

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06665

研究課題名(和文) SPA-1発現細胞を介した自己免疫疾患発症メカニズムの解析

研究課題名(英文) The mechanism of autoimmune disease pathogenesis mediated by SPA-1 expressing cells

研究代表者

井上 浄 (INOUE, Joe)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・特任准教授

研究者番号：00433714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患は免疫寛容の破綻により引き起こされる疾患の総称であり、発症の原因が未だ不明なものが多く難治指定されている疾患も多い。これまでに、Small Gタンパクの1つであるRap1の活性制御に関わるSPA-1遺伝子を欠損するマウス(SPA-1 KOマウス)が自己免疫疾患を発症することを明らかにしてきた。本研究では、NKT/MZ-B細胞バランスの変化が自己抗体価の上昇と関連することを明らかにし、また特にNKT1細胞とMZ-B細胞でSPA-1の発現が高いことを明らかにした。また、NKT細胞とMZ-B細胞の分化に重要なNotchシグナルとの関連が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患の原因の一つとして、Rapシグナルの異常によるNKT/MZ-B細胞バランスの不均衡というこれまでにない知見が得られた。またNKT細胞やMZ-B細胞でSPA-1が高発現していること、分化段階から発現が上昇していることが初めて明らかとなり、今後のNKT細胞、B細胞研究において重要な分化制御因子として多くの研究の対象となり得る。自己免疫疾患に対する分子標的としても有望であり、今後さらなる研究が期待される。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune diseases are the general term for diseases caused by the breakdown of immune tolerance, and many of them are designated as intractable diseases because the causes of their onset are still unknown. We have previously shown that mice lacking the SPA-1 gene (SPA-1 KO mice), which regulates the activity of Rap1, one of the Small G proteins, develop autoimmune diseases. In the present study, we found that changes in NKT/MZ-B cell balance were associated with increased autoantibody titers, and that SPA-1 expression was particularly high in NKT1 and MZ-B cells. The results strongly suggest that SPA-1 is associated with Notch signaling, which is important for NKT cell and MZ-B cell differentiation.

研究分野：免疫細胞生物学

キーワード：自己免疫疾患 SPA-1 NKT細胞 辺縁帯B細胞 Notch

1. 研究開始当初の背景

SLE に代表される多臓器発症性の自己免疫疾患は、発症の原因が未だ不明なものが多く難病指定されており、根治療法はもちろんのこと予防法についても未だ確立されていない。本疾患は、特に 20-40 代の女性において発症する傾向があり、その症状は神経疾患・関節疾患・多臓器疾患など症状は多岐にわたるため、著しく QOL を損なう全身性の疾患である。

自己免疫疾患の発症メカニズムについては非常に複雑で、これまでに多くの報告がある中、原因が未だ不明である疾患については一部 NKT/MZ-B 細胞バランスやこのバランスを制御する因子とその作用点の解析で明らかになる可能性がある。また特に NKT 細胞についてはその胸腺内分化や NKT1、NKT2、NKT17 といったサブセットへの分化異常と疾患との関連についてはほとんど知られていない。本研究は、NKT 細胞の分化における SPA-1 の作用点とその分化に必須な因子との関連を明らかにすることが可能になる研究である。加えて、NKT 細胞ノックアウトマウスを用いた多くの研究では、様々な自己免疫疾患が NKT 細胞により誘導されたり抑制されたりと、それぞれの特殊な疾患モデルにより異なった結果となっているのが現状である。本研究によって NKT 細胞サブセットと MZ-B 細胞のバランスを解析することで、多くの自己免疫疾患発症メカニズムが解明できる可能性がある。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、Small G タンパクの 1 つである Rap1 の活性制御に関わる SPA-1 遺伝子を欠損するマウス (SPA-1 KO マウス) が、SPF 環境の飼育下において、12 週齢という若齢から自己抗体産生を伴う自己免疫疾患症状を発症することを明らかにしてきた。驚くことに 12 週齢の脾臓において、外来抗原の刺激がない状況で活発な胚中心反応が認められ、24 週齢では非常に強い自己免疫応答が確認された。ところが若齢の SPA-1 KO マウスにおいて、胸腺における T 細胞分化に特に大きな変化は認められず、自己に反応する異常な T 細胞の増殖が原因ではないと考えられた。そこで次に、SPA-1 とともに GFP を発現する SPA-1 レポーターマウスを作成し、胸腺および脾臓における GFP 発現細胞の解析を行ったところ、T 細胞集団の中では NKT 細胞で高い発現が認められ、B 細胞集団の中では MZ-B 細胞において極めて高い発現が認められた。これらの結果から、次に SPA-1 KO マウスにおける各細胞の割合を確認したところ、NKT 細胞の減少と MZ-B 細胞の増加が認められた。以上の結果は SPA-1 KO マウスにおける自己免疫疾患発症の原因として、NKT 細胞の減少もしくは MZ-B 細胞の増加、もしくはその両方が関与する可能性を強く示唆するものである。

そこで本研究では、SPA-1 を高発現する NKT 細胞と MZ-B 細胞の割合の変化が自己免疫疾患を引き起こすかどうかについて、野生型マウスおよびリンパ球を欠損するマウスへの細胞移入により確認し、NKT/MZ-B 細胞バランスと自己免疫疾患の関連を明らかにする。また SPA-1 を介して NKT/MZ-B 細胞バランスへ影響する因子の同定を試みる。

3. 研究の方法

NKT/MZ-B 細胞バランスの変化と自己免疫疾患の発症との関連

野生型マウスから採取した脾臓から NKT 細胞および MZ-B 細胞のソーティングを行い、NKT/MZ-B 細胞の割合を変化させた細胞集団をリンパ球欠損マウスへ移入する。その後、自己抗体価を ELISA にて、脾臓における胚中心反応は凍結切片を用いた免疫染色ならびにフローサイトメーターで解析する。NKT/MZ-B 細胞バランスの変化と自己抗体産生、胚中心反応との関連を明らかにする。

NKT 細胞および MZ-B 細胞の分化における SPA-1 の作用点の解明

胸腺および脾臓中の NKT 細胞における SPA-1 発現について、図 3 に示す各ステージの NKT 細胞のソーティングを行い qPCR にて確認する。必要に応じて SPA-1 レポーターマウスを用い、各ステージにおける GFP 発現についてフローサイトメーターにて解析を行う。また同時に SPA-1 KO マウスにおける NKT 細胞のサブセット解析をフローサイトメーターで行い、NKT 細胞の分化における SPA-1 の作用点を明らかにする。MZ-B 細胞については骨髄および脾臓を用いて、NKT 細胞と同様の方法で解析を行う。

NKT/MZ-B 細胞バランスを制御する因子の同定

で明らかになる SPA-1 の作用点および最も影響を受けている NKT 細胞および MZ-B 細胞の分化ステージにおける分化誘導因子をピックアップし、両細胞でその発現が同時に上昇するもしくは減少する因子を同定する。

4 . 研究成果

NKT/MZ-B 細胞バランスの変化と自己免疫疾患の発症との関連

野生型および SPA-1 KO マウスから NKT/MZ-B 細胞を含む細胞集団をリンパ球欠損マウスへ移入した。その後、自己抗体価を ELISA にて確認したところ、SPA-1 KO マウス由来の細胞集団を移入したマウスでのみ自己抗体価の上昇が認められた。

NKT 細胞および MZ-B 細胞の分化における SPA-1 の作用点の解明

胸腺および脾臓中の NKT 細胞における SPA-1 発現について、SPA-1 レポーターマウスを用い各ステージの NKT 細胞における GFP 発現についてフローサイトメーターにて解析を行った。NKT1 細胞での発現が NKT2 および NKT17 細胞よりも高いことが明らかとなり、ステージ 1 においても NKT1 細胞へと分化する細胞集団においてより高い発現が見られた。さらに SPA-1KO マウスにおける NKT 細胞サブセットの割合について検討を行ったところ、野生型マウスと比較して、KO マウスにおける NKT1 細胞の割合が減少していることを明らかにした。

NKT/MZ-B 細胞バランスを制御する因子の同定

NKT/MZ-B 細胞バランスを制御する因子の候補として Notch が挙げられる。白血病細胞を用いた検討で、Rap シグナルが NKT 細胞や MZ-B 細胞の分化に重要な Notch シグナルを制御していることが明らかとなり、Rap シグナルを負に制御する SPA-1 との関連が強く示唆された。今後、NKT 細胞および MZ-B 細胞の分化ステージにおける Notch シグナルについて、より詳細な検討を進めていきたい。

以上、本研究では、NKT/MZ-B 細胞バランスの変化が自己抗体価の上昇と関連することを明らかにし、また特に NKT1 細胞と MZ-B 細胞で SPA-1 の発現が高いことを明らかにした。また、NKT 細胞と MZ-B 細胞の分化に重要な Notch シグナルとの関連が強く示唆された。

自己免疫疾患の原因の一つとして、Rap シグナルの異常による NKT/MZ-B 細胞バランスの不均衡というこれまでにない知見が得られた。また NKT 細胞や MZ-B 細胞で SPA-1 が高発現していること、分化段階から発現が上昇していることが初めて明らかとなり、今後の NKT 細胞、B 細胞研究において重要な分化制御因子として多くの研究の対象となり得る。自己免疫疾患に対する分子標的としても有望であり、今後さらなる研究が期待される。

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〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------