

腸内細菌叢による中枢神経系の制御

群馬大学生体調節研究所粘膜エコシステム制御分野

宮内 栄治

【緒言】

多発性硬化症（Multiple Sclerosis: MS）は遺伝的要因が大きく寄与する中枢神経系の自己免疫疾患であるが、腸内細菌をはじめとする種々の環境的要因が発症や重篤化に多大な影響を与えることが明らかになってきた。我々はこれまでに、ある種の腸内細菌が自己応答性T細胞を活性化し中枢神経系における炎症を促進することを、MSモデルマウス（実験的自己応答性脳脊髄炎, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE）を用いて明らかにしてきた（1, 2）。MS患者においても、*Akkermansia*の増加や短鎖脂肪酸産生菌の減少など、健常人とは異なる腸内環境を有していることが報告されている（3, 4）。しかし、これらの腸内環境の変動が中枢神経系に影響するのか、また、その作用機序についても不明な点が多く残されている。

そこで本研究では、*Akkermansia*や短鎖脂肪酸の増減といったMS患者の腸内環境をマウスで再現し、EAE病態への影響を検討するとともに、腸内環境と中枢神経系との関係について詳細を明らかにすることを目的とした。

【方法】

MS患者腸内環境再現マウス

Desaiらの報告（5）に従い無菌C57BL/6マウスにヒト由来腸内細菌14菌株（*Akkermansia muciniphila*, *Escherichia coli* HS, *Collinsella aerofaciens*, *Clostridium symbiosum*, *Marvinbryantia formatexigens*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Roseburia intestinalis*, *Barnesiella intestinihominis*, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides ovatus*, *Desulfovibrio piger*）を定着させ、ミニマムなヒト腸内細菌叢を有するマウスを作製した。これらのマウスに食物繊維を抜いた無繊維餌を与えることでMS患者の腸内環境を再現した。また、ミエリンペプチド（Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: MOG）を接種するとともに百日咳毒素を投与することで、EAEを発症誘導した。

腸内細菌・代謝産物プロファイル

マウスの腸管内容物から細菌由来DNAを抽出し、16S rRNA V4領域をPCRで増幅した。PCR産物の配列をMiSeqで解読し、常法で腸内細菌叢の解析を行った。また、同腸管内容物の水溶性低分子化合物および短鎖脂肪酸をメタノール抽出し、GC-MS/MSにて代謝産物プロファイルを取得した。

【結果】

MS患者腸内環境再現マウスのEAE感受性

ヒト腸内細菌14菌株を無菌マウスに定着させたのち、高繊維餌または無繊維餌をそれぞれ与え、腸内環境を変動させた。これらのマウスの腸内細菌叢を解析した結果、無繊維餌を与えたマウスの小腸、盲腸、および大腸において*Akkermansia*が有意に減少していた。また、盲腸内容物の短鎖脂肪酸濃度を測定した結果、無繊維餌の投与により酢酸やプロピオン酸、酪酸といった腸内の主要な短鎖脂肪酸が有意に減少していた。以上の結果から、14菌株定着マウスに無繊維餌を与えることで、*Akkermansia*の減少や短鎖脂肪酸の減少といったMS患者の腸内環境の特徴を再現できることが明らかになった。

次に、これらのマウスにEAEを発症誘導し、四肢の麻痺といった症状を観察した。その結果、無繊維餌を投与したマウスは高繊維餌投与マウスに比べより重篤なEAE症状を呈した。また、無繊維餌投与マウスではMOG特異的なT細胞応答やCD4/CD8 T細胞の脊髄への浸潤が亢進していた。以上の結果から、MS患者腸内環境をマウスで再現することでEAE感受性が高まることが明らかになった。

AkkermansiaのEAE感受性への影響

先に述べたように、MS患者およびMS患者腸内環境再現マウスの特徴として*Akkermansia*の増加があげられる。*Akkermansia*のEAE感受性への影響を検討するため、先程の14菌株から*Akkermansia*を除去した13菌株を定着させたマウスを作製した。これらのマウスに無繊維餌を与えた後にEAEを発症誘導した。その結果、13菌株定着マウスと14菌株定着マウスは同程度のEAE症状を発症し、*Akkermansia*除去の病態への影響は認められなかった。これらのマウスのMOG特異的なT細胞応答についても差は認められなかった。また、脊髄に浸潤したCD4 T細胞数は13菌株定着マウスで増加していたが、EAE症状との関連は見られなかった。以上の結果から、*Akkermansia*はEAE感受性には影響しないと結論づけられた。

短鎖脂肪酸のEAE感受性への影響

MS患者およびMS患者腸内環境再現マウスのもう一つの特徴として、短鎖脂肪酸の減少があげられる。14菌株定着マウスにおける各菌の相対量と短鎖脂肪酸濃度との相関解析を行った結果、*Bacteroides thetaiotaomicron*と*Bacteroides ovatus*が酢酸、プロピオン酸、および酪酸と有意に正の相関を示すことが明らかになった。また、*Clostridium symbiosum*は酢酸と酪酸、*Marvinbryantia formatexigens*は酢酸と有意に正の相関を示した。以上の結果から、14菌株定着マウスにおいてはこれら4菌株が短鎖脂肪酸の産生に寄与していると示唆された。そこで、14菌株からこれら4菌株を除去した10菌株定着マウスを作製し、高繊維餌を与えた後にEAEを発症誘導した。その結果、4菌株除去によるEAE感受性の変化は認められなかった。次に、これらのマウスの小腸および大腸内容物を回収し、短鎖脂肪酸濃度を測定した。その結果、10菌株定着マウスの小腸における酢酸、プロピオン酸、および酪酸濃度は14菌株定着マウスと同等であった。大腸においては10菌株定着マウスでプロピオン酸濃度の低下が認められたものの、酢酸と酪酸は14菌株定着マウスと差が見られなかった。以上のように、短鎖脂肪酸増加への寄与が示唆された4菌株を除去しても、腸管内短鎖脂肪酸濃度を制御することは困難であると考えられた。

そこで、短鎖脂肪酸付加セルロースを用いて腸管内短鎖脂肪酸濃度の制御を試みた(6)。コントロールとしてセルロース餌を与えたマウスでは、大腸における酢酸、プロピオン酸、および酪酸濃度が顕著に減少した。一方、酢酸付加セルロース餌、プロピオン酸付加セルロース餌、または酪酸付加セルロース餌を与えたマウスでは、それぞれ付加した短鎖脂肪酸の大腸内濃度が有意に増加することを確認した。これら大腸内短鎖脂肪酸濃度の異なるマウスにEAEを発症誘導したところ、各短鎖脂肪酸濃度の増加によるEAE症状緩和は認められなかった。酪酸やプロピオン酸は腸管の制御性T細胞を増加させることが知られている(7,8)。そこで、これらのマウスの腸管、脾臓、および脊髄におけるT細胞プロファイルをフ

ローサイトメトリーで解析した。その結果、酪酸付加セルロース餌またはプロピオン酸付加セルロース餌による腸管制御性T細胞の増加は認められず、脾臓と脊髄においても制御性T細胞数に変化は見られなかった。以上の結果から、腸管内短鎖脂肪酸濃度の減少はEAE感受性亢進には寄与していないことが示唆された。

MS患者腸内環境再現マウスの代謝産物プロファイル

これまでMS患者の腸内環境の特徴として強調されてきた*Akkermansia*の増加や短鎖脂肪酸の減少は、EAE感受性には影響しないと結論付けられ、他の因子の寄与が示唆された。そこで、高繊維餌および無繊維餌投与マウスの大腸内容物のメタノール抽出液を調製し、MOG特異的T細胞応答の評価系に添加した。その結果、無繊維餌投与マウスの大腸内容物抽出液の添加により、MOG特異的T細胞応答が亢進することが明らかになった。以上の結果から、無繊維餌投与により増加した代謝産物が自己免疫応答を活性化することでEAE感受性を亢進している可能性が考えられた。

そこで、患者腸内環境再現マウス（無繊維餌投与14菌株定着マウス）の腸内代謝産物の網羅的解析を実施した。その結果、無繊維餌投与マウスでは高繊維餌投与マウスに比べ、小腸で45、大腸で57の低分子化合物が増加していることが明らかになった。また、代謝産物の変動は血清でも見られ、無繊維餌投与マウスの血清では13の化合物が増加していた。次に、無繊維餌投与マウスの小腸、大腸、および血清のいずれのサンプルでも増加していた化合物に絞り、EAE感受性への影響を検討した。その結果、無繊維餌投与マウスで増加していた代謝産物XがEAE感受性を亢進することが示された。代謝産物Xを飲水投与したマウスにEAEを発症誘導した場合、コントロールに比べより重篤なEAE症状を呈し、MOG特異的T細胞応答が亢進していた。最後に、代謝産物Xの作用機序を*in vitro*で検証した。EAEを発症誘導したマウスから調製した脾細胞を代謝産物X存在下でMOGペプチドで刺激し、上清中のIL-17A濃度をELISAで測定した。その結果、代謝産物XはMOG特異的なIL-17A産生を促進することが示された。以上のように、代謝産物Xは免疫細胞に直接作用することで自己免疫応答を活性化し、EAE感受性を亢進させることが示唆された。

【今後の課題】

本研究の結果から、MS患者の腸内環境を再現したマウスでは中枢神経系炎症が増悪することが示された。しかし、これまで強調されてきた*Akkermansia*の増加や短鎖脂肪酸の減少はこれに関与しておらず、新たに代謝産物Xの寄与が示唆された。代謝産物Xは自己免疫疾患患者で増加していることが報告されているが、宿主への影響についてはほとんど研究が行われていない。本研究で代謝産物Xが免疫細胞に直接作用し、抗原特異的T細胞応答を活性化することを見出した。今後、より詳細な代謝産物Xの作用機序の解明が求められる。また、MS患者腸内環境再現マウスで代謝産物Xが増加した機序も不明である。代謝産物X産生に寄与する菌を明らかにすることで、腸内細菌をターゲットとしたMSの予防・治療法の確立に繋がると期待できる。

【参考文献】

1. Miyauchi E, Kim SW, Suda W, et al. Gut microorganisms act together to exacerbate inflammation in spinal cords. *Nature*. 2020;585(7823):102-106.
2. Miyauchi E, Shimokawa C, Steimle A, Desai MS, Ohno H. The impact of the gut microbiome on extra-intestinal autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2023;23(1):9-23.
3. Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients

enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(40):10719–10724.

4. Takewaki D, Suda W, Sato W, et al. Alterations of the gut ecological and functional microenvironment in different stages of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(36):22402–22412.
5. Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, et al. A Dietary Fiber–Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* 2016;167(5):1339–1353. e21.
6. Takeuchi T, Miyauchi E, Kanaya T, et al. Acetate differentially regulates IgA reactivity to commensal bacteria. *Nature*. 2021;595(7868):560–564.