論文では、腸内細菌叢とマウス及びヒト関節炎との関連について紹介する。腸内細菌叢は、関節炎モデルマウスにおいて重要な役割を示す事が明らかにされている。K/BxN マウス、IL-1 受容体アンタゴニスト欠損マウスのような関節炎モデルマウスは腸内細菌叢がないと関節炎を発症しないが、特定の腸内細菌の定着により関節炎を発症する。また、ヒト関節リウマチ患者においても腸内細菌叢の異常がフィンランド、アメリカ合衆国、中国において認められた。腸内細菌叢の異常と宿主の免疫異常の関係を明らかにすれば、腸内細菌叢を対象にした新たな治療あるいは発症を予防する戦略が期待される。

## 1. はじめに

関節リウマチの発症には、遺伝的要因と環境因子の両方の因子が必要と考えられる。遺伝的要因は、一卵性双生児を対象とした研究から、一方が関節リウマチを発症した場合、もう一方が発症する頻度は 12-

15%とされている<sup>1)</sup>。その遺伝因子の関与率を考えると、環境要因がいかに重要であるかが推測される。環境要因の中では、喫煙、細菌やウイルスなどの感染症、性ホルモンとの関与が示唆されている。著者らは、近年様々な疾患との関与が示唆されている腸内細菌叢の変化に着目し、関節リウマチの発症や病態との関連性について研究を続けている。ミノサイクリンやサラゾスルファピリジンといった抗菌作用を持つ薬が抗リウマチ薬として使用されている事からも、関節リウマチ発症の一つの要因として腸内

<sup>\*1</sup> 大阪大学大学院医学系研究科呼吸器・免疫アレルギー内科学

<sup>\*2</sup> 大阪大学大学院医学系研究科免疫制御学

<sup>\*3</sup> 大阪大学免疫学フロンティア研究センター粘膜免疫学

細菌を含む微生物の関与が示唆される<sup>2)</sup>。また、歯周病を引き起こす口腔内細菌である *Porphyromonas gingivalis* が蛋白質をシトルリン化する酵素を有している事より、関節リウマチ発症との関連が示唆されている<sup>3)</sup>。本論文では、腸内細菌叢の解析方法とその進歩についてまず説明し、関節炎モデルマウスと腸内細菌叢との関連、ヒト関節リウマチにおける腸内細菌叢の変化について解説する。

## 2. 腸内細菌叢の解析方法

ヒトは、多種類の細菌と共存、共生している。ヒトの全ての臓器の中で最も多くの細菌が共生しているのは腸管であり、その数は 500–1000 種、 $10^{13}$  以上であり、宿主の細胞数の約 10 倍とされている<sup>4)</sup>。腸内に生息する菌の大部分が厳密な嫌気環境が必要な難培養細菌であり、これまで、培養を中心とした解析法のみでは実態の把握が不十分であった。しかし、近年、対象菌種の 16S rRNA 遺伝子にアプローチすることにより培養を介さずに解析することが可能となった。16S rRNA とは、リボソーム小サブユニットを構成する 1.5kb の長さの RNA で、全ての細菌に保存された遺伝子配列部位と菌種固有の配列 (V1~V9) とが混在している。この保存された領域を挟むユニバーサルプライマー (27F と 1492R) を使用し、この領域の遺伝子を増幅し、その塩基配列の解析が容易である事などにより微生物の系統解析に利用されている<sup>5)</sup>。16S rRNA を標的とした、次世代シーケンサーは、細菌の遺伝子配列を非特異的に解読し、細菌種の構成 (比率) を解析する方法である (表 1)。1 サンプルあたり 1000 本を超えるシーケンスを一度に行う事ができる。DNA 配列レベルでの菌種同定を行うので、実験誤差に影響される事なく信頼性の高いデータを得る事ができる。

腸内細菌叢を解析する手法は、次世代シーケンサー以外にも用途によって考慮される。ここでは、定量的 PCR 法、FISH (fluorescence *in situ* hybridiza-

tion) 法に関して、それぞれの原理と特徴を紹介する (表 1)。定量的 PCR 法は、種々の細菌を標的とした特異的プライマーを用いて、糞便から抽出した全細菌 DNA を鋳型に PCR を行い、サイクルごとのアンプリコン量をリアルタイムでモニタリングし、サンプル中の標的細菌種の DNA を定量するという手法である。PCR 法の長所は、条件の最適化を行えば、他の方法と比較して信頼度の高い定量性が得られる点である。短所は、対象の細菌ごとにプライマーの選択や条件設定、検量線の作成などの作業を行わなくてはならない点である。一度、最適化を行えば、繰り返し同じ条件で実験でき、調査したい細菌が限定されている場合に特に有用な手法である。FISH 法は細胞を破壊する事なく、細菌の形態を保持したまま核酸を菌種特異的なオリゴヌクレオチドプローブで蛍光標識し、標的細胞の数を顕微鏡で測定する方法である。他の方法と異なるのは、DNA の定量ではなく菌数情報が直接得られ、同時に菌の形状の情報を得る事ができるといった点である。

これらの解析方法を研究目的に応じて使い分け、あるいは併用する事によって腸内細菌叢の解析を効率よく行うことができると考えられる。

## 3. 関節炎モデルマウスと腸内細菌叢

本題である、腸内細菌叢と関節炎との関連について概説する。まずは、関節炎モデルマウスと腸内細菌叢との関わりについて紹介する (表 2)。腸内細菌のない無菌の環境でマウスを飼育すると関節炎を発症しないが、特定の腸内細菌を定着させると関節炎を発症するといった報告がいくつか認められる。

Wu 等は、抗 GPI (グルコース 6 リン酸イソメラーゼ) 抗体の産生を伴う自己反応性の T 細胞の異常により関節炎を発症させる関節炎モデルマウス (K/BxN) を用いて、腸内細菌と関節炎との関連について報告した<sup>6)</sup>。このマウスを、無菌環境で飼育すると、小腸粘膜固有層や脾臓の Th17 細胞の数は減少

表 1 腸内細菌叢の解析手法

	次世代シーケンサー	定量的 PCR 法	FISH 法
原理	細菌の遺伝子配列を非特異的に解読し、細菌種の構成 (比率) を解析	標的菌に特異的なプライマーを用いた定量的 PCR により、細菌種を定量	細菌をオリゴヌクレオチドプローブで蛍光標識し、標的細胞の数を顕微鏡で測定
主な利点	・ DNA 配列レベルの情報 ・ 新規菌種の検索	・ 検出感度が高い ・ 信頼性の高い定量性	・ 視的観察可 ・ 形態観察可
主な欠点	・ 優勢菌以外の検出感度が低い	・ 未分離菌の解析が困難	・ 検出感度が低い

表2 関節炎モデルマウスと腸内細菌叢

マウスの系統	環境の違いによる発症の有無	発症機序	発症に関与している菌投与経路	文献
K/BxN	無菌：発症しない SPF：発症	抗 GPI 抗体の産生 小腸での Th17 細胞の増加	SFB の経口投与	6
IL-1ra <sup>+</sup>	無菌：発症しない 通常飼育：発症	TLR2 と TLR4 の関与 Th17 細胞の増加 制御性 T 細胞の低下	<i>Lactobacillus Bifidus</i> の 経口投与	8
SKG	無菌, SPF：発症しない 通常飼育：発症	胸腺での T 細胞の選択の異常 自然免疫の活性化	$\beta$ グルカンの皮下注射	9, 11

し、関節炎の発症は抑止された。一方、セグメント細菌<sup>7)</sup> (segmented filamentous bacteria: SFB) という腸内細菌を単独定着させる事により Th17 細胞の分化を促進し、関節炎を発症した。このマウスを特定の微生物や寄生虫が存在しない (specific pathogen free: SPF) 環境で飼育すると関節炎を自然発症するが、IL (インターロイキン)-17 抗体を投与すると、抗 GPI 抗体の産生低下と関節炎の発症抑止が認められた。

また、Abdollahi-Roodsaz 等は、T 細胞依存性に関節炎を自然発症する IL-1 受容体アンタゴニスト欠損マウスを用いて実験した<sup>8)</sup>。このマウスを、無菌飼育下で飼育すると関節炎を発症しないが、*Lactobacillus bifidus* という細菌を単独定着させる事により通常飼育下と同様に関節炎を発症した。このモデルにおいて、TLR2 と TLR4 が自己免疫性の関節炎の発症に関与し、T 細胞活性化やサイトカインの産生の制御に重要な役割をしている事を示した。

T 細胞のシグナル伝達分子 ZAP-70 に一塩基置換を持つ関節炎モデルマウスである SKG マウスも、環境因子が発症に関わる事が知られている<sup>9)</sup>。このマウスは、胸腺での負の選択に異常を来し、自己反応性の T 細胞の産生により、ヒト関節リウマチに似た関節炎を発症する。関節炎だけでなく、皮膚炎や間質性肺炎を呈し、血清中にはリウマチ因子も検出される。このマウスをコンベンショナルな環境で飼育すると関節炎を自然発症するが、SPF 環境で飼育すると発症しない事が報告されている。また、このマウスは、SPF 環境で真菌の細胞壁成分である  $\beta$ -グルカンを経口注射すると自然免疫の活性化を介して関節炎を発症するが、無菌の環境では  $\beta$ -グルカンの注射にても発症しない事が報告された<sup>10, 11)</sup>。

このように、上記の関節炎モデルマウスは、腸内細菌の存在が関節炎発症の必要条件であり、一部の特定の腸内細菌の定着によって関節炎が再現できる

事が示されているが、ヒト関節リウマチにおいて、腸内細菌叢と関節炎の関わりについては未だ不明な点が多い。

#### 4. ヒト関節リウマチと腸内細菌叢

これまでに報告された、ヒト関節リウマチ患者における腸内細菌叢の異常に関して紹介する (表 3)。2008 年にフィンランドの Vaahtovuori らは、16S rRNA 特異的プローブの hybridization による DNA staining 法を用いた flow cytometry によって、発症 6 ヶ月以内の抗リウマチ薬を使用していない早期関節リウマチ患者 51 名と線維筋痛症患者 50 名の腸内細菌叢を比較検討した<sup>12)</sup>。関節リウマチ患者では、線維筋痛症患者と比較して、8 種類の菌種特異的プローブによる検討により、*Bifidobacteria*, *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella* group, *Eubacterium rectale-Clostridium coccoides* group, *Bacteroides fragilis* subgroup の菌数が有意に少ない事が示された。この結果は、クローン病患者の腸内細菌叢においても同様に *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella* group が減少しているとの報告<sup>13)</sup> と同じ傾向であった。

2013 年には、米国の Scher 等が発症 6 ヶ月未満の未治療の関節リウマチ患者 44 名と治療後の関節リウマチ患者 26 名、乾癬性関節炎患者 16 名、健常者 28 名の腸内細菌叢を 16S rRNA を標的とした次世代シーケンサーの手法を用いて比較検討した<sup>14)</sup>。発症早期の関節リウマチ患者において、健常者を含めた他の疾患群と比較して *Prevotella* 属 (特に *Prevotella copri*) が増加している事を示した。早期関節リウマチ患者と他の疾患群の背景因子を比較すると、早期関節リウマチ患者において CRP (C-reactive protein) が高値であった事から、因果関係は不明だが、炎症の増悪するような環境で *P. copri* が増えやすいのではないかと Scher 等は考察している。さらに、*P. copri* を抗生剤処理後のマウスに投



表3 関節リウマチ患者の腸内細菌叢

国籍	増加している菌	減少している菌	解析方法	文献
フィンランド	特記なし	<i>Eubacterium rectale</i> - <i>Clostridium</i> <i>coccoides</i> group <i>Bacteroides fragilis</i> subgroup など	16S rRNA hybridization, DNA staining	12
アメリカ合衆国	<i>Prevotella</i> ( <i>Prevotella copri</i> )	<i>Bacteroides</i>	次世代シーケンサー	14
中国	<i>Clostridium asparagiforme</i> <i>Lachnospiraceae</i> bacterium <i>Lactobacillus salivarius</i> など	<i>Veillonella</i> , <i>Haemophilus</i> など	Metagenomic shotgun sequence 法	15

与した上で薬剤性の腸炎を起こすと、その菌を投与していないマウスと比べて腸炎の感受性が悪化する事を示した。また、関節リウマチ発症の遺伝的要因の一つとして HLA-DRB1 の shared epitope (SE) が知られているが、この SE を有していない関節リウマチ患者に *P. copri* が多い事を示した。この SE を有していない患者が関節リウマチを発症するのに、腸内で *P. copri* が一定以上に増加する事が必要なのではないかと Scher 等は推測している。また、*P. copri* が優勢であった発症早期のリウマチ患者の糞便のメタゲノムの解析において、葉酸の代謝に関わる遺伝子の欠乏が認められた。*P. copri* が腸内で増加している患者において、葉酸拮抗作用のあるメトトレキサート（関節リウマチの治療薬）に対する反応性との関連について今後の研究が必要と考えられる。また、*P. copri* を含む腸内細菌が産生する代謝産物に関する研究も今後の課題である。

2015 年には中国の Zhang 等が、メタゲノムショットガンシーケンス法を用いて、関節リウマチ患者の腸内細菌叢、口腔内細菌叢について調査した<sup>15)</sup>。腸内細菌叢については、77 名の未治療の関節リウマチ患者、80 名の健常者を評価した。関節リウマチ患者において増加している腸内細菌は、*Clostridium asparagiforme*, *Gordonibacter pamelaeeae*, *Eggerthella lenta*, *Lachnospiraceae* bacterium などであった。腸内細菌全体として、グラム陽性菌の割合の増加とグラム陰性菌の割合の低下が見られた。Zhang 等はさらに、関節リウマチ患者の腸内細菌叢と歯、唾液の細菌叢との関連を調べた。*Haemophilus* 属が関節リウマチ患者のいずれの部位でも低下しており、自己抗体の産生と負の相関を示した。また、*Lactobacillus salivarius* が活動性の高いリウマチ患者において、腸内、歯、唾液のいずれの部位でも増加していた。抗リウマチ薬による関節リウマチの治療 3 ヶ月後に、口腔内と腸内の細菌叢を再評価すると、部分的に改

善している事を示した。

腸内細菌叢を評価した研究ではないが、2015 年にスウェーデンの Sandberg 等は、感染症の既往と関節リウマチの発症との関連について報告をした<sup>16)</sup>。彼らは、関節リウマチを発症した患者 (2831 名) と健常者 (3570 名) に対して、過去 2 年間に罹患した感染症（胃腸炎、尿路感染症、性器感染症、前立腺炎、副鼻腔炎、扁桃腺炎、肺炎）について調査した。その結果、関節リウマチの発症リスクを有意に低下させたのが胃腸炎（オッズ比：0.72）と尿路感染症（オッズ比：0.79）であった。副鼻腔炎、扁桃腺炎、呼吸器感染症に関しては、関節リウマチの発症への影響は無かった。胃腸炎に罹患する事による腸内細菌叢の変化が関節リウマチの発症の感受性に関わった可能性が考えられる。また、胃腸炎に罹患した際の抗菌薬の使用の影響も考慮しなければならない。Sandberg 等は、さらに、ACPA（抗シトルリン化ペプチド抗体）陽性の患者と陰性の患者に分けて、感染症の罹患と関節リウマチ発症の頻度を比較した。その結果、副鼻腔炎の罹患によって、ACPA 陽性の患者で関節リウマチの発症頻度が低下する事が示唆された。しかし、胃腸炎を含む他の感染症の罹患と、関節リウマチの発症頻度は ACPA 陽性患者と ACPA 陰性患者の比較において差はなかった。この研究結果より、消化管内の微生物叢の変化によって、関節リウマチの発症頻度を低下させる可能性がある事が示唆された。

このように、ヒト関節リウマチと腸内細菌叢の変化に関してもいくつかの報告が認められるが、腸内細菌叢は生活環境や遺伝的背景によっても異なる事が推測されるため、結果は様々である。共通している点は、関節リウマチ患者は健常者と比較して異なる腸内細菌叢を持つようになる事である。腸内細菌叢の異常が起こるタイミング（発症の何年も前に変化するのか、関節炎の初期に変化するのか）につい

ても今後の研究が必要である。また、病気が再燃する機序についても理解されていないので、再燃前後に腸内細菌叢がどうなっているのかについても検討が必要である。このような腸内細菌叢の異常が関節リウマチの発症や病態形成にどのように関わるのかを理解するためには、ヒト関節リウマチ患者における長期的な病勢・腸内細菌叢の経過観察とともに、特定の腸内細菌叢を無菌マウスに移入するモデルなどを用いて、さらなる検討が必要と考えられる。

## 5. おわりに

解析方法の進歩により、腸内細菌叢の構成や機能について、腸内細菌叢とヒトの健康・疾患との関連についての理解が深まった。近年、腸管以外にも口腔内細菌や皮膚の常在菌と宿主の免疫異常との関連についても様々な知見が蓄積されつつある。共生細菌叢に関するエビデンスを蓄積していくためには、多施設で協力し検体を収集し情報交換をしていく必要がある。そして、共生細菌叢の異常と病態との関与についてのメカニズムを明らかにし、共生細菌叢の異常を制御する方法を見出せば、関節リウマチを含む自己免疫疾患の発症を抑止する事も夢ではない時代が来ると考えられる。

## 文 献

- 1) Reveille, J.D.: Genetic studies in the rheumatic diseases: present status and implications for the future. *J Rheumatol. Suppl.* **72**: 10–13, 2005.
- 2) Stone, M., et al.: Should tetracycline treatment be used more extensively for rheumatoid arthritis? Metaanalysis demonstrates clinical benefit with reduction in disease activity. *J Rheumatol.* **30**: 2112–2122, 2003.
- 3) Wegner, N., et al.: Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **62**: 2662–2672, 2010.
- 4) 後藤義幸, 他: 共生微生物との相互作用. 清野 宏・編. 臨床粘膜免疫学 第1版; 2010. pp.304–315.
- 5) 中山二郎: フローラ解析—分子生物学的方法. 古賀泰裕・編. 医科プロバイオティクス学 第1版; 2009. pp.56–77.
- 6) Wu, H.J., et al.: Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity.* **32**: 815–827, 2010.
- 7) Ivanov, I.I., et al.: Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell.* **139**: 485–498, 2009.
- 8) Abdollahi-Roodsaz, S., et al.: Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J Clin Invest.* **118**: 205–216, 2008.
- 9) Sakaguchi, N., et al.: Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature.* **426**: 454–460, 2003.
- 10) Rehaume, L.M., et al.: ZAP-70 genotype disrupts the relationship between microbiota and host, leading to spondyloarthritis and ileitis in SKG mice. *Arthritis Rheumatol.* **66**: 2780–2792, 2014.
- 11) Yoshitomi, H., et al.: A role for fungal {beta}-glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *J Exp Med.* **201**: 949–960, 2005.
- 12) Vaahтовuo, J., et al.: Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* **35**: 1500–1505, 2008.
- 13) Seksik, P., et al.: Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut.* **52**: 237–242, 2003.
- 14) Scher, J.U., et al.: Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife.* **2**: e01202, 2013.
- 15) Zhang, X., et al.: The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat Med.* **21**: 895–905, 2015.
- 16) Sandberg, M.E., et al.: Recent infections are associated with decreased risk of rheumatoid arthritis: a population-based case-control study. *Ann Rheum Dis.* **74**: 904–907, 2015.