

令和元年6月11日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08740

研究課題名(和文)自己免疫性膵炎様病態自然発症マウスモデルを用いた病態制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms of autoimmune pancreatitis

研究代表者

柴田 健輔 (SHIBATA, Kensuke)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50529972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト自己免疫性膵炎様病態を自然発症するマウスモデルを用いた解析で、病原性T細胞サブセットを見出した。その後の解析でそのT細胞サブセットは、抗原提示分子MR1によって提示された代謝産物を認識する集団(以降MR1T細胞)であった。さらにヒト自己免疫性膵炎患者においてもMR1T細胞が病態と関連していた。このように本研究ではMR1T細胞が自己免疫疾患に関与すること、そしてその発症メカニズムの一端を明らかにした。今後さらにMR1T細胞による病態発症メカニズムを明らかにすることで、バイオマーカーとしての有用性やMR1T細胞をターゲットとした新規治療法の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、我々が独自に樹立したヒトIgG4関連疾患様病態自然発症マウスモデルを用いた臨床応用研究であり、極めて独創性が高く学術的意義は高い。また、ヒトIgG4関連疾患の病態を反映したバイオマーカーは未だ同定されておらず、今後の研究で我々が同定した病原性MR1T細胞のバイオマーカーとしての有効性が示されれば、世界初のIgG4関連疾患発症や再発を予測できる手法となることが期待され社会的ニーズも高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune diseases are frequently caused by pathogenic T cells, but identities of the pathogenic T cell subsets remain unclear. Here we established a mouse model in which spontaneously develops a fatal autoimmune disease with severe pancreatic inflammation accompanied by autoantibody deposition and B cell infiltration. We found that MR1-restricted T (MR1T) cells expanded in response to pancreas-derived autoantigens and genetic deletion of MR1T cells significantly prolonged their survival. The disease manifestations in mice recapitulated human autoimmune pancreatitis (AIP) and, frequency of activated MR1T cells was significantly enhanced in AIP patients. Thus, our study provides a novel insight into the mechanism of T cell-mediated autoimmune diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患 代謝産物 T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性膵炎(autoimmune pancreatitis) (以下 AIP と称する) は病理組織学的には膵管周囲を中心とする著名なリンパ球浸潤と繊維化を特徴とし膵臓の機能不全をもたらす。血清中では高 IgG 血症を認め膵臓組織特異的な自己抗体が産生される (Okazaki, et al., 2014)。B 細胞からの IgG の産生にはヘルパーCD4 陽性 T(Th)細胞からのシグナルが重要であると考えられている。実際 AIP の患者や polyI:C 誘導性 AIP マウスモデルを用いた解析から、膵管周囲に CD4 陽性 T 細胞の浸潤が認められること(Uchida, et al., 2000)、そして免疫抑制剤投与は病態の寛解と再発減少をもたらすことが報告されている(Kamisawa, et al., 2009; Schwaiger, et al., 2014)。また AIP 患者へのリツキシマブ投与による B 細胞の特異的除去により病態の改善が認められた(Hart, et al., 2013)。このように AIP の病態形成には CD4 陽性 T 細胞と自己抗体産生 B 細胞の関与が示唆されるが、それらが病態発症にどのように寄与しているのかは不明である。

我々は DN ステージの T 細胞分化機構を解析するため Rag1 プロモーター誘導性に Cre recombinase を発現するマウスと Bcl11b 遺伝子領域に LoxP 配列を挿入したマウスを交配させ、T 細胞分化を DN2a ステージで強制的に停止させたマウスを作出した(以下 Bcl11b^{DN2} マウスと称する) (Shibata, et al., 2014)。その Bcl11b^{DN2} マウスは、典型的 T 細胞は分化できないものの非典型的 T 細胞の分化を認めた。さらに当該マウスは、ヒト AIP 様の病態を自然発症し、その病態には T 細胞が必須であることを見出した。

2. 研究の目的

そこで本研究では、我々が樹立した AIP 用病態自然発症マウスモデル (Bcl11b^{DN2} マウス) を用いて病原性 T 細胞の同定と、病態発症分子メカニズムを明らかにする。さらに AIP 患者サンプルを用いてヒトにおける病原性 T 細胞の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 病原性 T 細胞の同定と機能制御機構の解明

Bcl11b^{DN2} マウス由来病原性 T 細胞の同定

T 細胞は認識抗原の違いにより、ペプチド認識を認識する典型的 T 細胞、脂質を認識する CD1 拘束性 T 細胞、代謝産物を認識する MR1 拘束性 T 細胞と T 細胞に分類される。Bcl11b^{DN2} マウスでは典型的 ab T 細胞は分化しないことから、その他の CD1 拘束性 T 細胞、MR1 拘束性 T 細胞と T 細胞の病態への関与が示唆された。そこで、まず Bcl11b^{DN2} マウスとの T 細胞もしくは T 細胞の二重欠損マウスを作成した。その結果、T 細胞存在下でのみ病態の改善(生存率の延長)を認めたことから、T 細胞が病原性細胞であることが明らかとなった。そこで次に、CD1 拘束性 T 細胞、MR1 拘束性 T 細胞いずれの細胞が存在するかを確認するため、CD1d tetramer もしくは MR1 tetramer (MBL 株式会社との共同研究)を用いて解析した。その結果、MR1 拘束性 T 細胞サブセットが炎症局所にて増加することを明らかにした。

RNA-seq 法による T 細胞の網羅的解析 (Repertoire Genesis 株式会社 (<http://www.repertoire.co.jp>)との共同研究)

T 細胞 T 細胞受容体 (以降 TCR と称する)レパトアの変化を網羅的に調べるため、発症後の Bcl11b^{DN2} マウスより脾臓および膵臓所属リンパ節を回収し次世代シーケンサーを用い

て TCR レパトア解析を行った。その結果、Bcl11b^{DN2} マウスにて特異的に頻度が増加するレパトアを同定した (Repertoire Genesis 株式会社松谷隆治との共同研究)。以上の結果から、何らかの抗原を認識して増殖している可能性が示唆された。

病原性 T 細胞の増殖メカニズムの解析

で得られた結果をさらに確認するため、脾臓ホモジネートを吸光度を指標に HPLC にて分画した。MR1 拘束性 T 細胞は抗原提示分子 MR1 と抗原との複合体を認識する。そこで発症した Bcl11b^{DN2} マウスから T 細胞に脾臓ホモジネート分画を加え、MR1 発現骨髄由来抗原提示細胞存在下および非存在下で培養後増殖能を指標に抗原活性を解析した。その結果、MR1 依存性に抗原活性を有する分画を同定した。

(2) 抗体の病原性と認識抗原の検討

自己抗体の解析

いくつかの T 細胞依存性の自己免疫疾患では、自己抗体の産生が認められる。実際我々が樹立したマウスモデルでも、7 週齢以降に血清中で IgG が高値を示していた。そこで、病態を発症した Bcl11b^{DN2} マウス由来の血清に脾臓ホモジネートに対して反応する自己抗体が存在しているかを Western blot 法にて検討した。そのために、B 細胞欠損マウスより脾臓ホモジネートを調整し実験に用いた。その結果、実際に病態を発症した Bcl11b^{DN2} マウス由来の血清でのみ脾臓を認識する自己抗体の存在が明らかとなった。そこで次に、それらの自己抗体が認識する分子の局在を調べるため、蛍光免疫染色法により解析した。その結果、炎症細胞浸潤や組織繊維化が認められる脾管周囲に自己抗体の沈着が認められた。したがって、自己抗体の病態への関与が示唆された。それらの自己抗体の産生は T 細胞欠損下で完全に認められなかったことから自己抗体の産生は T 細胞依存性に産生されることが示唆された。

自己抗体の病態への関与の解析

次に自己抗体の病態への関与を明らかにするため、Bcl11b^{DN2} マウスに B 細胞欠損マウス (μMT マウス) もしくは抗体産生に必須なサイトカインの IL-4 の欠損マウスと交配させた。その結果、抗体産生の欠損により生存率の延長は認められなかったことから、B 細胞は当該マウスの自己免疫疾患の発症に必須ではないことが明らかとなった。

(3) ヒト IgG4 関連疾患患者サンプルを用いた MR1 拘束性 ab T 細胞サブセットの解析

Bcl11b^{DN2} マウスの病態は、ヒト IgG4 関連疾患と類似していたことから、次に MR1T 細胞のその疾患への関与を調べることにした。そのために「ヒト IgG4 関連疾患における MR1T 細胞の関与とその病態解析」という課題で (既に九州大学臨床研究倫理審査委員会承認済み、許可番号: 29-209)、IgG4 関連疾患患者における MR1T 細胞の頻度や機能を調べた。その結果、Bcl11b^{DN2} マウスと同様、MR1T 細胞の頻度の上昇と活性化マーカー CD69 の発現上昇、そして Th2 サイトカインの産生亢進を認めた。

4. 研究成果

本研究では、世界に先駆けてヒト自己免疫性膵炎様病態を自然発症するマウスを樹立した。当該マウスを用いて病態に直接関わる T 細胞の同定に成功した。実際、自己免疫性膵炎患者

においてもその頻度が増加しており、ヒトにおいても病態への関与が示唆された。ヒト IgG4 関連疾患は 1995 年に Yoshida らによって提唱された日本初の自己免疫疾患で、近年その概念が世界的にも認められるようになり（日本臓器学会、自己免疫性膵炎診療ガイドライン 2013 参照）難治性疾患の一つに指定されその病態解明が進められてきた。ヒト IgG4 関連疾患患者に対する治療は主にステロイド療法が用いられるが、再燃を繰り返すことで膵臓の機能不全を引き起こし致命的となりうる。このように人類の生命を脅かす難病の一つであるにも関わらず、その予後を予測するマーカーは未だ開発されていない。したがって当該研究成果は、世界初のヒト IgG4 関連疾患に対する新たなバイオマーカーの開発につながることで期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Mondoorn Surenchimeg, Shibata Kensuke, Yoshikai Yasunobu

In vivo blockade of T cell development reveals alternative pathways for generation of intraepithelial lymphocytes in mice, Immunology Letters, 査読有、191、2017 年、40-46

〔学会発表〕(計 3 件)

柴田健輔、ヒト MAIT 細胞認識抗原の探索、日本免疫学会、2018 年

Kensuke Shibata、Innate-like T cells for health and disease、International conference of Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology、2017 年

柴田健輔、自己免疫疾患発症に関わる abT 細胞サブセットの同定と機能解析、京都 T cell conference、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：免疫細胞特異的活性化剤の発見

発明者：柴田健輔

権利者：国立大学法人 山口大学

種類：特許

番号：出願準備中

出願年：2019 年

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：山崎 晶、

ローマ字氏名：YAMASAKI, Sho、

研究協力者氏名：小川 佳宏

ローマ字氏名：OGAWA, Yoshihiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。