

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09890

研究課題名(和文) C57BL/6背景のSKGマウスを用いたSLEの病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of SLE using SKG mice on C57BL/6 background

研究代表者

橋本 求 (Hashimoto, Motomu)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：60512845

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、ZAP70 変異によるTCRシグナル伝達低下の結果、BALB/c背景下で関節炎を、C57BL/6 (B6) 背景下でSLEを発症するSKGマウスを用いて、SLEの病態解明を行った。B6背景のSKG (B6SKG) では、wild typeのB6やBALB/c背景のSKGなどと比較して、脾臓でB細胞の自己抗体産生をヘルプするfollicular helper T細胞(Tfh)が増大していた。B6SKGマウスでTfhが増大した分子メカニズムとして、B6背景ではBALB/c背景よりも樹状細胞上の補助刺激分子CD80/86とICOSLの発現が亢進しておりTfhへの分化がしやすいことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TCRシグナル伝達不全は、SLEをはじめとする膠原病で観察される遺伝子異常だが、それがどのようにしてSLEにつながるのかは不明であった。本研究の結果、TCRシグナル伝達不全による胸腺選択の異常で出現した自己反応性T細胞が、脾臓で自己抗体の産生をヘルプするfollicular helper T細胞(Tfh)へと分化することがSLE発症のカギとなり、Tfhへの分化にやCD80/86、ICOSLなどの補助刺激分子が関与していることが見出された。SLEにおいて、補助刺激分子やそれにより誘導されるfollicular helper T細胞の分化が治療ターゲットになることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we studied how defective T cell receptor (TCR) signaling, which is commonly observed in patients with SLE, leads to the development of SLE using an animal model. SKG mice, which develop autoimmune arthritis in a BALB/c background due to defective TCR signaling by ZAP70 mutation, developed SLE in the C57BL/6 (B6) background (B6SKG mice) with immune-complex deposition and anti-dsDNA antibody production. Follicular helper T cells (Tfh) that help germinal center formation were spontaneously expanded in B6SKG mice. Among the factors related to Tfh differentiation, the expression levels of co-stimulatory molecules (CD80/86, ICOSL) on DCs but not on B cells were specifically increased in wild-type B6 mice compared with BALB/c mice. Inhibition of co-stimulatory molecules suppressed Tfh development and lupus-like autoimmunity. Thus, defective TCR signaling leads to SLE development under the specific genetic background that facilitates Tfh development.

研究分野：リウマチ膠原病

キーワード：全身性エリテマトーデス T細胞シグナル伝達 濾胞性ヘルパーT細胞 補助刺激分子 自己抗体 動物モデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

T細胞レセプター(TCR)シグナルの伝達不全は全身性エリテマトーデス(SLE)にしばしば観察される遺伝子異常である。しかし、TCRシグナル伝達不全がどのようなメカニズムで全身性自己免疫疾患の発症に至るのかという分子メカニズムは明らかになっていない。

我々は、TCRシグナル伝達系の主要分子であるZAP70の変異により、BALB/c背景下で関節リウマチ(RA)に酷似した自己免疫性関節炎を起こすSKGマウスの遺伝的背景をC57BL/6背景にすると、SLEの病態を発症することを見出した(2014-2016科研費基盤C「C57BL/6背景のSKGマウスを用いたSLEの疾患モデルの構築」)。B6背景のSKGマウス(B6SKG)では、免疫複合体の沈着や抗DNA抗体の産生を伴う腎炎やその他の臓器の炎症が起き、SLE病態を呈する。本研究では、ZAP70変異によるTCRシグナル伝達不全が、T細胞のフェノタイプにどのような影響を与えて自己抗体の産生を伴う自己免疫疾患(SLE)の発症に至るのかを検討することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者らが樹立したSLEのモデル動物であるC57BL/6背景のSKGマウス(B6SKG)を用いて、TCRシグナル伝達不全がどのように自己抗体の産生を伴う全身性自己免疫疾患の発症につながるのか、という分子メカニズムを、動物モデルを用いて明らかにすることにある。

3. 研究の方法

(1) B6SKGマウスを用いて、T細胞のフェノタイプをwild typeマウス(B6WT)やBALB/c背景のSKGマウスなどと比較する。B細胞の抗体産生をヘルプするfollicular helper T細胞(Tfh)や、IL-17産生ヘルパーT細胞(Th17)細胞、制御性T細胞(Treg)、follicular regulatory T細胞(Tfr)などの割合や数、発現分子などを検討する。

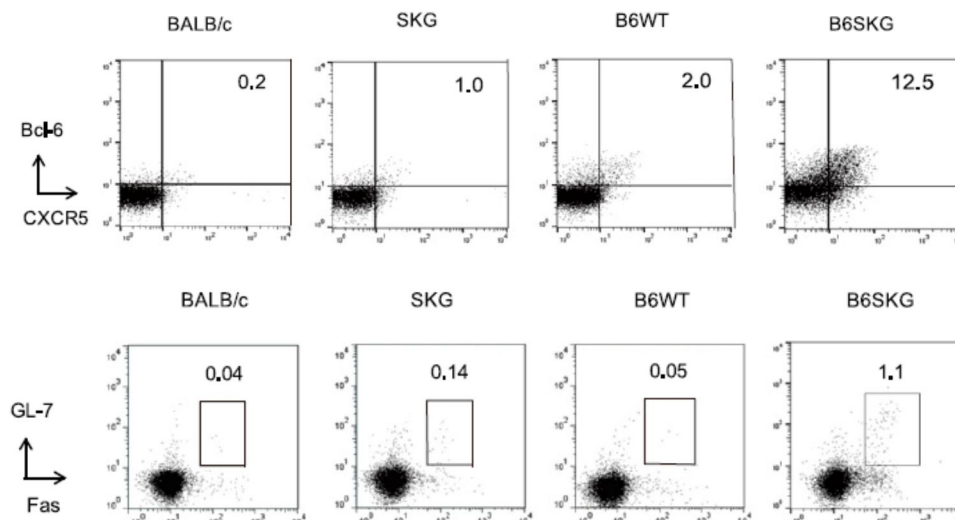
(2) B6SKGマウスのT細胞の異常が、B細胞分画にどのような影響を与えているのかを、Germinal center B細胞の増減や自己抗体、免疫複合体沈着性腎炎などのとの関わりで検討する。

(3) BALB/c背景よりもB6背景においてよりTfhの分化が促進するメカニズムについて、Tfhの分化にかかわる樹状細胞やB細胞のサイトカインや補助刺激分子に着目して、解析を行う。

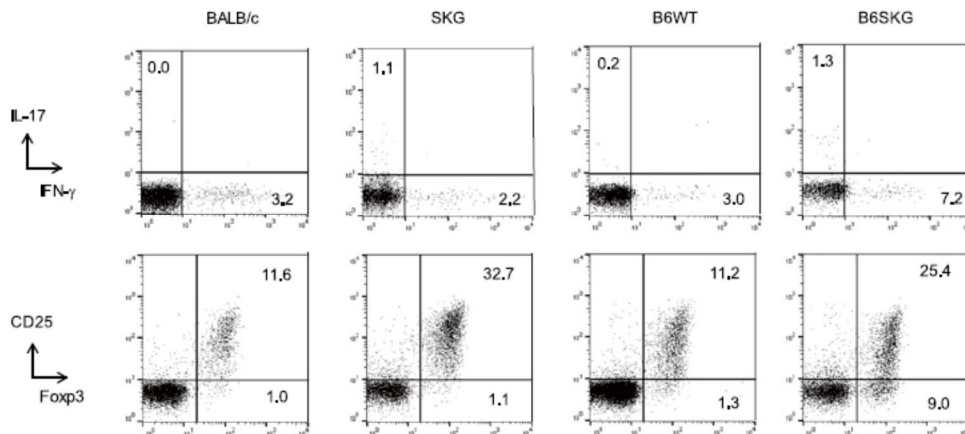
4. 研究成果

(1) ZAP70変化が胸腺におけるT細胞分化に及ぼす影響を検討した。ZAP70シグナルは胸腺分化のdouble negative3(DN3; CD25+CD44-)からdouble negative4(DN4; CD25-CD44-)への分化、およびdouble positive(DP)からsingle positive(SP)への分化に関係すると考えられるが、B6SKGマウスでは、DN3が増えてDN4が減り、DPが増えてCD4SPとCD8SPが減少していた。そのため、末梢では、B6SKGでは末梢でCD4T細胞のlymphopeniaをきたしており、それに対するhomeostatic proliferationの結果、自然とCD62+CD44-naïve T細胞が減少し、CD44lowCD62L-effector T細胞やCD44highCD62L-memory T細胞が増加していた。

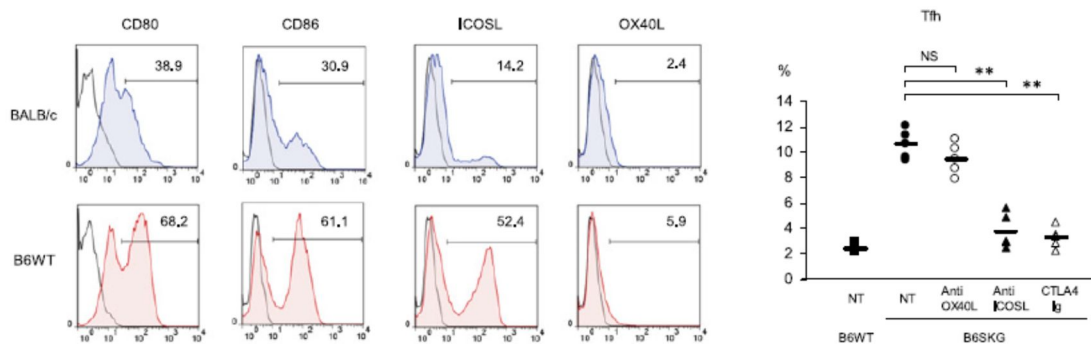
(2) B6SKGマウスの脾臓では、自己抗体の産生をヘルプfollicular helper T細胞(Tfh; CXCR5+Bcl6+ ICOS+ PD1^{high})が増大しており、CD4T細胞はTfhにかかわるIL-21mRNAを高発現していた。それに伴いB細胞も、Germinal Center B細胞(GC B CELL: AA4.1- Fas+ GL7+)が増加しており、B細胞のAICDA mRNAの発現も増加していた。また、B6SKGマウスにおいては、GC B細胞(Fas+GL7+)以外にも、Fas+GL7-のB細胞分画も増加していた。



- (3) 次に Tfh 以外の T 細胞サブセットについて検討した。B6SKG では、Th17 や Th1 細胞も wild type に比較して増多していた。一方、制御性 T 細胞 (Treg) については、B6SKG のほうが B6WT よりも増大していたが、B6SKG マウスの Treg では、Treg の機能分子である CD25 の発現が低下しており、制御性 T 細胞としての機能が低下している可能性が示唆された。Treg の中で特に Tfh の働きを抑える follicular regulatory T cell (Tfr : CXCR5+ Bcl6+ Foxp3+) についてみてみたところ、B6SKG では B6WT に比較して、その割合は増加していたが、絶対数としては B6WT と変わらなかった。また、Tfr についても、CD25 陽性の Tfr が減少し CD25 陰性 Tfr が逆に増加していた。



- (4) BALB/cSKG ではなく B6SKG マウスが SLE を発症した分子メカニズムの解明を行った。マウスで BALB/c よりも B6 背景において SLE を発症しやすさに理由として、いくつかのメカニズムが考えられる (T 細胞レパトワの違い、IFN-a 産生能の違い、自己抗体の Ig light chain の receptor editing の違いなど) が、本研究では B6SKG マウスで BALB/c に比較して Tfh の分化促進が認められたため、なぜ B6 背景において Tfh 分化が促進しやすいかについて検討をすすめた。そのために Wild type の BALB/c と B6 マウスを用いて、Tfh 分化にかかわる分子について比較することとした。Tfh 分化には、IL-6 や IL-21 などのサイトカインに加え、樹状細胞 (DC) や B 細胞上の CD80/86 や ICOSL、OX40L などの補助刺激分子が重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、wild type の BALB/c マウスと B6 マウスで Tfh の分化にかかわる因子を順に検討したところ、1) B6 では BALB/c よりも DC の数が多い。2) B6 と BALB/c では、DC の IL-6 産生には差がない。3) B6 では BALB/c よりも DC 上の補助刺激分子の内、CD80/86 と ICOSL の発現が高い。4) B 細胞上の補助刺激分子の発現には B6 と BALB/c で差がない。ということが見出された。そこで、B6SKG マウスに、CD80/86 や ICOSL をブロックする抗体を腹腔内投与すると、B6SKG マウスの Tfh 分化や抑制され、ループス腎炎の発症も抑制されることが分かった。以上より、補助刺激分子の発現亢進による Tfh の分化促進が、B6 背景の SKG マウスの SLE 発症の一因となっていることが示唆された。



- (5) 研究の過程で、B6SKG マウスの SLE 発症は、動物飼育施設によって大きく異なることが見出された。ある動物施設ではループス腎炎を自然発症するが、別の施設では自然発症せず polyI:C などの Toll like receptor アゴニストを投与し自然免疫刺激を加えたときのみ SLE を発症する。動物飼育施設による SLE 発症率の差の原因について、腸内細菌叢の関与を疑い B6SKG マウスを Germ Free 環境におくと、抗 DNA 抗体や抗核抗体などの自己抗体の産生は一部みられるものの、腎系球体への免疫複合体の沈着はなくなり、SLE を発症しなくなった。

これらのことから、SLEの発症には遺伝因子によって生じた自己反応性に加えて、腸内細菌叢という環境因子が関与していることが見出された。今後、B6SKGを用いて腸内細菌叢がSLE発症に与える影響について解析をすすめる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takashi Matsuo, Motomu Hashimoto, Shimon Sakaguchi, Noriko Sakaguchi, Yoshinaga Ito, Masaki Hikida, Tatsuaki Tsuruyama, Kaoru Sakai, Hideki Yokoi, Mirei Shirakashi, Masao Tanaka, Hiromu Ito, Hajime Yoshifuji, Koichiro Ohmura, Takao Fujii, and Tsuneyo Mimori	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Strain-specific manifestation of lupus-like systemic autoimmunity caused by ZAP70 mutation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1801159.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Motomu Hashimoto	4. 巻 3
2. 論文標題 Th17 in animal models of rheumatoid arthritis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 e000436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm6070073.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuo T, Hashimoto M, Ito I, Kubo T, Uozumi R, Furu M, Ito H, Fujii T, Tanaka M, Terao C, Kono H, Mori M, Hamaguchi M, Yamamoto W, Ohmura K, Morita S, Mimori T.	4. 巻 48
2. 論文標題 Interleukin-18 is associated with the presence of interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: a cross-sectional study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scand J Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 87-94.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03009742.2018.1477989.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka M, Watanabe H, Kondoh G, Tanaka A, Yasuda K, Kopf M, Potocnik AJ, Stockinger B, Sakaguchi N, Sakaguchi S.	4. 巻 48
2. 論文標題 Autoimmune Th17 Cells Induced Synovial Stromal and Innate Lymphoid Cell Secretion of the Cytokine GM-CSF to Initiate and Augment Autoimmune Arthritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunity.	6. 最初と最後の頁 1220-1232.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2018.04.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okabe N, Ohmura K, Katayama M, Akizuki S, Carpino N, Murakami K, Nakashima R, Hashimoto M, Imura Y, Yoshifuji H, Tanaka M, Mimori T.	4. 巻 28
2. 論文標題 Suppressor of TCR signaling-2 (STS-2) suppresses arthritis development in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 626-636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2017.1380249.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori M, Hashimoto M, Matsuo T, Fujii T, Furu M, Ito H, Yoshitomi H, Hirose J, Ito Y, Akizuki S, Nakashima R, Imura Y, Yukawa N, Yoshifuji H, Ohmura K, Mimori T.	4. 巻 27
2. 論文標題 Cell-contact-dependent activation of CD4(+) T cells by adhesion molecules on synovial fibroblasts.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 448-56.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2016.1220353.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 橋本求
2. 発表標題 リウマチ性疾患の動物モデル
3. 学会等名 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松尾崇史, 橋本求, 足田正喜, 坂井薫, 横井秀基, 伊藤能永, 森将人, 藤井隆夫, 坂口志文, 三森経世
2. 発表標題 TCR signalの異常とループス
3. 学会等名 第44回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 白柏魅玲 橋本求
2. 発表標題 TCRシグナル伝達不全によるdysbiosisを介したSLEの発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第6回日本リウマチ学会ベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白柏魅玲 橋本求
2. 発表標題 TCRシグナル異常が腸管免疫と自己免疫に与える影響
3. 学会等名 第40回日本炎症再生学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考