

令和 2 年 4 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：2017～2019

課題番号：17K09995

研究課題名(和文) 炎症性筋疾患におけるIL-21誘導性GM-CSF産生 T細胞の役割の解明

研究課題名(英文) Role of IL-21 in the development of autoimmune myositis

研究代表者

須藤 明 (Suto, Akira)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：50447306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：IL-21はヘルパーT細胞から産生され自己免疫疾患の発症に関与するが、自己免疫性筋炎の発症におけるIL-21の役割は不明であった。本研究者はIL-21の実験的自己免疫性筋炎における役割を検討し、IL-21欠損マウスでは筋肉へのGM-CSF産生 CX3CR1陽性 T細胞の浸潤が抑制され、筋炎発症が抑制されることを見出した。さらに、IL-21がCX3CL1のプロモーターを活性化させること、炎症性筋疾患患者では血清中IL-21濃度とCX3CL1濃度が有意に相関していることを見出した。以上より、IL-21-CX3CL1-T細胞-GM-CSF axisが筋炎発症に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は、炎症性筋疾患発症におけるIL-21の役割に着目していることである。本研究者は以前よりIL-21の産生機構、及び自己免疫疾患におけるIL-21の役割に関する研究に従事し、多くの実績を残している。本申請研究は、炎症性筋疾患モデルにIL-21が関与していることをIL-21欠損マウスを用いた研究で明らかにし、さらに炎症性筋疾患患者で血清中IL-21濃度が高いことを見出しており、炎症性筋疾患の病態にIL-21が関与していることが強く示唆される。本申請研究は、炎症性筋疾患の治療法の開発に繋がる可能性も高く、その臨床的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：IL-21 is involved in the development of various autoimmune diseases; however, the role of IL-21 in autoimmune inflammatory myopathies remains unknown. Here, we found that serum levels of IL-21 were significantly elevated in patients with inflammatory myopathies. Upon the induction of experimental autoimmune myositis (EAM), muscle weakness was less obvious in IL-21-deficient (IL-21^{-/-}) mice as compared to that in wild-type mice. GM-CSF from T cells was significantly reduced in EAM-induced IL-21^{-/-} mice. The severity of EAM was attenuated by GM-CSF neutralization or T cell-deficiency. Majority of muscle-infiltrating T cells expressed V₄V₄ TCR and exhibited CX3CR1high phenotype. The induction of Cx3cl1, a ligand for CX3CR1, in the muscles by EAM was reduced in IL-21^{-/-} mice. Taken together, these results suggest that IL-21 facilitates autoimmune myositis through the accumulation of GM-CSF-producing V₄V₄ cells in the muscles possibly via CX3CR1/CX3CL1 pathways.

研究分野：リウマチ学 免疫学

キーワード：IL-21

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の発症には、免疫寛容の破綻による自己反応性 T 細胞の活性化が関与する。自己免疫応答には、IL-23 により誘導され、IL-17,IL-21 を産生し自己免疫疾患を惹起する Th17 細胞と抑制性に機能する制御性 T(Treg)細胞との分化バランスが深く関与しており、IL-21 は Th17 細胞の自己増殖因子として機能し、自己免疫疾患の増悪に関与する。また IL-21 は、濾胞ヘルパー T 細胞(Tfh 細胞)からも産生され、B 細胞の形質細胞への分化、自己抗体の産生を誘導するとともに、CD8 陽性 T 細胞にも直接作用し、細胞傷害性の増強に関与している。本研究者は Treg 細胞を欠く Scurfy マウスの自己免疫病態に IL-21 産生 c-Maf 陽性 CD4 陽性 T 細胞が関与していること(Arthritis Rheumatol 2014)を明らかにした。一方、Sharma らは、scurfy マウスのリンパ節の細胞を T 細胞と B 細胞を欠く RAG 欠損マウスの筋肉内に移入すると、対称性の筋障害、皮膚病変、および自己免疫性肺傷害が惹起され、皮膚筋炎様の病態を呈することを報告している(J Autoimmun 2007)。Scurfy マウス由来の CD4 陽性 T 細胞が IL-21 を多量に産生するという本研究者の研究結果と合わせると、炎症性筋疾患の発症に IL-21 が関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

そこで本申請研究では炎症性筋疾患における IL-21 の役割を明らかにし、炎症性筋疾患に対する治療の基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 筋炎モデルにおける IL-21- $\gamma\delta$ T 細胞-GM-CSF axis の役割

(1-1) 実験的自己免疫性筋炎における IL-21 の役割の解明

マウスをミオシンと完全フロイントアジュバンドで週 1 回計 3 回免疫する事により 100%のマウスで自己免疫性筋炎が誘導されることが報告されている(Allenbach Y, Am J Pathol. 2009)。本研究では IL-21 欠損マウス及び野生型マウスに実験的自己免疫性筋炎を誘導し、a-1)筋力評価、a-2) 下肢近位筋の組織学的スコア、a-3) 筋肉への炎症細胞浸潤と所属リンパ節の T 細胞分画とサイトカイン産生を解析した。

(1-2) 実験的自己免疫性筋炎における $\gamma\delta$ T 細胞の役割の解明

上記研究計画 1.1)の予備実験にて、実験的自己免疫性筋炎を惹起した IL-21 欠損マウスにおいて、野生型マウスを比較して GM-CSF 産生 $\gamma\delta$ T 細胞が有意に減少していることを見出した。そこで実験的自己免疫性筋炎における $\gamma\delta$ T 細胞の役割を解明するために、TCR δ 欠損マウスの実験的自己免疫性筋炎の発症を検討した。

(1-3) 実験的自己免疫性筋炎における GM-CSF の役割の解明

実験的自己免疫性筋炎をマウスに誘導する際に GM-CSF の中和抗体を投与し、筋炎の発症に対する影響を上記研究計画 1.1)と同様の方法で解析した。

4) IL-21 による GM-CSF 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の誘導機構の解明

脾臓や皮膚より単離した $\gamma\delta$ T 細胞を IL-21 で刺激することにより、IL-21 が直接 GM-CSF 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の分化を誘導するか否かを検討した。

(2) GM-CSF 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の筋集積機構の解析

筋内の GM-CSF 産生 $\gamma\delta$ T 細胞に発現するケモカイン受容体をフローサイトメーターで解析し、GM-CSF 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の筋集積機構を解析した。

(3) GM-CSF 産生 $\gamma\delta$ T 細胞における GM-CSF 産生機構の解析

In vitro にて $\gamma\delta$ T 細胞を培養し、GM-CSF 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の分化制御機構を検討する

(4) 炎症性筋疾患患者における IL-21 や CX3CL1 の解析

炎症性筋疾患患者(多発性筋炎 + 皮膚筋炎)と健常人の血清中 IL-21 とケモカインの濃度を検討した。

4. 研究成果

(1) 筋炎モデルにおける IL-21- $\gamma\delta$ T 細胞-GM-CSF axis の役割

(1-1) 実験的自己免疫性筋炎における IL-21 の役割の解明:

IL-21 欠損マウス及び野生型マウスに実験的自己免疫性筋炎を誘導し、a-1)筋力評価、a-2) 下肢近位筋の組織学的スコア、a-3) 筋肉への炎症細胞浸潤と所属リンパ節の T 細胞分画とサイトカイン産生を解析した。その結果、実験的自己免疫性筋炎を誘導した IL-21 欠損マウスでは野生型マウスと比較して筋力低下が弱く、筋内の CD11b 陽性細胞の浸潤と GM-CSF 産生が有意に低下していることを見出した。さらに実験的自己免疫性筋炎における主要な GM-CSF 産生細胞は T 細胞であることを明らかにした。

(1-2) 実験的自己免疫性筋炎における $\gamma\delta$ T 細胞の役割の解明

TCR 欠損マウスおよび野生型マウスに実験的自己免疫性筋炎を惹起し、 $\gamma\delta$ T 細胞の実験的自己免疫性筋炎の発症に役割を検討した。その結果、TCR 欠損マウスでは有意に筋炎の発症が抑制されていることを見出した。さらに実験的自己免疫性筋炎を惹起した野生型マウスの筋肉内には特定の TCR レパトワ (V γ 4 陽性 V δ 4 陽性) の T 細胞が浸潤していることを見出した。

(1-3) 実験的自己免疫性筋炎における GM-CSF の役割の解明

実験的自己免疫性筋炎をマウスに誘導する際に GM-CSF の中和抗体を投与し、筋炎の発症に対する影響を上記研究計画 1.1)と同様の方法で解析した。その結果、GM-CSF の中和により筋炎の発症が抑制されることを見出した。

(1-4) IL-21 による GM-CSF 産生 T 細胞の誘導機構の解明

脾臓や皮膚より単離した $\gamma\delta$ T 細胞を IL-21 で刺激することにより、IL-21 が $\gamma\delta$ T 細胞から直接 GM-CSF 産生を誘導することを明らかにした。

(2) GM-CSF 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の筋集積機構の解析:

実験的自己免疫性筋炎を誘導した IL-21 欠損マウスおよび野生型マウスの筋内と所属リンパ節の $\gamma\delta$ T 細胞のケモカイン受容体の発現を網羅的に解析した。その結果、実験的自己免疫性筋炎を惹起したマウスの筋内の $\gamma\delta$ T 細胞は所属リンパ節と比較して CCR3, CCR6, CCR8, CXCR4, および CX3CR1 が高発現であった。さらに、IL-21 欠損マウスの筋浸潤 $\gamma\delta$ T 細胞の CX3CR1 の発現が野生型マウスと比較して有意に低下していることを見出した。これらの結果、IL-21 は CX3CR1 陽性 V γ 4 陽性 V δ 4 陽性 γ T 細胞の筋への浸潤を増強することにより自己免疫性筋炎の発症に関わっていることが示唆された。

(3) GM-CSF 産生 $\gamma\delta$ T 細胞における GM-CSF 産生機構の解析

CX3CR1陽性V γ 4陽性V δ 4陽性 γ T細胞の筋への浸潤の機序を明らかにするために、筋肉におけるケモカインの発現を検討した。その結果、CX3CR1のリガンドであるCX3CL1の発現が、実験的自己免疫性筋炎を誘導したIL-21欠損マウスで著しく低下していることを見出した。さらにレポーターアッセイにてIL-21がCX3CL1プロモーターを活性化することを見出した。これらの結果、IL-21はCX3CR1-CX3CL1パスウェイによりGM-CSF産生V γ 4陽性V δ 4陽性 γ T細胞の筋肉への浸潤を誘導することにより自己免疫性筋炎の発症に関わっていることが示唆された。

(4) 炎症性筋疾患患者における IL-21 や CX3CL1 の解析

最後に炎症性筋疾患患者の血清中の IL-21 および CX3CL1 の濃度を検討した。その結果、血清中 CX3CL1 濃度は IL-21 濃度と有意に相関しており、IL-21-CX3CL1 axis が炎症性筋疾患患者においても関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kubota A, Suto A, Suzuki K, Kobayashi Y, Nakajima H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Matrix metalloproteinase-12 produced by Ly6Clow macrophages prolongs the survival after myocardial infarction by preventing neutrophil influx.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Mol Cell Cardiol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yjmcc.2019.04.007.	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 Kato M, Ikeda K, Kageyama T, Kasuya T, Kumagai T, Furuya H, Furuta S, Tamachi T, Suto A, Suzuki K, Nakajima H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Successful Treatment for Refractory Interstitial Lung Disease and Pneumomediastinum With Multidisciplinary Therapy Including Tofacitinib in a Patient With Anti-MDA5 Antibody-Positive Dermatomyositis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/RHU.0000000000000984.	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 Tanaka S, Suto A, Iwamoto T, Kageyama T, Tamachi T, Takatori H, Suzuki K, Hirose K, Ohara O, Lefebvre V, Nakajima H.	4. 巻 215
2. 論文標題 Sox12 promotes T reg differentiation in the periphery during colitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Exp Med.	6. 最初と最後の頁 2509-2519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20172082.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Makita S, Takatori H, Tamachi T, Suto A, Suzuki K, Nakajima H.	4. 巻 67S
2. 論文標題 Analyses of dermal innate lymphoid cells in mice lacking T-bet and STAT6.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Allergol Int.	6. 最初と最後の頁 S51-S53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2018.05.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hosokawa Junichi, Suzuki Kotaro, Meguro Kazuyuki, Tanaka Shigeru, Maezawa Yuko, Suto Akira, Fujimura Lisa, Sakamoto Akemi, Clevers Hans, Ohara Osamu, Nakajima Hiroshi	4. 巻 140
2. 論文標題 I BNS enhances follicular helper T-cell differentiation and function downstream of ASC12	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 288 ~ 291.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2016.10.047	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 該当する

1. 著者名 Matsuki Ayako, Takatori Hiroaki, Makita Sohei, Yokota Masaya, Tamachi Tomohiro, Suto Akira, Suzuki Kotaro, Hirose Koichi, Nakajima Hiroshi	4. 巻 139
2. 論文標題 T-bet inhibits innate lymphoid cell-mediated eosinophilic airway inflammation by suppressing IL-9 production	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 1355 ~ 1367.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2016.08.022	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 Kageyama Takahiro, Suto Akira, Iwamoto Taro, Tanaka Shigeru, Suehiro Kenichi, Yokoyama Yusuke, Saku Aiko, Furuta Shunsuke, Ikeda Kei, Suzuki Kotaro, Hirose Koichi, Nakajima Hiroshi	4. 巻 1
2. 論文標題 IL-21 Exacerbates Autoimmune Myositis by Enhancing the Accumulation of GM-CSF-Producing T Cells in the Muscle	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 176 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1700053	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Shigeru Tanaka, Suto Akira, Takahiro Kageyama, Tomohiro Tamachi, Kotaro Suzuki, Koichi Hirose, and Hiroshi Nakajima.
2. 発表標題 TCR-mediated Sox12 induction promotes peripherally induced T regulatory cell differentiation under inflammatory conditions.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Suto A
2. 発表標題 Roles of Sox12 in the development of peripherally induced Treg cells.
3. 学会等名 The 2nd Chiba University - UC San Diego Symposium on Mucosal Immunology, (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学大学院医学研究院 アレルギー・臨床免疫学 研究業績 http://www.m.chiba-u.jp/dept/allergy-clin-immunol/research/
--

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
研究分担者	鈴木 浩太郎 (Suzuki Kotaro) (90554634)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	