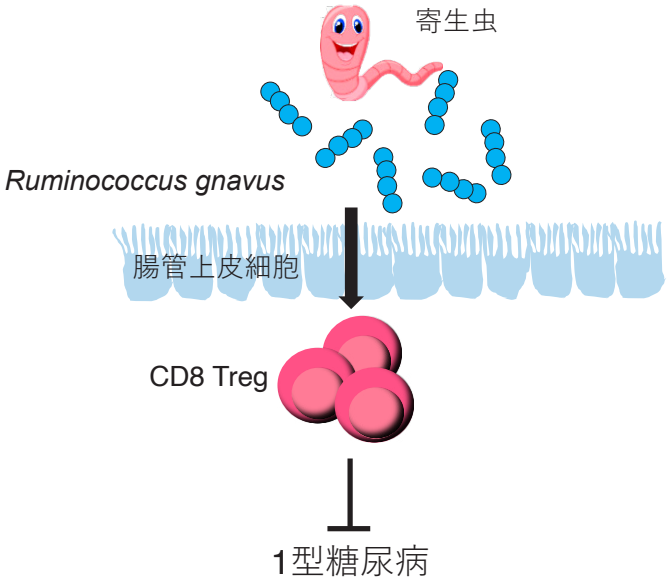
139　1型糖尿病制御に向けた新たな治療法の開発	下川　周子

【目的】腸管寄生蠕虫は、宿主内での防御機構を回避し、長期間生存するために宿主の免疫を変調させる術を備えてきた。この特性は、過剰な免疫応答を抑制することで宿主にも恩恵を与えてきたとされる。近年、先進国においては衛生環境の向上により腸管寄生蠕虫の感染率は激減し、相反するようにアレルギー、自己免疫疾患などの炎症性疾患が増加してきた。これは衛生仮説と呼ばれ、炎症性疾患が増加した原因を感染症への暴露が減少したためだとする説は、疫学的にも証明されている。我々も、衛生仮説を科学的に証明するかのように寄生虫感染マウスでは1型糖尿病の発症を抑制すること、そのメカニズムとして寄生虫感染で誘導される CD8 陽性の制御性細胞（CD8Treg）が重要であることを既に見出している。そこで、本研究では、CD8Treg が寄生虫によってどのように誘導されるかを解明することを目的とする。

【方法】寄生虫感染マウス、非感染マウスの糞便を回収し、次世代シーケンサーを用いて菌叢解析を行った。また、CD8Treg の増減と腸内細菌の増減をヒートマップ解析し、CD8Treg に関わる腸内細菌を特定した。特定した菌は単離し、寄生虫非感染マウスに経口摂取させることで CD8Treg の誘導を試みた。

【結果】寄生虫感染マウスと、非感染マウスでは、腸内細菌叢が明らかに違い、中でも *Ruminococcus* 属に分類される腸内細菌が大きく変化していることを見出した。さらに詳細な解析により *Ruminococcus* 属の中でどの細菌が増加しているかを調べたところ、*R. gnavus* が寄生虫感染特異的に増加していることを見出した。そこで、非感染マウスに *R. gnavus* を経口的に投与すると、寄生虫が感染していなくても CD8Treg を誘導できた。このことから、CD8Treg の誘導には *R. gnavus* が重要であることが明らかになった。今後、CD8Treg を移入することで治療的に、さらには腸内細菌を人為的に操作することで1型糖尿病を予防できる可能性が示された。

寄生虫による腸内細菌依存的な1型糖尿病抑制メカニズム



139. 1 型糖尿病制御に向けた新たな治療法の開発

下川　周子

*群馬大学 大学院医学系研究科 生体防御学分野

Key words：寄生虫，自己免疫疾患，衛生仮説，腸内細菌，免疫抑制

緒　言

腸管寄生蠕虫は、宿主内での防御機構を回避し長期間生存するために、宿主の免疫を変調させる術を備えてきた。この特性は、過剰な免疫応答を抑制することで宿主にも恩恵を与えてきたとされる。近年、先進国においては衛生環境の向上により腸管寄生蠕虫の感染率は激減し、相反するようにアレルギー、自己免疫疾患などの炎症性疾患が増加してきた。これは衛生仮説と呼ばれ、炎症性疾患が増加した原因を感染症への暴露が減少したためだとする説は、疫学的にも証明されている。実際に我々は、自己免疫疾患である 1 型糖尿病のマウスモデルに腸管寄生蠕虫を感染させると、糖尿病の発症が抑えられることをこれまでに見出した。この時の免疫応答を詳細に解析したところ、CD8 陽性の制御性 T 細胞（CD8Treg）が増加していた。1 型糖尿病の発症抑制に CD8Treg が関与しているかどうかを調べるために、抗体による中和実験を行うと、発症の抑制が見られなくなり、逆に CD8Treg の移入実験を行ったところ、腸管寄生蠕虫が感染していないマウスでも発症が抑制された。この結果から、腸管寄生蠕虫による 1 型糖尿病の発症抑制は CD8Treg に依存していることを明らかにした。さらに、抗生剤入りの水を投与する実験によって、CD8Treg の誘導は腸内細菌が関与していることも示唆されていたが、これまでどの腸内細菌が CD8Treg を誘導するのかは不明のままであった。そこで本研究では、CD8Treg を誘導する腸内細菌を同定することを目的とした。

方法および結果

寄生虫は、げっ歯類の腸管に寄生することが知られている *Heligmosomoides polygyrus* を使用した。*H. polygyrus* は、幼虫を 200 隻経口投与すると小腸の粘膜下へ一度侵入し、その後、管腔へ出て雄と雌がメーティングし、雌が卵を約 3 ヶ月産み続け、様々な免疫応答を惹起する寄生虫である［1］。また、1 型糖尿病モデルには、ストレプトゾトシン（STZ）を使用した。STZ は膵臓のβ細胞を特異的に破壊するため、低濃度で頻回投与によりβ細胞からのインスリン分泌が認められなくなり高血糖となることが知られている。

1.　寄生虫感染マウス、非感染マウスの菌叢解析

寄生虫を感染させ 2 週間後に STZ を投与した。すると、これまで我々の研究で見られていた通り、寄生虫感染マウスでは非感染マウスと比べて血糖値の上昇が有意に抑えられた。そこで、STZ 投与後 2 週間目の糞便を回収し、次世代シーケンサーを用いて菌叢解析を行うと感染の有無で腸内細菌叢が大きく変化することが明らかになった。変化があった腸内細菌と CD8Treg の増加との相関を解析したところ、CD8Treg が増加しているマウスでは *Firmicutes* 門に含まれる *Ruminococcaceae* が顕著に増加していた（図 1）。さらに OTU レベルでその腸内細菌を調べたところ、OTU718（候補菌）を同定した。

2. 候補菌の単離、マウスへの投与

寄生虫非感染マウスに CD8Treg を誘導する候補菌である OTU718 と、ネガティブコントロールとして同じ *Firmicutes* 門に含まれる OTU58（*Firmicutes prausnizii*）の単離を試みた。OTU58 は培養可能であったが、OTU718 は嫌気要求度が高いため培養不可であった。そこで ATCC から OTU718 と配列が 10 塩基違う *R. gnavus* を購入し、野生型マウスにそれぞれ 1×10^8 CFU ずつ投与した。投与 2 週間後にフローサイトメトリーで CD8Treg の増減を解析したところ *F. prausnitzii* では誘導されず、*R. gnavus* では誘導された（図 2）。このマウスに STZ を投与し、

*現在の所属：国立感染症研究所 寄生動物部

1 型糖尿病を誘導したところ CD8Treg が誘導できた *R. gnavus* 投与マウスでは発症が抑制された。

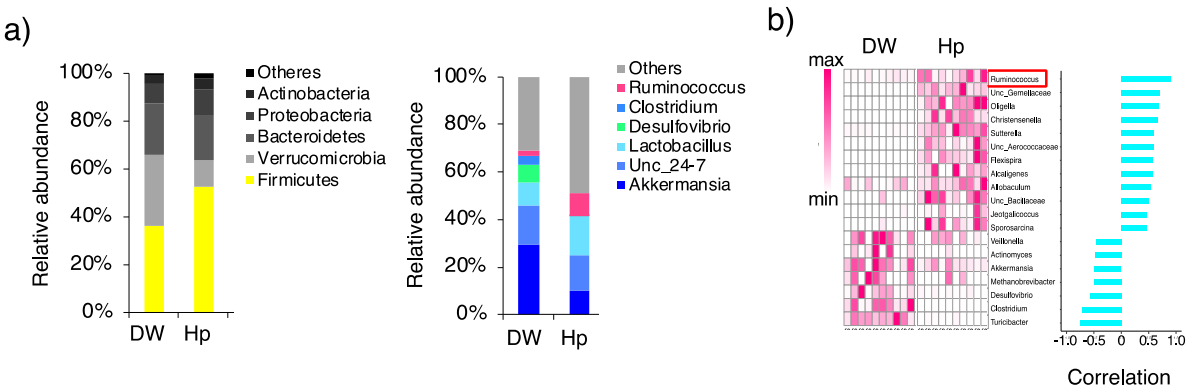


図 1. 非感染マウス（DW）と寄生虫感染マウス（Hp）の腸内細菌叢の変化

a) 寄生虫感染後 2 週間における糞便中の菌叢解析を行った時の結果を、門レベル(左)、科レベル(右)で示した。寄生虫が感染すると、*Firmicutes* 門 *Ruminococcus* 科の細菌が増加していた。

b) CD8Treg の増加と、各種細菌の増加をヒートマップ 解析したところ、CD8Treg の増加と最も相関があった菌は *Ruminococcus* であった。

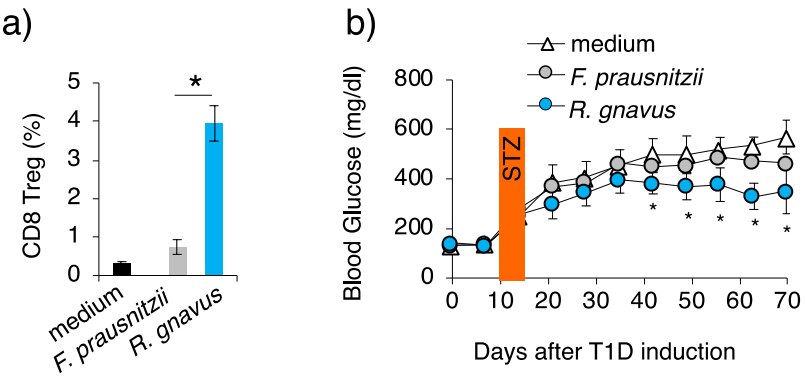


図 2. 単離した候補菌をマウスに経口投与させた時の CD8Treg と血糖値の変化

a) 候補菌である *R. gnavus* と、コントロールとして *F. prausnitzii* をマウスに経口投与すると、*R. gnavus* を投与したマウスにおいてのみ、脾臓における CD8Treg の増加が認められた。Tukey post-hoc analysis、$p<0.05$。

b) 各菌を投与して 2 週間後、STZ 投与を行い T1D の発症を誘導した。CD8Treg を誘導できた *R. gnavus* 投与マウスでは発症を抑制できた。two-way ANOVA、$p<0.05$。

考　察

本研究により、寄生虫が腸内細菌である *R. gnavus* を介して CD8Treg を誘導することが明らかになった［2］。

外的環境との境界をなす皮膚や粘膜には膨大な数の細菌が常在菌として定着している。これらは我々宿主の生理や病理に大きな影響を与えていると考えられている。近年、次世代シーケンサーの登場とともに腸内細菌叢全体のゲノムを丸ごと解析するいわゆるメタゲノム解析が普及した結果、腸内細菌叢が消化器疾患だけでなくアレルギーや自己免疫疾患、代謝内分泌疾患、脳神経疾患にも関与することが知られてきた。本研究で明らかになったように、今後、どのような腸内細菌が、どのようにして疾患の発症に関与するかは基礎研究としてだけでなく、臨床応用としての可能性も秘めている。

共同研究者・謝辞

本研究は、理化学研究所統合生命医科学研究センター粘膜システム研究グループの大野博司グループリーダー、加藤完研究員、竹内直志研究員との共同研究である。

文　献

1） Reynolds LA., Filbey KJ., Maizels RM. Immunity to the model intestinal helminth parasite Heligmosomoides polygyrus. Semin Immunopathol. 2012; 34(6):829-46. DOI:10.1007/s00281-012-0347-3

2） Shimokawa C., Kato T., Takeuchi T., Ohshima N., Furuki T., Ohtsu Y., Suzue K., Imai T., Obi S., Olia A., Izumi T., Sakurai M., Arakawa T., Ohno H., Hisaeda H. CD8+ regulatory T cells play a critical role in prevention of autoimmune-mediated diabetes. Nat. Commun. 2020 DOI：10.1038/s41467-020-15857-x