

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17804

研究課題名(和文) Carma1 L815P-KIマウスにおける皮膚炎発症のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Hypomorphic CARD11 mutation developed inflammatory atopic disorders in mice

研究代表者

野元 裕輔 (Nomoto, Yusuke)

鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員

研究者番号：10781487

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)：CARD11 KIマウスはWTと比べ、IL-4の分泌が増加し、IL-17の分泌が低下していることが分かった。これは、CARD11 KIマウスがTh2型の状態になっている可能性を示唆している。パソジェネティックなT細胞に対し、その活性を抑えるTregの存在が減少することが皮膚炎の原因の可能性となっているのではないかと我々は推測した。Tregが皮膚炎の原因かどうかを調べるための骨髄キメラを用いた実験では、WT由来のTregがKI由来のパソジェネティックなT細胞の活性化を抑制している可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CARD11 KIマウスを用いた実験で、現段階でアトピー性皮膚炎を含む皮膚炎の原因の1つとして、Tregの関与が関わっている可能性を示唆した。また、最近の報告でアトピー性皮膚炎だけでなく、重症アトピー性皮膚炎様症状を示すOmenn症候群とCARD11の遺伝子異常との関連が示唆されており、そのような疾患に対しても今後研究が進むことで新薬の開発に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：T cells from diseased CARD11L815P mice produced higher IL-4 but not IFN- and IL-17A. Suggesting that T cells in KI mice were skewed to Th2 phenotype. Ratio of Tregs/eTregs was increased in diseased CARD11L815P mice. WT bone marrow-derived cells including Tregs inhibited the development of dermatitis and suppressed the development of KI-derived Tregs. We suggested that Treg deficiency is responsible for the disease development and KI-derived Tregs might contain pathogenic T cells responsible for skin inflammation.

研究分野：医歯学総合研究科 皮膚科学分野

キーワード：CARD11 atopic disorders Treg atopic dermatitis

## 1. 研究開始当初の背景

研究協力者の原らは、*Card11*<sup>-/-</sup>マウスを解析することで、CARD11 がリンパ球抗原受容体を介した NF- $\kappa$ B および JNK シグナルの活性化に必須の分子であることを見出した。そのため、*Card11*<sup>-/-</sup>マウスでは、リンパ球の活性化不全や低イムノグロブリン血症などの獲得免疫活性化不全を呈する。原らが作成した CARD11 点変異 (L815P) KI マウス (Hara et al. *Nat Commun.* 2015) は、*Card11*<sup>-/-</sup>マウスと同様の抗原受容体のシグナル障害と免疫不全の形質を示す一方で、ほぼ全てのマウスが、若年齢から *Card11*<sup>-/-</sup>マウスには見られない高 IgE や皮膚炎症状を発症することを我々は見出した。このことから、我々は、この KI マウスを Omenn 症候群自然発症モデルマウスと位置付け、このマウスの病態を詳細に解析することで、免疫不全を背景とする AD 様疾患の発症メカニズムを解明できると考え、本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

リンパ球活性化不全が背景となって発症する AD 様疾患の発症機構の解明が進まない要因は、患者数サンプルが限られ統合的解析が難しい、入手可能な動物モデルが存在しないなどであった。我々が作成した L815PKI マウスは世界で我々のみが保持している独自のマウスであり、その発症率はほぼ 100% であるため、このモデルマウスを用いて様々な免疫学的手法を駆使して解析を行えることは、発症メカニズムを解析する上で非常に有用な研究材料であるといえる。我々の研究により疾患発症の原因が突き止められれば、骨髄移植以外の治療法を開発する糸口になり、遺伝子診断によって発症リスクが高いと診断された場合の適切な処置や予防法を提示できる可能性がある。また、GWAS 解析で示唆された CARD11 と AD との関連に着目すれば、一般的な AD の発症機構においても新たな視点での理解を与え、アレルギー学の進展や新しい AD 治療薬の開発にも繋がる可能性が考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) 疾患病態の解析

AD 様皮膚炎やリンパ組織肥大の原因を突き止めるため、KI マウスの組織学的および免疫学的解析を行う。高 IgE、AD 様皮膚炎を発症した KI マウスの炎症皮膚組織を採取し、浸潤細胞の同定、抗体沈着、サイトカイン遺伝子の発現の解析を行い、炎症を構成する免疫応答の性質を同定する。また、末梢血や肥大した脾臓、リンパ節の白血球集団の FACS 解析、サイトカイン遺伝子発現、ヘルパー T 細胞 (Th1, 2, 17) の分化状態を解析し、病態形成の原因因子を探る。

### (2) 発症原因の解明

#### 骨髄キメラマウスの作製

まず最初に、疾患発症が骨髄系細胞の CARD11 異常によるものかを調べるため、野生型 (WT) マウスに KI マウスの骨髄、あるいはその逆の移植を行った骨髄キメラマウスを作製し、疾患発症 (血清 IgE、AD 様皮膚炎) のモニタリングを行う。この実験で発症原因が骨髄系細胞の異常と同定された場合、さらに以下の検討を行って原因究明を試みる。

#### ② 制御性 T 細胞 (Treg) 分化不全の影響の検証 (骨髄混合キメラマウスの作製)

Treg 分化不全は、IPEX 症候群に代表される自己免疫性炎症疾患の発症の原因になる。L815P-KI マウスでは、*Card11*<sup>-/-</sup>マウスと同様に、胸腺での Treg 分化不全により末梢 Treg 数が減少する (Hara et al.

*Nat Immunol.* 2015)。Treg 減少が発症の原因かを検証するため、リンパ球が欠損する Rag2-KO マウスをレシピエントとし、WT マウス (Ly5.1 コンジェニック) と KI マウス (Ly5.2 コンジェニック) 由来の骨髄を 1:1 で混合し、移植した混合骨髄キメラマウスを作製する。このマウスでは、WT 由来骨髄から Treg が正常に発生するため、仮に KI マウスと同様に疾患が発症すれば、Treg の関与は否定される。逆にもし発症しなければ、Treg 分化不全が発症の原因である可能性が濃厚となる。前者の結果となった場合、KI リンパ球細胞に intrinsic な原因で疾患が発生するものと判断される。

#### T細胞のトランスファー試験

KI 細胞における intrinsic な異常が発症原因となった場合、T細胞が欠損する pT KO マウスを利用し、下表に示したレシピエント、ドナーの組み合わせでナイーブ T 細胞のトランスファー実験を実施することで、T細胞あるいはそれ以外の細胞集団の発症への寄与を解析する。

表) T細胞の移入試験

移入 T 細胞	レシピエント	発症	結論
WT	pT -KO	しない	ネガティブコントロール
L815P-KI	pT -KO	する	T細胞が KI であることが原因
		しない	T細胞が KI だけでは不十分
移入なし	pT -KO/L815PKI	する	T細胞は発症に必要な
		しない	T細胞が発症に必要
WT	pT -KO/L815PKI	する	T細胞は必要だが KI である必要はない
		しない	T細胞が KI であることが必要
L815P-KI	pT -KO/L815PKI	する	ポジティブコントロール

本試験の結果、T細胞以外が原因となった場合、B細胞欠損マウスを用いた B細胞移入試験も将来的に検討する。

#### (3)抗原受容体シグナルの解析

mTOR は、mTORC1 と mTORC2 の 2 種類の複合体が知られるが、mTORC1 は Th1、Th17 の分化を、mTORC2 は Th2 の分化を促進することが報告されている (Delgoffe et al. *Nat Immunol.* 2011)。CARD11 遺伝子変異により重症 AD を発症した患者の T細胞では、NF- $\kappa$ B と mTORC1 経路の活性化不全が観察される (Ma et al. *Nat Genet.* 2017)。一方、B細胞では、mTOR 経路の部分的阻害がクラススイッチを促進するとの報告もある (Limon et al. *PNAS.* 2014)。そこで、KI マウスから調製したリンパ球を刺激した際の細胞内の mTORC1 (p-S6) および mTORC2 (p-Akt S473) 経路の活性化状態を、コントロール細胞 (WT および *Card11*<sup>-/-</sup>) と比較解析する。また、MAPK や NF- $\kappa$ B 経路の活性化解析も同時に行う。

#### (4)Th細胞分化の試験

KI マウスのヘルパー T 細胞は、TCR シグナルの異常により、IgE クラススイッチを促進する Th2 へと分化が偏向する性質を持つ可能性が疑われる。これを検証するため、WT、*Card11*<sup>-/-</sup>、KI マウスから単離したナイーブ T 細胞を、分化誘導サイトカインの存在下および非存在下で TCR 刺激 (CD3+CD28 抗体) を行って培養し、各 Th 細胞サブセット (Th1、Th2、Th17) への分化傾向を、サイトカイン FACS を用いて解析する。

#### 4. 研究成果

AD 様皮膚炎やリンパ組織肥大の原因を突き止めるため、WT、CARD11 KI マウスの脾臓、リンパ節を採取し、その白血球集団を ELISA、FACS 等を用いて分析した。その結果、CARD11 KI マウスは WT と比べ、IL-4 の分泌が増加し、IL-17 の分泌が低下していることが分かった。これは、

CARD11 KI マウスが Th2 型の状態になっている可能性を示唆している。また、CARD11 KI マウスにおいて、Treg の数が WT と比べて減少していることを確認し、さらに活性化した Treg (effector Treg: 以下 eTreg) の割合を調べたところ、WT と比較して活性化している eTreg の割合が減少していた。また、活性化した T 細胞 (effector memory T cell: 以下 TEM) の割合も同様に WT と比べて減少していた。さらに、TEM と eTreg の比率を WT と比べてたところ、KI マウスにおいて、TEM に対して、eTreg の割合が多い結果となった。さらに、Treg が皮膚炎の原因かどうかを調べるための骨髄キメラを用いた実験では、KI の骨髄細胞を移植したマウスではすべてのマウスで皮膚炎が発症したにもかかわらず、WT と KI の骨髄細胞を混合したミックスマウスでは、6 匹中 1 匹しか皮膚炎を発症しなかった。また、このミックスキメラにおいて、KI 由来の TEM の割合は、KI キメラと比べて減少していたが、一方で WT 由来の Treg は WT キメラの約 40%程度存在し機能を保っていた。このことから、WT 由来の Treg が KI 由来のパソジェネティックな T 細胞の活性化を抑制している可能性を示唆した。今後は、より革新的な事実に迫るために CARD11KI マウスに Treg を直接トランスファーする実験などを行うことで、Treg と AD 疾患との関連性を示すことができ、この機序で起こっていると予想される omenn 症候群などの一部の炎症皮膚疾患に対し、免疫学の進展や新しい AD 治療薬の開発にも繋がる可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 野元裕輔、安川晋輔、古江増隆、原 博満、金蔵拓郎
2. 発表標題 CARD11機能喪失型点変異マウスにおけるアトピー性疾患発症機構の解析
3. 学会等名 第71回日本皮膚科学会西部支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nomoto Y, Yasukawa S, Furue M, Hara H, Kanekura T
2. 発表標題 Analysis of the onset mechanism of atopic disorders in mice with a loss-of-function CARD11 mutation.
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nomoto Y, Yasukawa S, Furue M, Hara H, Kanekura T
2. 発表標題 Analysis of the onset mechanism of atopic disorders in mice with a loss-of-function CARD11 mutation.
3. 学会等名 第33回表皮細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nomoto Y, Yasukawa S, Lizasa E, Matsumoto S, Furue M, Kanekura T, Hara H
2. 発表標題 Hypomorphic CARD11 mutation developed inflammatory atopic disorders in mice.
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
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
---------	---------