

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09520

研究課題名(和文) 胚中心応答制御による自己免疫疾患の新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of a novel method for therapy against autoimmune disease

研究代表者

坂本 明美 (Sakamoto, Akemi)

千葉大学・バイオメディカル研究センター・准教授

研究者番号：90359597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では自己免疫疾患の新規治療法開発を目的として動物モデルを用いた発症関与因子の検索、治療薬探索を行った。

特に実験的自己免疫性脳脊髄膜炎での検討で疾患発症因子および炎症継続因子として因子Aが重要であることを明らかにした。さらに因子Aの機能阻害剤を網羅的に検索し、複数の候補低分子化合物を得た。疾患の新規治療法の開発に繋げたい。

研究成果の概要(英文)：We studied autoimmune disease related factors using animal model in this project. First we developed mouse autoimmune induced models. Among them experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model represented symptoms. We found that factor A was critical for development of experimental autoimmune encephalomyelitis because factor A CD4Cre knocked out mice did not show the symptom of the diseases. After searched inhibitors of factor A offered from small chemical library, we finally found several small chemicals as functional inhibitor. These results may useful for development of new therapeutic methods against autoimmune diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患 転写因子 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は多様な病相を示し生活の質に大きくかかわる。さまざまな生物製剤も開発され治療効果が飛躍的に向上しているが、再燃を繰り返し炎症性疾患として慢性の経過をとることも多い。免疫応答を修飾でき、発症抑制、症状軽快が可能な新規治療法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

本研究課題では自己免疫疾患の新規治療法開発を目的に動物モデルを用いて、以下の2点の研究を行った。

- (1) 自己免疫疾患発症関与に関わる因子の検索
- (2) 自己免疫疾患発症関与因子の機能を修飾できる化合物の探索

3. 研究の方法

(1) 自己免疫疾患発症モデルによる発症関連因子の検討:

野生型マウスを用いた自己免疫疾患発症モデルの系の確認(多発性硬化症モデル、ループモデル、リウマチモデル): 論文上使用されている免疫系(抗原および完全フロイントアジュバントのエマルジョン、百日咳菌トキシン追加投与)を用いて効率よく自己免疫疾患を発症する系を作成した。

リンパ球の機能修飾を起こすことが想定される因子の欠損マウスを用いた自己免疫疾患発症抑制の検討: において多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄膜炎(EAE: Experimental Autoimmune Enecephalomyelitis)で効率よく発症する系が作成できた。そこでEAEの系を用いてリンパ球の分化に関わる因子のリンパ球特異的欠損マウス(CD4Creマウス)を用いて、免疫し疾患発症率を検討した。

さらに明らかになった因子の薬剤誘導性欠損マウス(ERT2Creマウス)を用いて、疾患発症後に因子の欠損を誘導し、症状の変化にど

のように影響があるかを観察した。

(2) 自己免疫疾患発症関連因子の機能修飾剤の検索:

化合物ライブラリより提供いただいた試薬を用いて培養系で関与因子の機能修飾能を確認した。

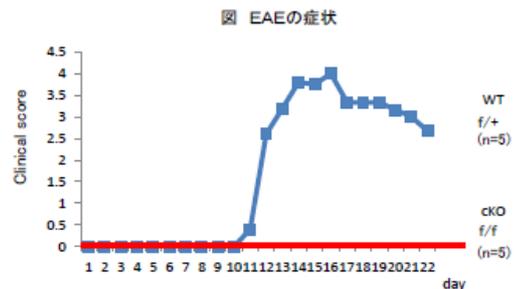
結合解析による低分子化合物の関与分子機構の確認をした。

4. 研究成果

(1) 自己免疫疾患発症因子の検索:

免疫後のリンパ球分化に関わる因子のT細胞特異的欠損マウスを用いてEAE発症率を検討した。その結果、因子Aが発症および病態継続に関わることを明らかにした。

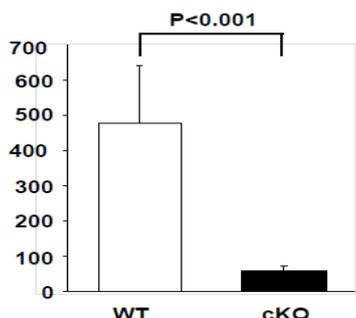
すなわち、T細胞特異的因子A欠損マウスではEAEの症状が発症しない(図)。さらに、発症後に因子Aを薬剤誘導性に欠損させると症状が軽快した。これらの結果から、因子Aの機能阻害剤は自己免疫疾患の新規治療薬として応用できると考えられた。



(図) EAEの症状: 野生型(WT)およびT細胞特異的因子A欠損マウス(cKO)にEAEを誘導し(day0)神経症状をスコア化した。WTマウスは全個体で神経症状が発症し症状も悪化した。cKOマウスは1個体も発症しなかった。

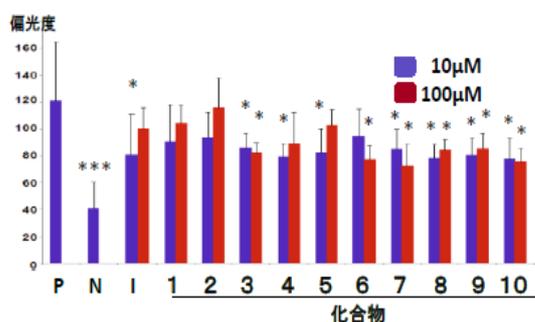
因子Aの自己免疫疾患発症抑制メカニズムの解析: 野生型マウス病変部に浸潤しているリンパ球の特徴を解析しT細胞の分化の特徴を明らかにした。その結果野生型マウスでの病変局所浸潤リンパ球の表現型に特徴があった。因子A欠損マウスでは野生型での特徴を示すリンパ球が分化しないし、病変局所への

細胞浸潤も起こさない(図)。野生型マウスで認められた脱髄による病変も、因子A欠損マウスでは組織学的に認められなかった。これらの結果から、因子Aは疾患発症関連T細胞の分化に必須の因子と考えられる。



(図) 腰髄への細胞浸潤: EAE誘導後day15での腰髄をHE染色し、単位面積当たりの浸潤細胞数をカウントした。WTに比べcKOでは浸潤している細胞は有意に少なかった。

(2) 因子A阻害剤の探索: 化合物ライブラリより低分子化合物の提供を受け、蛍光偏光法による結合スクリーニング バイオインフォマティクスによる結合予測解析 培養系を用いた機能阻害効果の評価を行い、複数の候補化合物を見出した。さらに創薬機構より化合物提供を受け、ヒットする化合物を見出した。今後、動物を用いた自己免疫疾患実験系で、安全性と有用性を評価することで臨床応用へ繋げていきたい。



(図) 蛍光偏光法の結果: P; 陽性コントロール N; 陰性コントロール I: 既存の阻害薬 1~10: 低分子化合物 結果は平均値±標準偏差を示す。測定結果をもとにPとの有意差を student-tで検定した。*; p<0.05, ***; p<0.005. 既存の阻害薬よりも偏光度を下げ、阻害剤として有用と考えられる化合物

が複数見出された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Ogasawara T, Kohashi Y, Hatano M, Ikari J, Taniguchi T, Tsuruoka N, Watanabe-Takano H, Fujimura L, Sakamoto A, Hirata H, Fukushima Y, Fukuda T, Kurasawa K, Tatsumi K, Tokuhisa T, Arima M, TH2 response governed by Bcl6 function in naturally occurring memory phenotype CD4+ T cells. *Front. Immunol.*, 10 April 2018 査読有

Oami T, Watanabe E, Hatano M, Teratake Y, Fujimura L, Sakamoto A, Ito C, Toshimori K, Swanson PE, Oda S. Blocking Liver Autophagy Accelerates Apoptosis and Mitochondrial Injury in Hepatocytes and Reduces Time to Mortality in a Murine Sepsis Model. *Shock*. 2017 Oct 25. doi: 10.1097/SHK.0000000000001040. 査読有

Shimazui T, Nakada TA, Fujimura L, Sakamoto A, Hatano M, Oda S. Development of Noninvasive In Vivo Approach to Assess Vascular Permeability in Inflammation Using Fluorescence Imaging. *Shock*. 2017 Dec 4. doi: 10.1097/SHK.0000000000001075. 査読有

Ogasawara T, Hatano M, Satake H, Ikari J, Taniguchi T, Tsuruoka T, Takano H, Fujimura L, Sakamoto A, Hirata H, Sugiyama K, Fukushima Y, Fukuda T, Kurasawa K, Tatsumi K, Tokuhisa T, Arima M. Development of chronic allergic responses by dampening Bcl6-mediated suppressor activity in memory Th2 cell. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2017 Jan 31;114(5):E741-E750. doi:

10.1073/pnas.1613528114. 査読有

Hosokawa J, Suzuki K, Meguro K, Tanaka S, Maezawa Y, Suto A, Fujimura L, Sakamoto A, Clevaers H, Ohara O, Nakajima H. IkBNS enhances T follicular helper cell differentiation and function as downstream of Ascl2. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Dec 21;7:2050. doi: 10.3389/fmicb.2016.02050. 査読有

Saito T, Sakamoto A, Hatano M, Iwai J, Higashimoto Y, Yoshida H. Systemic and local cytokine profile in biliary atresia. *Eur J Pediatr Surg* 2016 Sep 16. [Epub ahead of print] 査読有

Oami T, Watanabe E, Hatano M, Sunahara S, Fujimura L, Sakamoto A, Ito C, Toshimori K, Oda S. Suppression of T Cell Autophagy Results in Decreased Viability and Function of T Cells Through Accelerated Apoptosis in a Murine Sepsis Model. *Crit Care Med*. 2016 Sep 9. 査読有

Teratake Y, Kuga C, Hasegawa Y, Sato Y, Kitahashi M, Fujimura L, Watanabe-Takano H, Sakamoto A, Arima M, Tokuhisa T, Hatano M. Transcriptional repression of p27 is essential for murine embryonic development. *Sci Rep*. 2016; May 19;6:26244. doi: 10.1038/srep26244. 査読有

Meguro K, Suzuki K, Hosokawa J, Sanayama Y, Tanaka S, Furuta S, Ikeda K, Takatori H, Suto A, Sakamoto A, Ohara O, Nakajima H. Roles of B Cell Leukemia/Lymphoma 3 in the development of T follicular helper cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2015; 67: 2651-60.

doi: 10.1002/art.39266. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

Noninvasive technique using fluorescence imaging to assess vascular permeability in sepsis. Takashi Shimazui, Taka-aki Nakada, Lisa Fujimura, Akemi Sakamoto, Masahiko Hatano, Shigeto Oda・ISICEM ベルギーブリュセル 2018.3.20

Roles of enteric neurons in gut mucosal immunity. Lisa Fujimura, Akemi Sakamoto, Masahiko Hatano 第46回日本免疫学会学術集会 12/12-14 (仙台 12/14) 2017

腸管神経細胞分化における Ncx の機能解析 小林茉優、幡野雅彦、坂本明美、藤村理紗、寺竹洋一、深谷小百合 第39回日本分子生物学会年会(横浜 12/1) 2016

腸管神経過多マウスを用いた腸管神経系と免疫系の相互作用の解析 藤村理紗、坂本明美、幡野雅彦 第39回日本分子生物学会年会(横浜 12/1) 2016

Role of enteric neurons in regulation of intestinal homeostasis. Fujimura L, Sakamoto A, Arima M, Tokuhisa T, Hatano M. 第44回日本免疫学会学術集会 11/18-20 (札幌 11/20) 2015

Nczf 欠損における個体発生異常と p27 との関与 寺竹洋一、藤村理紗、坂本明美、有馬雅史、幡野雅彦 第38回日本分子生物学会年会 12/1-4 (神戸 12/3) 2015

〔その他〕
ホームページ等
千葉大学・バイオメディカル研究センター

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/dept/biomed/>
千葉大学・大学院医学研究院・疾患生命医学
<http://www.m.chiba-u.jp/dept/shikkanseime/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 明美 (SAKAMOTO, Akemi)
千葉大学・バイオメディカル研究センター・准教授
研究者番号：90359597

(2) 研究分担者

植松 智 (UEMATSU, Satoshi)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：50379088

幡野 雅彦 (HATANO, Masahiko)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：20208523

藤村 理紗 (FUJIMURA, Lisa)
千葉大学・バイオメディカル研究センター・助教
研究者番号：30376363