

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(S)

研究期間：2008～2012

課題番号：20679005

研究課題名（和文）免疫系の恒常性維持および破綻機構の解明に基づく自己免疫疾患の治療法開発

研究課題名（英文）Establishment of autoimmune disease therapies based on the elucidation of target genes

研究代表者

安友 康二 (YASUTOMO KOJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：30333511

研究成果の概要（和文）：本研究では、自己免疫疾患の治療法を開発することを目指し、免疫系の調節機構を解明する事を研究目的とした。その結果、Notch シグナルが、細胞傷害性 T リンパ球分化、CD4 陽性 T リンパ球からの IL-22 産生、腸管マクロファージ分化、記憶 T リンパ球の維持に重要な役割を持つことを見いだした。さらに、PSMB8 の遺伝子変異に起因する新しい自己炎症性症候群を見いだすことに成功した。

研究成果の概要（英文）：We aim to reveal the molecular mechanisms to maintain immune homeostasis in order to establish therapeutic strategies for human immune-mediated disorders. We demonstrated the crucial roles of Notch signaling in cytotoxic T cells responses, IL-22 production from CD4+ T cells, the differentiation of macrophages in the small intestine and maintenance of memory T cells. Furthermore, we identified PSMB8 as a causative gene for a new type of autoinflammatory syndrome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	25,200,000	7,560,000	32,760,000
2009 年度	14,400,000	4,320,000	18,720,000
2010 年度	14,400,000	4,320,000	18,720,000
2011 年度	14,400,000	4,320,000	18,720,000
2012 年度	12,800,000	3,840,000	16,640,000
総計	81,200,000	24,360,000	105,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：自己免疫疾患、T 細胞、ゲノム解析、Notch

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は根本的治療法のない難病であり、自己免疫疾患の病因およびその治療法を開発することは社会的に急務の課題である。その課題克服のために、免疫系の活性化を調節する分子群ネットワーク機構を解明しその破綻機序を解明することは必須の方策である。また、自己免疫疾患の発症には遺伝的素因が深く関

与しており、遺伝学的視点からの研究は原因解明に大きく貢献できると考えられる。以上の背景から、本研究では、下記 2 に記載した 2 項目についての研究を実施することを計画した。

## 2. 研究の目的

本研究では二つの研究の目的を提案した。

**(1)Notch シグナルによる免疫調節**

我々は、Notch シグナルが、CD4 および CD8 陽性 T リンパ球で機能して細胞性免疫システムの活性化を促すことを世界に先駆けて発見してきた。(Nature 2000, Nature Immunol 2001, Immunity 2003, J Immunol 2004, J Immunol 2006)。また、T 前駆細胞に糖転移酵素である lunatic fringe が発現し、Notch の糖鎖修飾を制御することで T 前駆細胞が胸腺上皮に発現する適切なリガンドである Delta を選別して相互作用している機構を発見した(J Immunol 2006)。また、他の研究グループからは Notch シグナルが樹状細胞の分化にも役割を持っていることが報告された。しかし、Notch シグナルが免疫系の構築あるいは活性化に重要な役割を担っていることは明らかになりつつあるものの、Notch シグナルが自己免疫疾患に代表される免疫関連疾患の病態にどのように関与しているかについては不明である。我々はこれまでの研究で Notch リガンドである Jagged1 を DNA ワクチンとして生体内で発現させることでマウスコラーゲン誘導性関節リウマチモデルを著明に抑制することを解明した(J Immunol 2008)。これらの知見を基盤として、本申請では Notch シグナルが免疫系の構築・維持に関与する分子機構を明らかにし、Notch シグナルを修飾することによる免疫療法の開発研究を目的とする。

## (2) 免疫疾患の原因遺伝子同定研究

我々は SLE の遺伝子解析から、DNase1 の遺伝子異常が SLE の原因遺伝子の一つであることを発見した(Nature Genetics 2001)。さらに、非メチル化 DNA を認識する Toll の様受容体 9(TLR9) の一塩基多型が Treg 機能を抑制して SLE 発症に関与していることも見出した(Ann Rheumat Dis 2007)。SLE の原因は多因子であることが推測されているが、これまでの申請者らの研究からも明らかのように、単一遺伝子欠損によって惹起される SLE も存在する。このような単一遺伝子異常によって惹起される自己免疫疾患を解明することにより、自己免疫疾患の共通の発症基盤に迫ることが可能になると期待できる。これらの背景を基盤として、本研究では、自己免疫疾患のなかでもメンデル遺伝様式で発症し、遺伝的要因が濃厚である家族症例を対象とすることにより、単一遺伝子疾患の効果的なマッピング手法であるホモ接合体マッピング法やポジショナルクローニング法を適用し、表現型に大きく影響する同

祖由来の疾患遺伝子の探索を目標とする。特に、ホモ接合体マッピング法は、常染色体劣性疾患を有する近親婚家系において原因遺伝子を同定する強力な手法として確立され、少数の患者で新規疾患遺伝子を同定できることが特徴である。また、原因遺伝子が同定された場合には、その遺伝子異常が自己免疫疾患の発症にどのように関与するかについての機能解析研究を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) Notch シグナルによる免疫調節

Notch シグナルを欠損する RBP-J 欠損マウスあるいは Notch1 および Notch2 欠損マウスを用い、T リンパ球およびそれ以外の免疫担当細胞において、免疫系の恒常性維持あるいはその破綻についてどのように Notch シグナルが関与するかを個体レベルで明らかにする。用いたマウスは以下のマウスである。

- Rbpj<sup>flx/flx</sup> mouse
- Notch1<sup>flx/flx</sup> mouse
- Notch2<sup>flx/flx</sup> mouse
- Dll1<sup>flx/flx</sup> mouse
- Jagged1<sup>flx/flx</sup> mouse
- CD4-Cre transgenic mouse
- E81-Cre transgenic mouse
- CD11c-Cre transgenic mouse

### (2) 免疫疾患の原因遺伝子同定研究

遺伝性免疫疾患については、連鎖解析、ホモ接合体マッピング、エクソーム解析法により、原因遺伝子を同定する。原因遺伝子のその機能解析を遺伝子改変マウスの樹立を中心として実施する。

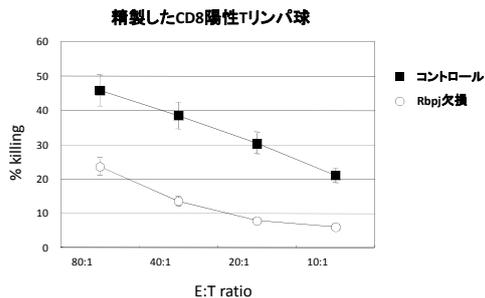
## 4. 研究成果

### (1) Notch シグナルによる免疫調節

a) Notch による細胞傷害性 T リンパ球調節  
Rbpj<sup>flx/flx</sup> あるいは Notch2<sup>flx/flx</sup> マウスを用いて、Rbpj あるいは Notch2 が CD8 陽性 T リンパ球で欠損するマウスを樹立したところ、Notch2 が欠損することで細胞傷害性 T リンパ球分化が顕著に低下する事を見いだした(図 1)(Nature Immunol 2008)。また、Notch2 は CREB1 と相互作用して細胞傷害活性の機能分子であるグランザイム B の転写を調節することも明らかにした。

Notch シグナルはNK 細胞の細胞傷害活性も制御していることを明らかにしていることから、Notch シグナルは免疫系に特異的な細胞機能である細胞鎖傷害活性を制御する極めて重要な刺激伝達系であることを解明した。リンパ球の過剰な細胞傷害活性は各種自己免疫疾患の最終エフェクターとして機能することから、Notch シグナルが自己免疫疾患の治療の一つの標的になり得ると考えられた。

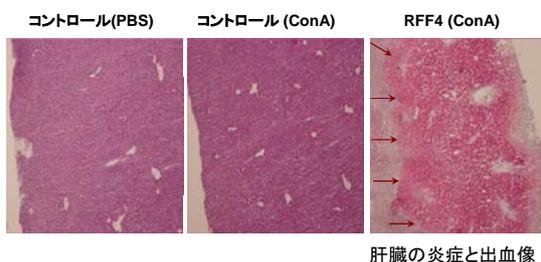
図1: Rbpjを欠損したCD8陽性Tリンパ球では細胞傷害活性が低下する



b) Notch による IL-22 発現調節

Tリンパ球で Rbpj が欠損するマウス(RFF4)由来の CD4 陽性 Tリンパ球では、抗原刺激後のインターロイキン(IL)-22 の発現が低下していた。その結果、IL-22 が抗炎症応答に寄与する ConA 肝炎の感受性が RFF4 マウスでは亢進した(図2; コントロールマウスでは肝炎を誘導できない ConA 投与量で、RFF4 マウスでは出血を伴う肝炎が誘導される)。

図2. RFF4マウスではConA誘導性肝炎の感受性が亢進する



RFF4 マウスに IL-22 を投与するとその感受性の亢進は消失したことから、その亢進には IL-22 の欠乏が関与していると考えられた。次に、どのようなメカニズムによって、Notch が IL-22 の発現を調節しているかを検討した。その結果、Notch シ

グナルは IL-22 の転写を直接制御しているのではなく、aryl hydrocarbon receptor を刺激する分子の発現に関与することを見いだした。そして、その刺激物質が IL-22 の発現には必要であることを明らかにした(Proc Natl Acad Sci USA 2010)。

c)Notch シグナルによる記憶 Tリンパ球調節

RFF4 マウスを OVA 抗原で免疫した場合、免疫後 7 日目に Tリンパ球の二次応答が観察されるが、免疫後 21 日ではほとんど二次応答が観察されなかった。その現象が、Tリンパ球の応答性の低下に依存するのか、Tリンパ球の数が減少するのかを知るために、RFF4 とコントロールマウスの Tリンパ球をレシピエントに移入した後の細胞の生存を検討した。その結果、RFF4 マウス由来の活性化した記憶細胞はコントロールと比較すると明らかに細胞の生存が短縮していた。また、その記憶細胞の生存には、細胞へのグルコースの取り込みが関与していることが推測された。

d)Notch による樹状細胞分化制御

Notch シグナルが樹状細胞分化を制御しているかを知るために、Rbpj<sup>flax/flax</sup> マウスと CD11c-Cre トランスジェニックマウスを交配して、CD11c 陽性細胞で Rbpj が欠損するマウス(RFF11)を樹立した。RFF11 マウスでは、CX<sub>3</sub>CR1 を発現する腸管のマクロファージが欠損することを見いだした。同じ欠損は、Notch1 と Notch2 をともに欠損させたマウスでも観察されたことから、Notch1 と Notch2 がその分化を調節していることが推測された。

e) Arnt シグナルによる腸管免疫制御

Notch シグナルは IL-22 を産生することを見いだしたが、過去の報告では Ahr も IL-22 の産生を制御している事が示されている。そこで、Ahr の結合分子である Arnt がどのように IL-22 産生と腸管免疫を制御するかを解析した。その結果、Arnt は IL-22 の産生には直接的には関係しないことが明らかになった。しかし、Arnt が Tリンパ球で欠損したマウスでは、腸管上皮間リンパ球の一つである TCRαβCD8αα 細胞が 10%程度まで低下していることを見いだした。また、その低下には Arnt による Stat3 の発現調節が必須であることも明らかにした(Nature Commun 2013 in press)。

## (2) 免疫疾患の原因遺伝子同定研究

我々は、本研究期間に免疫系の異常により発症すると考えられる遺伝性疾患のゲノムサンプルを集めてきた。その結果、発熱、結節性紅斑、脂肪萎縮を特徴とする疾患群を見いだした。本疾患は、近親婚家系に発症し、我々は同様の症状を呈する2家系を見いだした。

罹患者の血清所見では CRP が強陽性、高  $\gamma$  グロブリン血症が特徴で、自己抗体は検出されなかった。また補体の低下も観察されなかった。皮膚生検所見では、皮下への著明な細胞浸潤が観察され、筋生検では筋細胞への封入対の形成が認められた。以上の臨床的および検査学的特徴から、本疾患は自己炎症性疾患であると考えられ、我々は JASL と名付けた。本疾患で観察される臨床的特徴はこれまで報告されている自己炎症性疾患とはことなることから、これまで知られている自己炎症性疾患とは異なるメカニズムによって、発症していると考えられた。以上の理由から、我々は、本疾患の原因遺伝子同定研究に取り組んだ。

まず、連鎖解析を Merlin program を用いて実施した。二家系の罹患者、健常人のゲノムサンプルを用いて解析を実施したところ、6番染色体に候補領域が存在することが見いだされた。本疾患は、近親婚家系に発症することから、常染色体劣性遺伝形式であると考えられる。そこで、次にホモ接合体マッピングを行い、罹患者でホモ接合体になっている領域を拾い上げた。その結果、ホモ接合体マッピングでも、連鎖解析と同様に6番染色体に候補領域があると考えられた。ハプロタイプ解析によって最終的に領域を狭小化し、6番染色体の6.8Mbの領域に候補変異があると考えられた。

次に、その候補領域に焦点を絞った超高速シーケンサーを用いたエクソーム解析を行った。得られた変異から、既に明らかになっている頻度の高い変異、ヘテロ変異等を除外し、最終的に候補領域上に2個の変異を見いだすに至った。その一つは健常人を検索したところ、100人のうち2人に同様の変異があったことから、稀な変異ではないと考えられた。もう一つの変異は、PSMB8のエクソン5に存在していた。

PSMB8は免疫プロテアソームを構成するサブユニットであり、 $\beta 5i$ タンパクをつくる。 $\beta 5i$ はキモト

リプシン様活性を持ち、免疫プロテアソーム機能を制御する。まず、本変異がタンパク発現に影響を与えるかを検討したところ、変異  $\beta 5i$  の発現は著明に低下していることが明らかになり、本変異によって  $\beta 5i$  発現が低下する事が解明された。罹患者の皮膚でも  $\beta 5i$  の発現は健常な皮膚と比較すると低下していた。

免疫プロテアソームはユビキチンタンパクを分解する活性があるため、罹患者の細胞ではユビキチンタンパクの蓄積が観察された。また、罹患者の細胞では  $\beta 5i$  が調節するキモトリプシン様活性が低下していることが明らかになった。以上から、本変異によって、免疫プロテアソーム活性が低下すると考えられた。そのメカニズムを知るために、免疫プロテアソーム分子集合について検討した。その結果、罹患者の細胞では免疫プロテアソーム中間体が増加していることが明らかになり、変異  $\beta 5i$  により免疫プロテアソームの分子集合が障害されていると考えられた。

次に、変異  $\beta 5i$  がどのようなメカニズムによって炎症応答を誘導しているかについて検討した。まず、罹患者の皮膚 IL-6 発現を検討したところ、IL6 mRNA は著明に増加していることが観察された。どうように罹患者由来の B 細胞でも IL6 は発現増加していた。その B 細胞での IL6 発現増加は、正常  $\beta 5i$  を遺伝子導入することによって、低下したことから、変異  $\beta 5i$  によって誘導されている IL6 であることが明らかになった。また、IL6 誘導は p38 阻害剤によって抑制された。

JASL の特徴的所見の一つは脂肪萎縮症である。罹患者の脂肪萎縮は炎症応答を抑制できるステロイドの量では抑制ができない事から、炎症応答に付随する症状ではないと考えられた。まず、脂肪前駆細胞である 3T3-L1 細胞の Psm8 遺伝子を RNAi によって抑制したところ、脂肪細胞への分化が障害された。さらに、マウス皮下に Psm8 に対する siRNA を注入したところ、マウス皮下脂肪層が減少した。以上から、Psm8 は脂肪細胞分化を調節する因子であり、その機能不全により JASL では脂肪萎縮症がみとめられていると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 16 件)

すべて査読有り

- (1) Nakajima K, Maekawa Y, Kataoka K, Ishifune C, Nishida J, Arimochi H, Kitamura A, Yoshimoto T, Tomita S, Nagahiro S, Yasutomo K. The ARNT-STAT3 axis regulates the differentiation of intestinal intraepithelial TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> cells. *Nature Communications* (2013) in press
- (2) Lian G, Arimochi H, Kitamura A, Nishida J, Li S, Kishihara K, Maekawa Y, Yasutomo K. Manipulation of CD98 resolves type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 188:2227-34 (2012)  
doi: 10.4049/jimmunol.1102586
- (3) Iwahashi S, Maekawa Y, Nishida J, Ishifune C, Kitamura A, Arimochi H, Kataoko K, Chiba S, Shimada M, Yasutomo K. Notch2 regulates the development of marginal zone B cells through Fos. *Biochem Biophys Res Commun* 418:701-707 (2012)  
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.082
- (4) Kuramoto T, Goto H, Mitsuhashi A, Tabata S, Ogawa H, Uehara H, Sijo A, Kakiuchi S, Maekawa, Yasutomo K, Hanibuchi M, Akiyama SI, Sone S, Nishioka Y. Dll4-Fc, an inhibitor of Dll4-Notch signaling, suppresses liver metastasis of small cell lung cancer cells through the downregulation of the NF-kappa-B activity. *Mol Cancer Ther* 11:2578-2587 (2012)  
doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0640
- (5) Kitamura A, Maekawa Y, Uehara H, Izumi K, Kawachi I, Nishizawa M, Toyoshima Y, Takahashi H, Standley DM, Tanaka K, Hamazaki J, Murata S, Obara K, Toyoshima I, Yasutomo K. A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. *J Clin Invest* 121:4150-4160 (2011)  
doi: 10.1172/JCI58414
- (6) Xu M, Morishima N, Mizoguchi I, Chiba Y, Fujita K, Kuroda M, Iwakura Y, Cua DJ, Yasutomo K, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Regulation of the development of acute hepatitis by IL-23 through IL-22 and IL-17 production. *Eur J Immunol* 41:2828-2839 (2011)  
doi: 10.1002/eji.201141291
- (7) Okamoto M, Takeda K, Lucas JJ, Joetham A, Yasutomo K, Gelfand EW. Low-dose lipopolysaccharide affects lung allergic responses by regulating Jagged1 expression on antigen-pulsed dendritic Cells. *Int Arch Allergy Immunol* 157:65-72 (2011)  
doi: 10.1159/000324836
- (8) Ishifune C, Maekawa Y, Nishida J, Kitamura A, Tanigaki K, Yagita H, Yasutomo K. Notch signaling regulates the development of a novel type of Thy1-expressing dendritic cell in the thymus. *Eur J Immunol* 41:1309-1320 (2011)  
doi: 10.1002/eji.201041159
- (9) Sakata-Yanagimoto M, Sakai T, Miyake Y, Saito T, Maruyama H, Morishita Y, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Yagita H, Fukayama M, Ogawa S, Kurokawa M, Yasutomo K, Chiba S. Notch2 signaling is required for proper mast cell distribution and mucosal immunity in the intestine. *Blood* 117:128-134 (2011)  
doi: 10.1182/blood-2010-07-289611
- (10) Alam MS, Maekawa Y, Kitamura A, Tanigaki K, Yoshimoto T, Kishihara K, Yasutomo K. Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4<sup>+</sup> T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:5943-5948 (2010)  
doi: 10.1073/pnas.0911755107
- (11) Sugimoto K, Maekawa Y, Kitamura A, Nishida J, Koyanagi A, Yagita H, Kojima H, Chiba S, Shimada M, Yasutomo K. Notch2 signaling is required for potent anti-tumor immunity in vivo. *J Immunol* 184:4673-4678 (2010)  
doi: 10.4049/jimmunol.0903661

- (12) Nishimoto K, Kochi Y, Ikari K, Yamamoto K, Suzuki A, Shimane K, Nakamura Y, Yano K, Iikuni N, Tsukahara S, Kamatani N, Okamoto H, Kaneko H, Kawaguchi Y, Hara M, Toyama Y, Horiuchi T, Tao K, Yasutomo K, Hamada D, Yasui N, Inoue H, Itakura M, Yamanaka H, Momohara S. Association study of TRAF1-C5 polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Japanese. *Ann Rheum Dis* 69:368-373 (2010)  
doi: 10.1136/ard.2008.104315
- (13) Okamoto M, Matsuda H, Lucas JL, Domenico J, Yasutomo K, Takeda K, Gelfand EW. Jagged1 on dendritic cells and Notch on CD4+ T cells initiate lung allergic responsiveness by inducing IL-4 production. *J Immunol* 183:2995-3003 (2009)  
doi: 10.4049/jimmunol.0900692
- (14) Haraguchi K, Suzuki T, Koyama N, Kumano K, Nakahara F, Matsumoto A, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Masuda S, Takahashi T, Kamijo A, Takahashi K, Takanashi M, Okuyama Y, Yasutomo K, Sakano S, Yagita H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Notch activation induces the generation of functional natural killer cells from human cord blood CD34-positive cells devoid of interleukin-15. *J Immunol* 182:6168-6178 (2009)  
doi: 10.4049/jimmunol.0803036
- (15) Kijima M, Iwata A, Maekawa Y, Uehara H, Izumi K, Kitamura A, Yagita H, Chiba S, Shiota H, Yasutomo K. Jagged1 suppresses collagen-induced arthritis by indirectly providing a negative signal in CD8+ T cells. *J Immunol* 182:3566-3572 (2009) doi: 10.4049/jimmunol.0803765
- (16) Maekawa Y, Minato Y, Ishifune C, Kurihara T, Kitamura A, Kojima H, Yagita H, Sakata-Yanagimoto M, Saito T, Taniuchi I, Chiba S, Sone S, Yasutomo K. Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nature Immunology* 9:1140-1147 (2008)

doi: 10.1038/ni.1649

[学会発表] (計 63 件)

- (1) 安友康二、免疫プロテアソーム機能異常による炎症応答の分子基盤、日本生化学学会シンポジウム(2012年12月14日、福岡国際会議場、福岡県)
- (2) Koji Yasutomo, Notch provides metabolic signals in memory CD4+ T cells、日本免疫学会シンポジウム (2012年12月2日、神戸国際会議場、兵庫県)
- 等 他 61 件

[その他]

ホームページ;

<http://immunology.hosp.med.tokushima-u.ac.jp/immunology/system/top/index.php>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

安友康二 (YASUTOMO KOJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号:30333511