

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08804

研究課題名(和文) Fli-1によるケモカインを介したSLEの病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Role of transcription factor Fli-1 in chemokine expression and SLE pathogenesis for development of novel therapies

研究代表者

佐藤 秀三 (Shuzo, Sato)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20535231

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)：我々は転写因子Fli-1におけるCXCL13を介したループス様腎炎の制御機構を検討した。その結果、血中CXCL13濃度及び腎組織におけるCXCL13 mRNA発現がFli-1+/- (ヘテロ、Fli-1発現が半減) MRL/lprマウスで有意に減少していた。腎組織染色にてCXCL13陽性細胞、CXCR5 (CXCL13レセプター) 陽性細胞浸潤が有意に減少していた。蛍光免疫染色にて3次リンパ様組織(TLS)を中心にCXCL13/CD11b陽性細胞数の減少、RT-PCRにて転写因子Sox4 mRNAの有意な発現減少も判明した。Fli-1減少によるCXCL13発現制御によりループス様腎炎の改善が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ループス腎炎は全身性エリテマトーデス(SLE)に合併する最も頻度の高い臓器病変であり、SLEの予後を左右する重要な因子であるにも関わらず、未だ難治例の克服が問題となっている。転写因子Fli-1はサイトカイン、ケモカイン発現制御によってループス腎炎における炎症に関与しており、今回の研究でFli-1がCXCL13やSox4発現にも重要な役割を果たすことが判明した。Fli-1をはじめとした転写因子を制御することにより、すなわちドラッグリポジショニングや新規薬剤などの開発によりSLE治療へのさらなる貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Previous reports have shown that transcription factor Fli-1 regulates cytokine/chemokine expression in lupus nephritis. This study aims to elucidate association between Fli-1 and CXCL13 expression, a chemokine which attracts B cells and promotes ectopic lymphoid structures (TLS). Adult Fli-1+/- (heterozygote) MRL/lpr mice showed reduced serum CXCL13 levels and reduced mRNA expression of CXCL13 and Sox4 in the kidney compared to wild-type (WT) littermates. The CXCL13-positive and CXCR5-positive immune cells were also reduced in Fli-1+/- mice. Immunofluorescence microscopy showed reduced CXCL13/CD11b double positive cells, indicates reduced CXCL13 positive monocytes infiltration in TLS lesion of the kidney. Taken together, Fli-1 affects CXCL13 and Sox4 expression in the kidney, which may influence the severity of lupus-like nephritis in MRL/lpr mice. Fli-1 inhibition could be a novel target for treating lupus nephritis and SLE.

研究分野：リウマチ膠原病内科

キーワード：ループス腎炎 Fli-1 ケモカイン CXCL13 ループスモデルマウス SLE 転写因子

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (SLE) は原因不明の自己免疫疾患で、自己抗体を産生し免疫複合体を介して全身に慢性的な炎症が起こり、様々な臓器に障害を起こす。腎障害 (ループス腎炎) は比較的多く出現し、ループス腎炎の進行によって末期腎不全となり、時に予後不良な経過をたどる。SLE 病態、病状の進行には様々な因子が関与しておりまだ不明な点が多いが、炎症性サイトカイン、ケモカインの異常産生が重要な役割を果たしている。これらは転写因子等様々な因子により制御を受けているが、その一つに転写因子 Fli-1 があり、Ets ファミリーに属する。Ets 蛋白はコンセンサス GGA(A/T) 配列に結合し、転写の活性化因子として機能する。主に免疫細胞や線維芽細胞、血管内皮細胞に発現しており、ヒトにおいても様々な腫瘍 (Ewing 肉腫や白血病、一部の固形腫瘍) や自己免疫疾患 (SLE、強皮症など) への関与がこれまでに報告され、多彩な作用を持つ。Fli-1 発現は SLE の病態に関与しており、ヒトでは活動性のある SLE 患者の末梢リンパ球において Fli-1 mRNA の発現が増加していた。最近の研究で SLE 再燃に Fli-1 が関与していることも判明している。マウスモデルでは、ループスモデルマウス (MRL/lpr、NZM2410 マウス) において、遺伝子改変技術により Fli-1 発現を減少 (Fli-1 ヘテロ: +/-) させるとループス様腎炎が軽減し、生存率が著明に延長する (一方、Fli-1^{-/-} は胎生致死となる)。また、Fli-1 を過剰発現させたマウスはループス様腎炎を発症した。Fli-1 抑制は T 細胞や B 細胞、マクロファージや樹状細胞の発生及びその機能に大きな影響をもたらす。申請者らは Fli-1 におけるサイトカイン、ケモカイン制御についてこのマウスモデルを使用して解析してきた。しかしながら、Fli-1 によるサイトカイン・ケモカインを介したループス腎炎制御における具体的な機序についてまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

ケモカインである CXCL13 は、CXC ケモカインで B 細胞の走化性因子であり、組織へのリンパ球浸潤に関与している。自己免疫にも関連しており、リンパ組織の濾胞中心を形成するのに不可欠で、SLE の病態形成 (局所でのリンパ濾胞形成、節外の三次リンパ様組織: TLS 形成) にも関与している。実際、CXCL13 或いはそのレセプターである CXCR5 欠損マウスではリンパ濾胞形成が阻害される。全身性強皮症や SLE ですでに CXCL13 の関与が報告され、疾患活動性に関連している。ループス腎炎では実際に CXCL13 及びそのレセプターである CXCR5 の発現亢進が認められる。しかし、SLE 病態への CXCL13 の関与について、Fli-1 との関連性を含め詳細な機序は不明である。本研究の目的は、Fli-1 抑制を介してどのように CXCL13 発現に影響を与え、それによってループス腎炎の病態が細胞内及び腎組織で実際にどのようなメカニズムによって制御されるのか、ということである。

3. 研究の方法

本研究は、以下の方法により Fli-1 と CXCL13 における関連性について検討した。

Fli-1^{+/-} MRL/lpr マウスを用いたループス様腎炎での CXCL13 発現

- 成マウス (4 ヶ月齢以上) の血清 (尿) における CXCL13 濃度を、ELISA 法を用いて野生型 (WT) 及び Fli-1^{+/-} マウス 2 群で比較検討する。抗 DNA 抗体や腎機能についても検索した。また、若年マウスにも発現上昇がみられるかどうか、8 週程度のマウスでも 2 群間比較を行った。

腎組織における CXCL13 発現と mRNA の抽出、CXCL13 及びその関連分子の発現比較

- ループス様腎炎における実際の CXCL13 発現の影響をみるため、腎組織の H&E 染色や免疫組織染色 (CXCL13 および CXCR5 陽性細胞、CXCR5 は CXCL13 のレセプターである) を行い CXCL13 発現細胞について検討した。腎組織における発現細胞を、TLS を含んだランダムな視野でカウントし、合計細胞数を 2 群間で比較検討した。

- 蛍光免疫染色を用い、CD11b 陽性単球と CXCL13 による二重染色を行い、CXCL13 産生単球の浸潤について、腎皮質や TLS 領域を中心にランダム視野で細胞数をカウントし、合計細胞数を 2 群間で比較した。

- 腎組織 (WT および Fli-1^{+/-} MRL/lpr マウス) より mRNA を抽出、cDNA 作成後にリアルタイム (RT)-PCR 等を行い、Fli-1 抑制による CXCL13 mRNA 発現あるいはそのレセプターである CXCR5 mRNA 発現への影響を検討した。また、Sox4 などの関連分子における発現についても検討した。

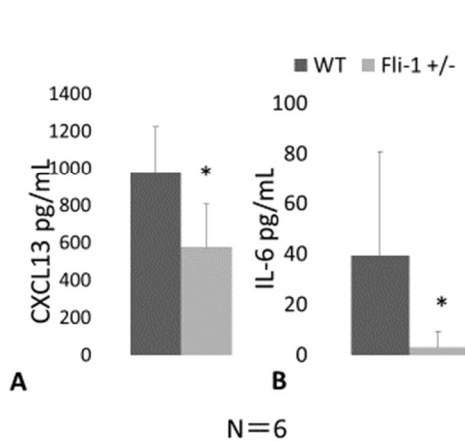
4. 研究成果

・ Fli-1^{+/-}MRL/lpr マウスにおいて、血中 CXCL13 濃度、及び腎組織における CXCL13 mRNA 発現が WT マウスに比して有意に減少していることが確認された(図 1 A-C)。

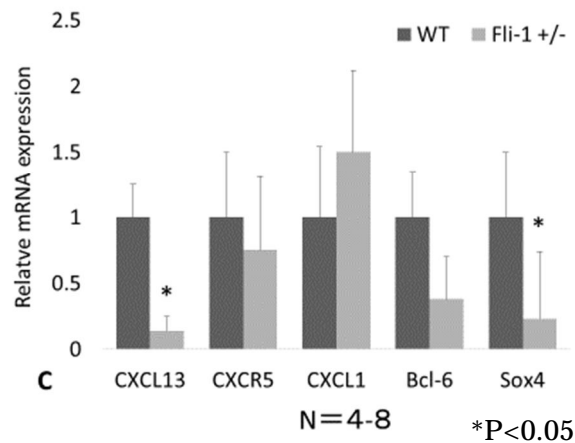
一方若年マウスでは血中 CXCL13 濃度や CXCL13 mRNA 発現に差はなかったが、CXCR5 mRNA のみ低下していた。

図 1 において、転写因子 Sox4 mRNA の有意な発現減少も認められた(図 1C)。Sox4 は B 化において重要な転写因子であり、腎におけるリンパ球浸潤への関与が示唆される。

MRL/lprマウスにおけるCXCL13 血中濃度 (6-8ヶ月齢)



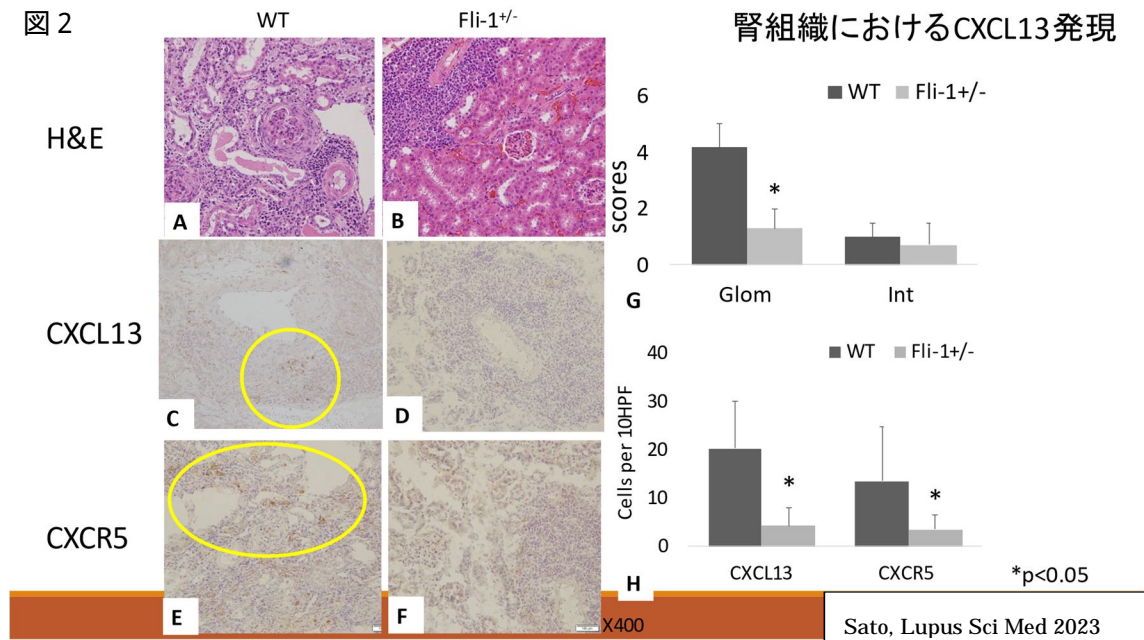
腎組織におけるCXCL13等のmRNA発現



・ 腎組織染色においては、CXCL13 陽性細胞、CXCR5 陽性細胞浸潤が有意に減少していた。一方糸球体病変は WT マウスで顕著(高スコア)であったが、間質への炎症細胞浸潤自体は両群で差がなかった(図 2)。

・ 蛍光免疫染色にて腎における 3 次リンパ様組織(TLS)を中心に CXCL13/CD11b 陽性細胞の有意な減少も認められた。さらに、糸球体病変(スコア)と CXCL13/CD11b 細胞浸潤には正の相関が認められ、関連性が示唆された。

図 2



結論として、転写因子 Fli-1 はループス腎炎における CXCL13 発現、腎組織における炎症細胞浸潤に顕著な影響を与え、炎症病態を制御していることが示唆された。

一連の研究成果は、アメリカリウマチ学会 ACR convergence 2022 及び英国の雑誌 Lupus Science & Medicine 誌に発表した (Lupus Sci Med. 2023 Apr;10(1):e000870. doi: 10.1136/lupus-2022-000870.)

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Shuzo, Zhang Xian K, Matsuoka Naoki, Sumichika Yuya, Saito Kenji, Yoshida Shuhei, Matsumoto Haruki, Temmoku Jumpei, Fujita Yuya, Asano Tomoyuki, Migita Kiyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Transcription factor Fli-1 impacts the expression of CXCL13 and regulates immune cell infiltration into the kidney in MRL/lpr mouse	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Lupus Science & Medicine	6. 最初と最後の頁 e000870 ~ e000870
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/lupus-2022-000870	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sato S, Zhang X, Matsuoka N, Sumichika Y, Saito K, Yoshida S, Matsumoto H, Temmoku J, Fujita Y, Asano T, Watanabe H, Migita K.
2. 発表標題 Transcription Factor Fli-1 Impacts CXCL13 Expression and Renal Inflammation in Lupus-like Nephritis of Adult MRL/lpr Mouse
3. 学会等名 ACR convergence 2022（国際学会）
4. 発表年 2022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
研究分担者	鬼澤 道夫 (Onizawa Michio) (30783352)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
研究分担者	渡辺 浩志 (Watanabe Hiroshi) (40336467)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	
研究分担者	右田 清志 (Migita Kiyoshi) (60264214)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

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
---------	---------