

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09779

研究課題名(和文)核成分に対する免疫寛容の破綻からSLE発症に至る機序の解明

研究課題名(英文) Exploring the mechanisms how the loss of tolerance against nuclear autoantigens leads to development of SLE

研究代表者

宮川 史 (Miyagawa, Fumi)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00346024

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)：本研究では、SLEにおけるIRF7とIRF8の役割をプリスタン誘発性SLEモデルマウスを用いて検討した。IRF7欠損マウスは野生型マウスと同程度に糸球体腎炎を発症したが、自己抗体の産生は認められなかった。IRF8欠損マウスでは、自己抗体の産生はみられず糸球体腎炎も軽減した。野生型、IRF7欠損マウスにおいては腹腔内、腎臓等に炎症性単球が浸潤しており、炎症性サイトカインを産生していたが、IRF8欠損マウスでは浸潤がみられなかった。自己抗体の産生にはI型IFN経路が、糸球体腎炎等の臓器障害には炎症性単球由来のNF- κ B経路依存性の炎症性サイトカインが重要な役割を果たしていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of IRF7 and IRF8 in the pathogenesis of SLE using a mouse model of SLE induced by pristane. SLE was chemically induced into IRF7 knockout (KO) mice and glomerulonephritis were observed after 10 months. However, these mice failed to produce autoantibodies. In contrast, following the chemical induction, IRF8KO mice showed no production of autoantibodies along with reduced glomerulonephritis. We found that inflammatory monocytes were recruited into the peritoneum as well as the kidney in wild-type and IRF7KO mice but not in IRF8KO mice after pristane injection. These inflammatory monocytes produced proinflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α , suggesting that they contribute to tissue damage. Our study suggests that type I IFN pathway seems critical for the autoantibody production but NF- κ B-dependent proinflammatory cytokines produced from inflammatory monocytes are sufficient for the development of glomerulonephritis in this model.

研究分野：皮膚免疫学

キーワード：SLE IRF type I IFN NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

(1) 免疫反応/免疫寛容のメカニズム

中枢性免疫寛容で排除しきれなかった自己反応性 T 細胞は末梢に存在し、末梢性免疫寛容メカニズムで制御される。末梢性免疫寛容が破綻すると自己免疫疾患が発症することが知られている。我々は末梢性免疫寛容のメカニズムを解明するために、自己抗原としての chicken ovalbumin (OVA) を末梢組織 (皮膚) に発現させた K14-OVA トランスジェニックマウス (Tg) を作成した^{1,2}。MHC class I 拘束性に OVA を認識する T 細胞受容体を過剰に発現させた OT-I マウスを用いることにより、K14-OVATg マウスの自己抗原 (OVA) に対する免疫反応、免疫寛容を惹起することが可能である。我々はこれらのマウスを用いて、IL-15³、OVA ペプチド^{4,5}、double negative regulatory T 細胞⁶ が自己免疫反応/免疫寛容を制御することを報告した。

(2) 免疫反応/免疫寛容を制御する転写因子としての IRF 転写因子

上述のように我々は K14-OVATg マウスを用いて、IL-15 が免疫寛容を破綻させて自己免疫反応を引き起こす重要なサイトカインであることを明らかにした³。我々は次に、免疫反応/免疫寛容のチェックポイントに関わる因子を分子レベルで明らかにすることにした。そこで IL-15 を添加した OT-I 細胞の培養系を用いて、免疫反応と免疫寛容を生じる培養条件下での遺伝子発現をマイクロアレイで比較し、Interferon regulatory factor (IRF)8 が候補遺伝子の1つであることを見出した⁷。

(3) IRF が発症に関与していると考えられる自己免疫疾患

以上のような免疫系における重要な役割を反映して、IRF の遺伝子多型が特定の自己免疫疾患の発症に関与していることが明らかとなってきた。例えば IRF5、IRF7 の遺伝子多型は全身性エリテマトーデス (SLE) の発症

と深く関わっていることが報告されている。また IRF8 の遺伝子多型は SLE および multiple sclerosis の発症と関わっていることも最近になって報告された。しかしこれらの IRF 転写因子が具体的にどのように自己免疫疾患の発症に関与しているかについてはあまり分かっていない。従来より SLE の発症には IFN- α が重要な役割を果たしていることがよく知られていた。SLE は、自己の細胞の核成分に対する免疫寛容が破綻し、自己抗体 (抗核抗体) が産生されることで発症する。IRF は IFN- α の重要な転写制御因子であること、IRF5、7、8 の遺伝子多型が SLE と関係していることが示唆されていることより、SLE の発症に IRF が必須の役割を果たしている可能性がある。IRF5 の SLE における役割については、B 細胞での IgG の class switching に関与しているとする報告があるが、IRF7、IRF8 についての報告は調べ得た限り認められなかった。

2. 研究の目的

我々はプリスタン誘発性 SLE モデルマウスを用いて IRF7、IRF8 の役割を明らかにすることにした。プリスタン誘発性 SLE モデルマウスは確立されたモデルで、ヒト SLE にみられる I 型 IFN signature を模倣できる唯一のモデルである。野生型マウスにプリスタンを腹腔内投与すると、約 10 ヶ月の経過の後に糸球体腎炎、自己抗体の産生、関節炎等がみられ、ヒトの SLE に類似した症状を呈する。本研究では、IRF7 ノックアウト (KO) マウスと IRF8KO マウスにプリスタンを投与することにより、自己抗体の産生や糸球体腎炎がみられるかどうかをまず検討することにした。次いで、野生型マウスと異なる臨床症状がみられた場合、IRF7、IRF8 がどのようなメカニズムを介してその病態形成に関与しているかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

野生型 (C57BL/6) マウス、IRF7KO マウス、IRF8KO マウスにプリスタンの腹腔内投与を行った。2週間後に摘出した脾臓より RNA を抽出し real-time PCR を施行し、IFN-inducible genes (Mx1、MCP-1、IP-10 等) の発現をみることで、I 型 IFN の産生の有無を確認した。さらにプリスタン投与2週間後に採取した血清を用いて、ELISA 法により炎症性サイトカイン (IFN- α 、IFN- β 、TNF- α 、IL-6 等) の濃度を3系統のマウスで比較検討した。SLE 患者ではアポトーシスの制御に異常をきたしていることが報告されていることより、野生型マウス、IRF7KO マウス、IRF8KO マウスにおけるアポトーシスの制御について検討した。具体的な方法としては、プリスタンあるいは PBS を投与した後、2日あるいは2週間経過したマウスの腹水を採取し遠心分離した後に peritoneal exudate cell を回収した。回収した細胞を抗 active-caspase 3 抗体、抗 Annexin V 抗体/PI で染色し、flow cytometer で解析することで、これらの抗体に陽性となるアポトーシス細胞の割合を3系統のマウスで比較した。また in vitro の実験系でも同様の実験を行った。3系統のマウスより分離した新鮮な peritoneal exudate cell とプリスタンを共培養した後、細胞を回収し、抗 active-caspase 3 抗体、抗 Annexin V 抗体/PI で染色した後 flow cytometer で解析した。

さらに臨床症状を解析するために、プリスタン投与後10ヶ月経過した後に、3系統のマウスの尿、血清、腎臓を採取した。腎障害の程度を定量するために、尿検査を施行し、腎臓の病理組織検査および蛍光抗体直接法を施行した。すなわち、尿試験紙を用いて尿蛋白の程度を定量し、腎臓をパラフィン包埋し H&E 染色を行うことで、糸球体の障害の程度を定量し、マウス間で比較した。もう一方の腎臓は凍結切片を作成し、蛍光抗体直接法で免疫グロブリン、補体の沈着の有無を観察し、

スコアを用いて定量した。自己抗体の産生の有無はプリスタン投与10ヶ月後の血清を用いて検討した。3系統のマウスの血清を Hep-2 細胞を用いた蛍光抗体間接法でスクリーニング的に抗核抗体の産生の有無をしらべ、さらに抗核抗体、抗 Sm 抗体、抗 RNP 抗体、抗 ssDNA 抗体、抗 dsDNA 抗体の有無を ELISA 法を用いて検討した。

4. 研究成果

我々はまず I 型 IFN の master regulator である IRF7 に焦点をあて、プリスタン誘発性 SLE モデルマウスを用いて、SLE における IRF7 の役割を検討した。IRF7KO マウスにプリスタンを投与すると、野生型マウスと同様に糸球体腎炎は認められたが、血清中の自己抗体は検出されず、自己抗体の産生と糸球体腎炎の発症の間に解離がみられた。すなわち IRF7KO マウスにおいても、プリスタン投与10ヶ月後には、尿蛋白が検出されるとともに、蛍光抗体直接法にて腎糸球体に IgG の沈着が認められたが、ELISA 法にて血清中の抗核抗体、抗 dsDNA 抗体、抗 ssDNA 抗体、抗 Sm 抗体、抗 RNP 抗体は検出できなかった。また Hep-2 細胞を用いた蛍光抗体間接法においても、IRF7KO マウスの血清中には、抗細胞質抗体を含めたいかなる抗体も検出できなかったことより、腎における IgG の沈着は炎症後に二次的に生じている可能性が考えられた。プリスタン投与2週間後の脾臓を用いて real-time PCR を施行すると、野生型マウスでは IFN-stimulated genes の発現の上昇は認められるが、IRF7KO マウスでは認められなかった。これは IRF7 が I 型 IFN の master regulator である事実に合致し、IRF7 を介する I 型 IFN pathway が自己抗体の産生に重要な役割を果たしている可能性を示唆するものである。ところが NF- κ B target genes の発現は、野生型マウスと IRF7KO マウスで同程度に認められたことより、inflammation に中心的な役割を果たす NF- κ B pathway の活性

化は、IFN pathway とは無関係に起こっており、臓器障害に関与している可能性が示唆された。これを検証するために、IRF7KO マウスに NF- κ B 阻害剤を投与した上で、プリスタンにより SLE を誘発したところ、尿蛋白は著明に減少したことより、NF- κ B pathway が糸球体腎炎の発症に関係していることを証明できた。さらに我々は、IRF7KO マウスにプリスタンを投与することで SLE を誘発すると、高ガンマグロブリン血症は正常に起こるが、自己抗体（抗核抗体）の産生のみが障害されていることを明らかにした。以上の研究成果は国際英文雑誌に発表した⁸。

一方、IRF8KO マウスにプリスタンを投与すると、血清中の自己抗体は検出されず、糸球体腎炎も軽減したことより、IRF8KO マウスは SLE を発症しないようである。すなわちプリスタン投与 10 ヶ月後に、尿蛋白はほとんど検出されず、蛍光抗体直接法にて腎糸球体に IgG の沈着も認められなかった。また Hep-2 細胞を用いた蛍光抗体間接法においても、IRF8KO マウスの血清中には抗核抗体は検出できなかった。IRF8 は I 型 IFN の転写に関与するだけでなく、TNF- α / IL-6 / IL-12 の転写にも関与しており、TNF- α / IL-6 / IL-12 は NF- κ B の target gene でもあるためであると考えられる。我々の研究結果によると、野生型、IRF7KO、IRF8KO マウスのすべての系統において、プリスタンによりアポトーシスが誘導されることより、抗原となる核成分はいずれの系統においても同程度に存在していると考えられる。興味深いことに、プリスタン投与後 2 週の野生型、IRF7KO、IRF8KO マウスの腹腔内細胞の組成をしらべると、野生型と IRF7KO マウスでは炎症性単球 (Ly6C^{high}CD11b⁺Ly6G⁻) が浸潤してきているが、IRF8KO マウスでは浸潤はみられなかった。炎症性単球および炎症性単球から産生される TNF- α 、IL-6 等の炎症性サイトカインが、野生型マウスと IRF7KO マウスにおいて腎障害

の原因となっている可能性があり現在研究を進めている。

<引用文献>

1. Shibaki A, Sato A, Vogel JC, Miyagawa F, Katz SI, Induction of GVHD-like skin disease by passively transferred CD8+ T-cell receptor transgenic T cells into keratin 14-ovalbumin transgenic mice, *J Invest Dermatol*, 123, 2004, 109-115
2. Miyagawa F, Gutermuth J, Zhang H, Katz SI, The use of mouse models to better understand mechanisms of autoimmunity and tolerance, *J Autoimmun*, 35, 2010, 192-198
3. Miyagawa F, Tagaya Y, Kim BS, Patel HJ, Ishida K, Ohteki T, Waldmann TA, Katz SI, IL-15 serves as a co-stimulator in determining the activity of autoreactive CD8 T cells in an experimental mouse model of graft vs. host like disease, *J Immunol*, 181, 2008, 1109-1119
4. Gutermuth J, Nograles KE, Miyagawa F, Nelson E, Cho YH, Katz SI, Self-peptides prolong survival in murine autoimmunity via reduced IL-2/IL-7 mediated STAT5 signaling, CD8 coreceptor, and V alpha2 down-regulation, *J Immunol*, 183, 2009, 3130-3138
5. Paek SY, Miyagawa F, Zhang H, Linton J, Hoover S, Simpson MR, Katz SI, Soluble peptide treatment reverses CD8 T cell-induced disease in a mouse model of spontaneous tissue-selective Autoimmunity, *J Invest Dermatol*, 132, 2012, 677-686
6. Miyagawa F, Okiyama N, Villarreal V, Katz SI, Identification of CD3+CD4-CD8-T cells as potential regulatory cells in an experimental murine model of GVHD, *J Invest Dermatol*, 133, 2013, 2538-2545
7. Miyagawa F, Zhang H, Terunuma A, Ozato K, Tagaya Y, Katz SI, Interferon regulatory factor 8 integrates T-cell receptor and cytokine-signaling pathways and drives effector differentiation of CD8 T cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 2012, 12123-12128
8. Miyagawa F, Tagaya Y, Ozato K, Asada H, Essential requirement for IFN regulatory factor 7 in autoantibody production but not development of nephritis in murine lupus, *J Immunol*, 197, 2016, 2167-2176

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 16 件)
英文のみ記載、全て査読有

1. Miyagawa F, Asada H, Reactivity to anti-RNA polymerase III antibody and nailfold capillary changes in patient with generalized morphea combined with

- multiple autoimmune disorders.
Eur J Dermatol. 28, 112-113. 2018
doi: 10.1684/ejd.2017.3171.
2. Miyagawa F, Nakamura Y, Ommori R, Miyashita K, Iioka H, Miyashita N, Nishikawa M, Himuro Y, Ogawa K, Asada H, Predominant contribution of CD4 T cells to human herpesvirus 6 (HHV-6) load in the peripheral blood of patients with drug-induced hypersensitivity syndrome and persistent HHV-6 infection, Acta Derm Venereol, 98, 2018, 146-148
doi: 10.2340/00015555-2791.
 3. Ommori R, Park K, Miyagawa F, Azukizawa H, Kanno M, Asada H, EGFR inhibitory monoclonal antibodies and EGFR tyrosine kinase inhibitors have distinct effects on the keratinocyte innate immune response, Br J Dermatol, 178, 2018, 796-797
doi: 10.1111/bjd.15445.
 4. Miyagawa F, Shobatake C, Fukumoto T, Yamanaka Y, Kobayashi N, Nishimura K, Masuda M, Asada H, Cutaneous phaeohyphomycosis caused by Exophiala jeanselmei in a healthy individual, J Dermatol, 45, 2018, 106-108
doi: 10.1111/1346-8138.13766.
 5. Miyagawa F, Sugano Y, Sho M, Asada H, TS-1 (tegafur/gimeracil/oteracil)-induced systemic lupus erythematosus with skin lesions and anti-Sm antibody, Eur J Dermatol, 27, 2017, 646-647
doi: 10.1684/ejd.2017.3101.
 6. Miyagawa F, Ogawa K, Asada H, A case of CD4+/CD8+ double-positive primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma of the lip involving spontaneous regression after biopsy, Eur J Dermatol, 27, 2017, 68-69
doi: 10.1684/ejd.2016.2899.
 7. Miyagawa F, Tagaya Y, Ozato K, Asada H, Essential requirement for IFN regulatory factor 7 in autoantibody production but not development of nephritis in murine lupus, J Immunol, 197, 2016, 2167-2176
doi: 10.4049/jimmunol.1502445.
 8. Nakamura Y, Miyagawa F, Okazaki A, Okuno Y, Mori Y, Iso H, Yamanishi K, Asada H; Shozo Herpes Zoster Study Group, Clinical and immunologic features of recurrent herpes zoster (HZ), J Am Acad Dermatol, 75, 2016, 950-956.e1
doi: 10.1016/j.jaad.2016.05.037.
 9. Miyagawa F, Nakamura Y, Miyashita K, Iioka H, Himuro Y, Ogawa K, Nishimura C, Nishikawa M, Mitsui Y, Ito Y, Ommori R, Mori Y, Asada H, Preferential expression of CD134, an HHV-6 cellular receptor, on CD4 T cells in drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS), J Dermatol Sci, 83, 2016, 151-154
doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.05.001.
 10. Miyashita K, Ogawa K, Iioka H, Miyagawa F, Okazaki A, Kobayashi N, Asada H, Adult case of staphylococcal scalded skin syndrome differentiated from toxic epidermal necrolysis with the aid of dermoscopy, J Dermatol, 43, 2016, 842-843
doi: 10.1111/1346-8138.13281.
 11. Miyashita K, Shobatake C, Miyagawa F, Kobayashi N, Onmori R, Yonekawa S, Tanabe K, Kawate K, Morita K, Asada H, Involvement of Human Herpesvirus 6 Infection in Renal Dysfunction Associated with DIHS/DRESS, Acta Derm Venereol, 96, 2016, 114-115
doi: 10.2340/00015555-2149.
 12. Miyagawa F, Hirose C, Fukumoto T, Asai H, Kobayashi N, Asada H, Cutaneous squamous cell carcinoma with extensive perineural invasion and perineural cyst formation without regional lymph node metastases, J Dermatol, 42, 2015, 930-931
doi: 10.1111/1346-8138.12981.
 13. Aihara M, Kano Y, Fujita H, Kambara T, Matsukura S, Katayama I, Azukizawa H, Miyachi Y, Endo Y, Asada H, Miyagawa F, Morita E, Kaneko S, Abe R, Ochiai T, Sueki H, Watanabe H, Nagao K, Aoyama Y, Sayama K, Hashimoto K, Shiohara T; SJS/TEN Study Group, Efficacy of additional i.v. immunoglobulin to steroid therapy in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis, J Dermatol, 42, 2015, 768-777
doi: 10.1111/1346-8138.12925.
 14. Himuro Y, Miyagawa F, Fukumoto T, Morii T, Hasegawa M, Kobayashi N, Asada H, Hypersensitivity to influenza vaccine in a case of Epstein-Barr virus-associated T-lymphoproliferative disorder, Br J Dermatol, 172, 2015, 1686-1688
doi: 10.1111/bjd.13713.
 15. Miyagawa F, Iioka H, Fukumoto T, Kobayashi N, Asada H, A case of CD8+ primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma arising from tissue-resident memory T (T_{RM}) cells in the skin, Br J Dermatol, 173, 2015, 612-614
doi: 10.1111/bjd.13687.
 16. Miyagawa F, Hasegawa A, Imoto K, Ogawa K, Kobayashi N, Ito K, Fujita H, Aihara M, Watanabe H, Sueki H, Tohyama M, Asada H, Differential expression profile of Th1/Th2-associated chemokines characterizes Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis (SJS/TEN) and drug-induced hypersensitivity syndrome /drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DIHS/DRESS) as distinct entities, Eur J Dermatol, 25, 2015, 87-89
doi: 10.1684/ejd.2014.2477.
- 〔学会発表〕(計 15 件)
国際学会のみ記載
1. Miyagawa F, Asada H, Essential requirement for IRF7 in autoantibody production but not development of glomerulonephritis in murine lupus, The 76th Society for Investigative Dermatology, 2017
 2. Ommori R, Park K, Miyagawa F, Azukizawa H, Asada H, EGFR monoclonal antibodies and EGFR tyrosine kinase inhibitors have distinct effects on the keratinocyte innate immune response. The 76th Society for Investigative Dermatology, 2017
 3. Miyagawa F, Asada H, IRF7 and IRF8 have distinct effects on the pathogenesis of SLE, The 47th European Society for

- Dermatological Research, 2017
4. Miyashita K, Miyagawa F, Ommori R, Nakamura Y, Azukizawa H, Asada H, HHV-6-derived microRNAs in the serum/PBMC of DIHS/DRESS patients, The 47th European Society for Dermatological Research, 2017
 5. Miyashita K, Miyagawa F, Nakamura Y, Ommori R, Azukizawa H, Asada H, Association with serum/PBMC levels of HHV-6 miRNAs with clinical severity of DIHS/DRESS patients. The 42nd Japanese Society for Investigative Dermatology, 2017
 6. Shobatake C, Hirai T, Ogawa K, Miyagawa F, Azukizawa H, Asada H, Value of shear wave elastography (SWE) for differentiating epidermal cyst, lipoma, pilomatricoma, The 42nd Japanese Society for Investigative Dermatology, 2017
 7. Ommori R, Park K, Miyagawa F, Azukizawa H, Kanno M, Asada H, EGFR monoclonal antibodies and EGFR tyrosine kinase inhibitors have distinct effects on the keratinocyte innate immune response The 42nd Japanese Society for Investigative Dermatology, 2017
 8. Miyagawa F, Nakamura Y, Asada H, Preferential expression of CD134, an HHV-6 cellular receptor, on CD4 T cells in drug-induced hypersensitivity syndrome / drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms, The 75th Society for Investigative Dermatology, 2016
 9. Miyagawa F, Asada H, Essential requirement for Interferon regulatory factor 7 in autoantibody production but not development of nephritis in murine lupus, The 41st Japanese Society for Investigative Dermatology, 2016
 10. Miyashita K, Miyagawa F, Nakamura Y, Ommori R, Azukizawa H, Asada H, Up-regulation of HHV-6 microRNAs in the serum of DIHS/DRESS patients, The 41st Japanese Society for Investigative Dermatology, 2016
 11. Nakamura Y, Miyashita K, Ommori R, Miyagawa F, Azukizawa H, Asada H, The characteristics of patients with persistent HHV-6 infection after drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS), The 41st Japanese Society for Investigative Dermatology, 2016
 12. Shobatake C, Hirai T, Ogawa K, Miyagawa F, Azukizawa H, Asada H, The assessment of vascularity in subcutaneous tumors by ultrasonography, The 41st Japanese Society for Investigative Dermatology, 2016
 13. Miyagawa F, Asada H, Essential requirement for TRF7 in the production of autoantibodies in murine lupus, The 74th Society for Investigative Dermatology, 2015
 14. Miyagawa F, Nakamura Y, Asada H, Preferential expression of CD134, HHV-6 cellular receptor, on CD4 T cells in drug-induced hypersensitivity syndrome, The 40th Japanese Society for Investigative Dermatology, 2015
 15. Shobatake C, Miyagawa F, Fukumoto T, Hirai T, Kobayashi N, Asada H, Usefulness of ultrasonography for rapidly diagnosing cutaneous sinus tracts of dental origin, The 40th

Japanese Society for Investigative Dermatology, 2015

〔図書〕(計 1 件)
英文のみ記載

1. Miyagawa F, Katz SI, Graft Versus Host Disease (GVHD), Kenji Kabashima eds. Immunology of the Skin, Springer Japan, 2016, 429-449

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮川 史 (MIYAGAWA, Fumi)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00346024

(2)研究分担者

浅田秀夫 (ASADA, Hideo)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60252681