

令和元年6月10日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20438

研究課題名(和文)加齢による胚中心応答を介した免疫システム破綻機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the immune system failure mechanism via germinal center reaction by the aging

研究代表者

齋藤 雅子 (SAITO, Masako)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：00723892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗体産生機構に重要な役割を果たしている胚中心反応のシェーグレン症候群(Sjogren's syndrome; SS)病態への関与について解析を行った。SSモデルマウスの脾臓や頸部リンパ節では、Tfhや胚中心B細胞が増加しており、胚中心反応が亢進していることが示唆された。また、Tfh分化に重要な転写因子の1つであるAscl2がCD4陽性T細胞中で発現亢進しており、Tfhの過剰な分化に寄与している可能性を示した。また、SSモデルに抗CD20抗体を投与すると、胚中心領域の面積が縮小など、自己免疫病態の改善を認めた。以上より、胚中心反応の更新が、SSの病態増悪に寄与している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

使用するシェーグレン症候群(SS)モデルマウスは、加齢的に血清自己抗体価の上昇が認められるなど、その病態が、SS患者に極めて類似していることから、このモデルを用いることにより、ヒトSSでは解析が困難であった各種臓器・組織の病態形成機構に関して、直接的に疾患発症機構について解析を進めることができ、加齢に伴う自己免疫疾患の新たな発症機構を模索できる可能性が極めて高く、その学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the mechanism of the formation of autoimmune lesions in SS model mice. The population and cell number of CD4+CD62L-PD-1+ CXCR5+ Tfh cells were significantly higher in SS model mice than in control mice. In addition, the population and cell number of PNA+ GL-7+ CD19+ Germinal center (GC) B cells were significantly enhanced in SS model mice compared with control mice. The areas of expanded GC were significantly increased compared with those of control mice. Furthermore, GC in the spleen of anti-CD20 mAb-treated mice were considerably diminished compared with those of isotype control mAb-treated mice. These results suggest that anti-CD20 mAb treatment is effective on autoimmune lesions in SS model mice and that B cell depletion suppresses the GC reaction with a reduction of Tfh cells in these mice.

研究分野：免疫学

キーワード：シェーグレン症候群 加齢 胚中心 Tfh

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

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は、根本的治療法が確立されていない難治性疾患であり、その病因解明および根本的治療法の開発は社会的な課題となっている。自己免疫疾患の病態は、免疫恒常性の破綻により本来反応すべきでない自己抗原に対する免疫応答が生じることで、種々の自己反応性リンパ球や自己抗体が誘導されて組織障害を引き起こすことだが、その病因は多岐にわたり、遺伝的要因に加えて、加齢、ホルモン変化、栄養障害、肥満、感染症、ストレスなどの環境要因が、その発症や進展に深く関与するとされている。これまでの疫学調査からも、口腔乾燥症を主徴とするシェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome:SS) など多くの自己免疫疾患の罹患率が、加齢変化や性ホルモン変化に伴い増加していることから、HLAをはじめとした遺伝的因子に加えて生体内の環境因子が自己免疫疾患発症に多大な影響を及ぼしている可能性が高いと考えられる。加齢による免疫機能低下のメカニズムは、いまだ完全には明らかになっていないが、リンパ球の加齢変化が密接に関与していると考えられている。一つには、T細胞成熟の場である胸腺組織の萎縮に 관련된 T細胞の機能低下として説明されている。実際、加齢による自己免疫疾患の罹患率の増加と胸腺の萎縮の度合いはよく一致している。また、加齢変化に伴うB細胞と抗原との親和性の低下や、自己抗体の増加が知られている。B細胞からの抗原特異的な抗体産生の誘導には、二次リンパ組織内での胚中心反応が重要な働きをしていることが知られており、濾胞性T細胞 (Tfh)と胚中心B細胞が安定的に相互作用することで胚中心を形成し、効率良くB細胞の活性化と抗体産生を促すことができる。しかしながら、Tfhあるいは胚中心B細胞の機能異常により引き起こされる胚中心反応の過剰応答は、リンパ球の異常増殖や自己抗体の過剰産生を引き起こす可能性が極めて高い。近年では、多様な自己抗体が種々のヒト自己免疫疾患で発見されており、疾患の病因や病態形成に重要な役割を果たす可能性が報告されている。また遺伝子変異マウスモデルを用いた研究から、Tfhの制御異常が活発な胚中心反応と自己免疫病態発症に関与している可能性が示唆されてきている。しかしながら、加齢変化に伴う自己反応性の獲得および、自己反応性抗体の出現機構とその生理的・病理的役割については不明なままである。

2. 研究の目的

本研究では、加齢に伴った生体環境の変化による免疫寛容システムへの影響、自己反応性の獲得メカニズム及び自己免疫疾患発症機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

自己免疫疾患モデルにおける Tfh 細胞の割合・細胞数・機能の経時的变化の検討方法として、シェーグレン症候群疾患(SS)モデルマウスを用いて、経時的に二次リンパ組織内における Tfh 細胞(CD4⁺CD62L⁺CXCR5⁺PD-1⁺) の割合・細胞数をフローサイトメーターにて解析した。また、Tfh 細胞が活性化し機能が亢進している可能性を検討するために、Tfh 活性化の指標である Tfh 関連分子の発現量を Real-time PCR を用いて測定した。次に、自己免疫疾患モデルにおける、胚中心 B 細胞の割合・細胞数・胚中心反応の経時的变化の検討方法として、まず、リンパ濾胞内における胚中心形成が過剰でないかを詳細に検討するために、それらのマーカーである IgD, PNA を用いて免疫組織染色し評価した。また、胚中心 B 細胞の特異的なマーカー (CD19⁺ PNA⁺ GL7⁺) を用いて、胚中心 B 細胞の割合・細胞数をフローサイトメーターにて経時的に解析した。さらに、B 細胞に対する抗体産生誘導能を評価するために、Tfh 細胞と cognate B 細胞を共培養した後、その培養上清中に存在する自己抗体価 (抗 SS-A/Ro 抗体・抗 SS-B/La 抗体・ α -fodrin) を ELISA 法により検討した。

4. 研究成果

結果として、SS 病態を発症している SS モデルマウス (3 ヶ月齢) では、コントロールマウスと比較して、脾臓と頸部リンパ節のリンパ濾胞内における $CD4^+CD62L^-CXCR5^+PD-1^+Tfh$ 細胞の割合および細胞数の有意な増加が認められ、また、加齢変化に伴って Tfh 細胞が増加することを見出した (図 1)。次に、組織切片を用いた HE 染色の検討から、SS モデルマウス (3 ヶ月齢) では、コントロールマウスと比較して、リンパ節における濾胞形成が過剰であることが分かった。また、免疫組織染色の検討においても IgD^+PNA^+ の領域が広く、加えて、 $CD19^+PNA^+GL7^+$ 胚中心 B 細胞の割合・細胞数も顕著に増加していたことから、胚中心反応が亢進している可能性が高いことが示唆された (図 2)。さらに、SS モデルマウスでは、自己抗体価が (抗 SS-A/Ro 抗体、抗 SS-B/La 抗体、 α -fodrin 全てにおいて) コントロールマウスと比較して有意に高かった。以上の結果をもとにさらに詳細な検討を行った結果、SS モデルマウスでは、Tfh 分化に重要な転写因子である CXCR5 と *Asc12* が $CD4$ 陽性 T 細胞中で発現亢進していたことから、Tfh の過剰な分化にこれらの分子群が寄与している可能性が考えられた。治療ターゲットの検討として、 $CD20$ を発現する B 細胞を除く免疫抑制剤である抗 $CD20$ 抗体を SS モデルマウスの静脈内投与し、その効果を検討した結果、顎下腺導管周囲に浸潤する単核リンパ球数が有意に減少し、自己免疫病態の改善を認めたのに加えて、脾臓においては胚中心領域の面積が縮小し、Tfh や胚中心 B 細胞の有意な減少が認められた (図 3)。また、唾液腺における自己免疫病変の程度と Tfh の細胞数との間で有意に相関していたことから、Tfh が SS 病態増悪に寄与している可能性が示唆された。

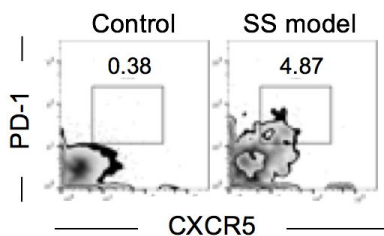


図 1

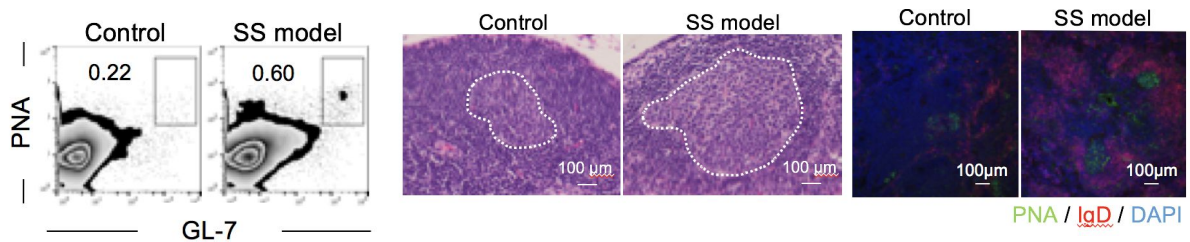


図 2

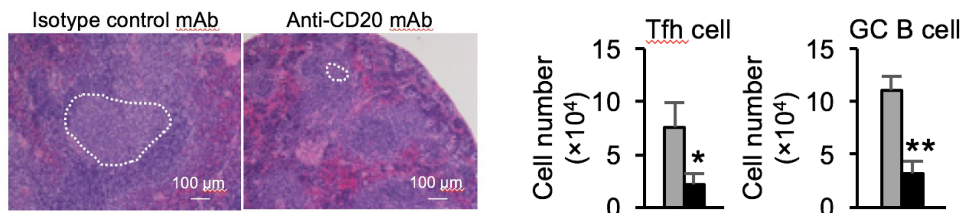


図 3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

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

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。