

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16701

研究課題名(和文)小胞輸送制御因子Arfを介したpathogenic Th17細胞制御機構の解明

研究課題名(英文)The role of Arf pathway in onset of Th17-mediated autoimmune disease.

研究代表者

住吉 麻実 (SUMIYOSHI, Mami)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：50779402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞特異的Arf1/Arf6二重欠損マウスを用いた解析により、ナイーブCD4+ T細胞移入大腸炎モデルにおいて、Arf/Arf6二重欠損細胞を移入したマウスではコントロールと比較して大腸炎が著しく抑制されていた。大腸炎などの自己免疫疾患は、pathogenic Th17細胞が関与していることが知られているため、Arf欠損がpathogenic Th17細胞の分化・生存に影響すると予想したが、いずれも異常は認められなかった。一方、Arf欠損ナイーブCD4+ T細胞はTCR刺激に伴いアポトーシスが亢進していた。また、多発性硬化症のモデルにおいても、Arf欠損に伴い病態が顕著に抑制されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究からは、Arf1とArf6は細胞内で異なる輸送経路を制御していると信じられてきたが、本研究により、Arf1とArf6が「TCR刺激におけるナイーブT細胞の生存維持」という特定の条件下では相補的に働くことが世界で初めて明らかとなった点に高い学術的意義がある。さらに、本研究を発展させることによりこれまで報告のなかったArfファミリーを介した小胞輸送制御とアポトーシス制御の関連を紐解くことに繋がる。加えて、Arf欠損に伴う自己免疫病態抑制の分子基盤が解明されるなら、自己免疫病態に対する新たな治療法開発に繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, we have revealed that the naive CD4+ T cells lacking both Arf1 and Arf6 failed to induce colitis in naive CD4+ T cell-induced colitis model, one of the widely used mouse models of inflammatory bowel disease. Considering that Th17 cells play a pivotal role in the pathogenesis of naive CD4+ T cell-induced colitis, one can argue that suppression of colitis could reflect the impaired ability of Arf1/6-deficient naive CD4+ T cells to differentiate or the defect in survival of Th17 cells. However, Arf1/6-deficient CD4+ T cells normally differentiated to pathogenic Th17 cells in vitro and pathogenic Th17 cells generated from Arf1/6-deficient CD4+ T cells survived to a level comparable to control in vivo. On the other hand, the lack of both Arf1 and Arf6 rendered naive T cells susceptible to apoptosis upon TCR stimulation. We also found that Arf1/6-deficient mice were completely resistant to induction of EAE, another type of Th17-mediated inflammatory disease of the CNS.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 自己免疫疾患 炎症性腸疾患 多発性硬化症 免疫応答 小胞輸送 ADP ribosylation factor

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ADP-ribosylation factor (Arf) ファミリーは、小胞輸送を制御する低分子量 G タンパク質であり、マウスでは Arf1-Arf6 の 6 つのアイソフォームが存在している。Arf 経路阻害剤である Brefeldin A は *in vitro* で T 細胞からのサイトカイン分泌阻害に用いられるが、全身性の Arf 欠損は胎生致死となるため、個体レベルの免疫応答において Arf 経路が果たす役割は不明であった。そこで、末梢 T 細胞で発現が高いことが示されていた Arf1 と Arf6 に着目し、T 細胞特異的 Arf1/Arf6 二重欠損マウス (以下、Arf1/6-KO マウス) を作製し、T 細胞における Arf 経路の生理的役割解明に取り組んだ。驚いたことに、Arf1/6-KO マウス由来 T 細胞のサイトカイン分泌能は正常であった。一方、ナイーブ CD4⁺ T 細胞移入大腸炎モデルを用いた解析から、T 細胞において Arf1 と Arf6 を欠損させるとコントロールと比較して大腸炎が抑制されることが明らかとなった。

2. 研究の目的

クローン病のマウスモデルとして知られているナイーブ CD4⁺ T 細胞移入大腸炎において、Arf1/6-KO マウス由来 T 細胞を移入したマウスは、コントロールと比較して大腸炎が著しく抑制されていた。クローン病に代表される自己免疫性大腸炎は、二種類存在する Th17 細胞のうち、pathogenic Th17 細胞が原因となって引き起こされることが知られている。実際、Arf 欠損 T 細胞を移入したマウスは大腸における Th17 細胞の割合が激減していた。一方、定常状態の Arf-TKO マウスの大腸を調べたところ、腸管の恒常性維持に関わる non-pathogenic Th17 細胞は野生型マウスと同程度に観察された。以上の結果は Arf が pathogenic Th17 細胞の分化や生存維持を特異的に制御することを強く示唆する。そこで本研究では、Arf 経路を介した pathogenic Th17 細胞の分化・維持機構という学術的「問い」に取り組む。さらに、多発性硬化症など pathogenic Th17 細胞の関与が知られる他の自己免疫疾患も含め、Arf 経路を標的とした自己免疫疾患の治療可能性についても検証する。

3. 研究の方法

(1) Pathogenic Th17 細胞における Arf 経路の役割解明

大腸炎モデルを用いた解析から、Arf 経路は pathogenic Th17 細胞の分化過程または分化した後の生存維持機過程のいずれか、もしくは両方に関与することが示唆されている。まずは pathogenic Th17 細胞への分化に関与しているか否かを明らかにするために、コントロールマウスと Arf1/6-KO マウスの末梢から単離したナイーブ CD4⁺ T 細胞を IL-6、IL-23、IL-1 β 共存下に培養することで、pathogenic Th17 細胞分化を誘導する。その後、細胞内サイトカイン染色法によって IL-17A⁺ 細胞の割合を比較する。

分化に異常が見られなかった場合は、Arf 経路が pathogenic Th17 細胞へと分化した後の生存維持に関与するかを明らかにする。具体的には、サイトカインによって pathogenic Th17 細胞へと分化誘導した Arf1/6-KO 細胞 (CD45.1⁻CD45.2⁺) とコントロール細胞 (CD45.1⁺CD45.2⁻) を 1:1 で混合した上でレシピエントマウスに移入し、数日後に CD45.1⁻CD45.2⁺細胞と CD45.1⁺CD45.2⁻細胞の割合を比較する。またこの時、炎症が誘導された環境における生存能を評価するために、レシピエントマウスは、あらかじめナイーブ CD4⁺ T 細胞 (RFP⁺) を移入することで大腸炎を誘導しておいた Rag2 欠損マウスを用いる。

(2) 自己免疫疾患の治療標的としての Arf 経路の有用性

Arf 欠損が大腸炎以外の自己免疫疾患の発症も抑制し得るのか、検証する。具体的には多発性硬化症のマウスモデルとして知られる実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の系を使用する。Arf1/6-KO マウス群・コントロールマウス群にそれぞれ結核死菌・百日咳毒素と共に MOG ペプチドを注射することで、EAE を誘導する。その後、経時的に麻痺の進行をスコアリングし、Arf 欠損によって EAE の病態に変化が認められるか否かを明らかにする。

4. 研究成果

(1) Pathogenic Th17 細胞における Arf 経路の役割解明

サイトカインによってナイーブ CD4⁺ T 細胞を pathogenic Th17 細胞へと分化を誘導した結果、Arf1/6-KO 細胞における IL-17A⁺ 細胞の割合はコントロール細胞よりもむしろ増加していた【図 1A】。このことから、Arf1/6-KO CD4⁺ T 細胞はコントロールと同等もしくはそれ以上の pathogenic Th17 細胞への分化能を有することが判明した。

次に、pathogenic Th17 細胞生存維持能を比較した。サイトカインによって pathogenic Th17 細胞へと分化誘導

した Arf1/6-KO 細胞 (CD45.1⁺CD45.2⁺) とコントロール細胞 (CD45.1⁺CD45.2⁻) を 1:1 で混合した上で、レシピエントマウス (あらかじめ RFP⁺ ナイーブ CD4⁺ T 細胞を移入して大腸炎を誘導した Rag2 欠損マウス) に移入した。7 日後に、レシピエントマウスの大腸粘膜固有層における RFP⁻ CD4⁺ T 細胞における CD45.1⁻CD45.2⁺ 細胞と CD45.1⁺CD45.2⁻ 細胞の割合を比較した結果、移入時 (DAY0) と同様に CD45.1⁻CD45.2⁺ 細胞と CD45.1⁺CD45.2⁻ 細胞の割合は 1:1 であった【図 1B】。この結果は、炎症環境における Arf1/6-KO pathogenic Th17 細胞の生存維持能はコントロールと同等であることを示唆する。

上述したように、Arf1/6-KO CD4⁺ T 細胞で予想していた pathogenic Th17 細胞の分化や生存維持の異常は見られなかった。そこで、当初の研究計画を変更し、pathogenic Th17 細胞へと分化が誘導される以前のステップである、『ナイーブ CD4⁺ T 細胞の活性化と増殖』に着目した解析を行った。T 細胞のホメオスタシス増殖は腸内細菌に反応することによる即時性の増殖と、IL-7 をはじめとするサイトカインによる遅延性の増殖に分類されることが知ら

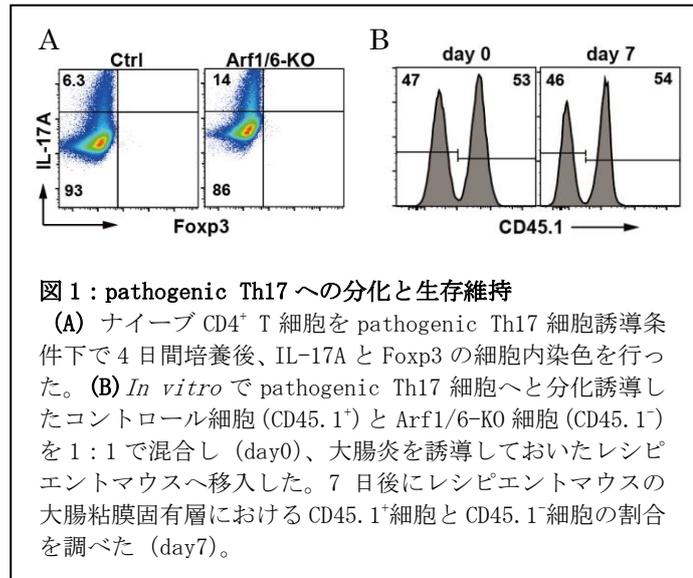


図 1 : pathogenic Th17 への分化と生存維持

(A) ナイーブ CD4⁺ T 細胞を pathogenic Th17 細胞誘導条件下で 4 日間培養後、IL-17A と Foxp3 の細胞内染色を行った。(B) *In vitro* で pathogenic Th17 細胞へと分化誘導したコントロール細胞 (CD45.1⁺) と Arf1/6-KO 細胞 (CD45.1⁺) を 1:1 で混合し (day0)、大腸炎を誘導しておいたレシピエントマウスへ移入した。7 日後にレシピエントマウスの大腸粘膜固有層における CD45.1⁺細胞と CD45.1⁻細胞の割合を調べた (day7)。

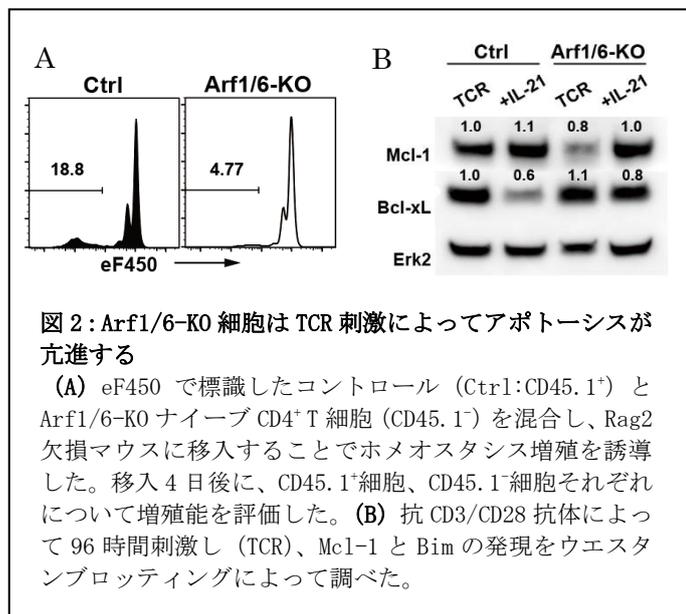


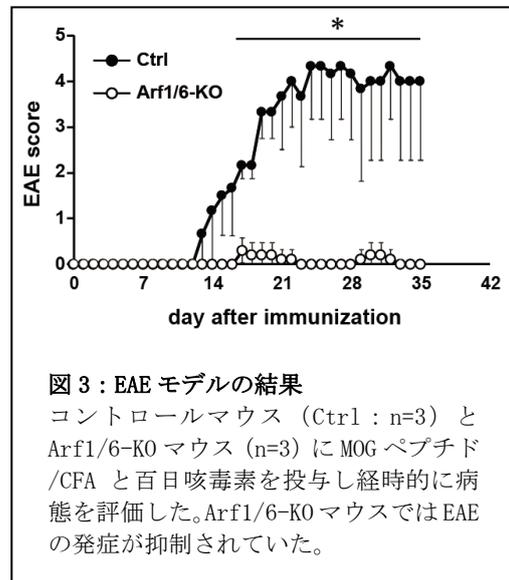
図 2 : Arf1/6-KO 細胞は TCR 刺激によってアポトーシスが亢進する

(A) eF450 で標識したコントロール (Ctrl:CD45.1⁺) と Arf1/6-KO ナイーブ CD4⁺ T 細胞 (CD45.1⁺) を混合し、Rag2 欠損マウスに移入することでホメオスタシス増殖を誘導した。移入 4 日後に、CD45.1⁺細胞、CD45.1⁻細胞それぞれについて増殖能を評価した。(B) 抗 CD3/CD28 抗体によって 96 時間刺激し (TCR)、Mcl-1 と Bim の発現をウエスタンブロットティングによって調べた。

れているが [1]、前者の腸内細菌に反応して増殖を行う細胞集団が Arf1/6 の欠損によってほとんど消失していた【図 2A】。加えて、コントロールマウスならびに Arf 欠損マウス由来のナイーブ CD4⁺ T 細胞を 1 : 1 で混合し、4 日間 TCR 刺激を加えた結果、活性化マーカーの発現や増殖能は正常であったものの、コントロールと比較して、Arf 欠損 T 細胞数の減少が認められた【データ未掲載】。これらの結果から、Arf1/6-KO ナーブ CD4⁺ T 細胞は TCR 刺激によって細胞死が亢進することが示唆された。そこで、アポトーシス関連因子である Bcl-2 ファミリーの発現を調べた結果、Arf1/6-KO 細胞では TCR 刺激によって抗アポトーシス因子である Mcl-1 の発現が低下する一方で、アポトーシス誘導因子である Bim の発現が上昇していることが明らかとなった【図 2B】。さらに、TCR 刺激時にカスパーゼ阻害剤 Z-VAD を添加すると Arf1/6-KO 細胞における細胞死が抑制された【データ未掲載】。これらの結果から、Arf 欠損ナイーブ CD4⁺ T 細胞では TCR 刺激に伴うアポトーシスが亢進しており、それが原因となって自己免疫疾患の抑制に繋がった可能性が考えられた。

(2) 自己免疫疾患の治療標的としての Arf 経路の有用性

当初の計画に従い、コントロールマウス群と Arf1/6-KO マウス群で EAE を誘導し、麻痺の進行をスコアリングした結果、図 3 で示すように Arf1/6-KO マウス群では EAE の発症が著しく抑制されていた。これにより、Arf1/6 を欠損することによって複数の自己免疫病態を抑制できることが明らかになった。全身性の Arf1 欠損マウスならびに Arf6 欠損マウスは、胎生致死の表現型を示すため [2, 3]、Arf 経路の阻害による自己免疫疾患治療は致命的な有害作用が生じることが危惧されるが、タモキシフェンによって任意の組織・時期で Arf を欠損することが可能なマウス (Arf1-f1/f1 : Arf6-f1/f1 : Cre-ER^{T2}) を用いて、成体マウスの全身で Arf1 と Arf6 の欠損を同時に誘導しても生存には問題なく、少なくとも観察した 4 週間は野生型マウスと同様に健康が保たれた【データ未掲載】。以上の結果は、Arf 経路が自己免疫疾患の治療標的として有望であることを強く示唆する。



<引用文献>

- [1] Kawabe, T. *et al. J. Immunol.* 190: 5788–5798. (2013)
- [2] Hayakawa, N. *et al. BBRC.* 453: 748–753. (2014)
- [3] Suzuki, T. *et al. Mol. Cell. Biol.* 26: 6149–6156. (2006)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sumiyoshi Mami, Kotani Yui, Ikuta Yuki, Suzue Kazutomo, Ozawa Madoka, Katakai Tomoya, Yamada Taketo, Abe Takaya, Bando Kana, Koyasu Shigeo, Kanaho Yasunori, Watanabe Toshio, Matsuda Satoshi	4. 巻 206
2. 論文標題 Arf1 and Arf6 Synergistically Maintain Survival of T Cells during Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 366 ~ 375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2000971	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 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 住吉 麻実
2. 発表標題 Th17関連疾患の発症におけArf経路の機能解明
3. 学会等名 KYOTO T CELL CONFERENCE
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 住吉 麻実
2. 発表標題 T細胞における低分子量Gタンパク質Arfの機能解明
3. 学会等名 日本消化器免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 住吉 麻実
2. 発表標題 Th17分化過程における低分子量Gタンパク質Arfの機能
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 住吉 麻実
2. 発表標題 The role of Arf pathway in onset of Th17-mediated autoimmune disease
3. 学会等名 日本免疫学会
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

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