

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 5 月 16 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590893

研究課題名（和文）ループス腎炎の病態発現におけるインターフェロン制御因子5の作用の解析

研究課題名（英文）Role of the interferon regulatory factor 5 in the development of lupus nephritis

研究代表者

多田 芳史（YOSHIFUMI TADA）

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：70284627

研究成果の概要（和文）：インターフェロン制御因子5（IRF5）は全身性エリテマトーデスの発症への関与が示唆されていた。我々は IRF5 を欠損するループスマウスを作成しその病態を解析した。自己抗体では抗核抗体や抗 dsDNA 抗体等は著明に低下していた。ループス腎炎の程度も軽症であり、これらの結果生命予後は著明に改善した。脾樹状細胞では Toll-like receptor に対するサイトカイン産生が低下していた。以上より IRF5 はループス腎炎の発症に極めて大きな作用を有し、治療ターゲットとして有望であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Interferon regulatory factor 5 (IRF5) is a transcription factor and considered to be involved in the development of systemic lupus erythematosus. We generated IRF5-deficient lupus (MRL/lpr) mice and investigated their phenotype. Autoantibodies to nuclear antigens, including anti-nuclear antibodies and anti-dsDNA antibodies were lower or negative in the mouse sera. Lupus nephritis was much milder, and the mice survive much longer than control MRL/lpr mice. Splenic dendritic cells produced lower levels of inflammatory cytokines in response to Toll-like receptor ligands. These results show that IRF5 is a crucial driver of lupus nephritis and indicate that IRF5 may be an attractive new target for the treatment of lupus nephritis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学

1. 研究開始当初の背景

インターフェロン制御因子（Interferon Regulatory Factor, IRF）はインターフェロン（IFN）による刺激のシグナル伝達を担う転写因子として同定され、ヒトでは9つのメンバーからなるファミリーを形成している。

IRF は IFN のシグナル伝達以外にもウイルス感染の防御やT細胞反応の誘導等多彩な役割を担っていることが明らかになっている。

最近の遺伝子多型の研究により全身性エリテマトーデス（SLE）の発症と関連する遺伝子として IRF5 が報告された。IRF5 の遺

伝子多型と SLE の相関はアメリカ、ヨーロッパ、日本人を含むアジアなどで広く認められ、重要な遺伝要因として認識された。IRF5 は Toll-like receptor (TLR) の刺激伝達に働く分子であり、IRF5 欠損マウスでは TLR4、TLR5、TLR7、TLR9 などの刺激に対する反応が低下していることが示されていた。しかし、IRF5 が SLE の病態形成にどのような役割をはたしているのかについては、これまでほとんど解明されていなかった。

2. 研究の目的

我々は代表的なループスモデルである MRL/lpr マウスを用いて、マウスループス腎炎の発症や、自己免疫応答の発現における IRF5 の作用を検討した。

3. 研究の方法

IRF5 欠損マウスを MRL/lpr マウスに 8 世代以上戻し交配して、IRF5 欠損 MRL/lpr マウス (IRF5KO-lpr) を作成した。Littermate の野生型マウス (IRF5+/+ MRL/lpr マウス) をコントロールとして用いた。

自己抗体価は 18 週令で採血をし、抗核抗体は蛍光抗体法で、抗 dsDNA 抗体、抗 Sm 抗体、抗 RNP 抗体は ELISA で測定した。血清中の免疫グロブリン値は ELISA で測定した。

腎炎の評価は 18 週令で行った。HE 染色、PAS 染色、PAM 染色にて糸球体病変、血管炎、間質病変を組織学的に評価した。糸球体への IgG と補体 C3 の沈着を蛍光抗体法で検討した。糸球体や間質への細胞浸潤 (CD4T 細胞、CD8T 細胞、B220 陽性 T 細胞、マクロファージ) の程度は免疫組織染色で検討した。また腎でのサイトカイン (TNF α 、IFN γ 、IL-6、CCL6) の発現レベルは、腎皮質から RNA を抽出し、real-time PCR で測定した。また血清の BUN 濃度を測定した。

脾細胞の分画 (T 細胞、B 細胞、樹状細胞 (DC)、CD4 細胞の亜分画) はモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー法で検討した。脾細胞からビーズ法で DC を分離し、種々の TLR リガンドおよび免疫複合体 (IC) で刺激し、24 時間後の上清中のサイトカインをビーズアッセイまたは ELISA にて測定した。IC は MRL/lpr マウス血清からカラム法で分離した IgG を、分子量 30 万をカットするカラムにかけて精製した。

4. 研究成果

(1) 生存率. IRF5KO-lpr マウスはコントロールと比べて著しい生存率の改善を認めた (図 1)。コントロールでは 1 年ですべて死亡したが、IRF5KO-lpr では 1 年後も 87.5% のマウスが生存した。この結果から IRF5 はこのマウスの疾患の進行に極めて大きいインパク

トを持っていることが明らかになった。

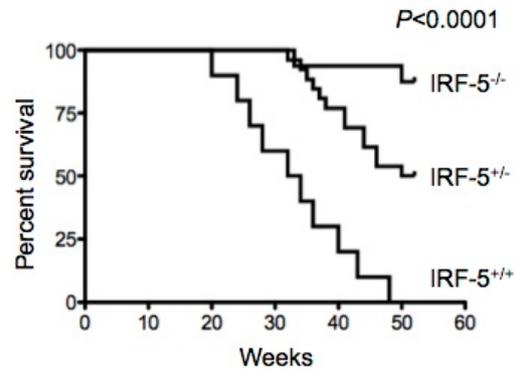


図 1. IRF5 欠損 MRL/lpr マウスの生存率

(2) 自己抗体. 抗核抗体価は IRF5KO-lpr では著明に低下していた (図 2、 $p < 0.005$)。また抗 dsDNA 抗体値は IgG1、IgG2a、IgG3 の各クラスで低下しており、特に IgG3 クラスの抗体は検出できなかった (図 3、 $*p < 0.05$, $***p < 0.001$)。また IgG クラスの抗 Sm 抗体および抗 RNP 抗体についても IRF5KO-lpr では検出されなかった。以上より IRF5 は自己抗体の産生に非常に重要であることがあきらかになった。また血清の IgG 値は IgG3 のみ IRF5KO-lpr で低下していたが、IgG1、IgG2a、IgM では有意差を認めなかった。

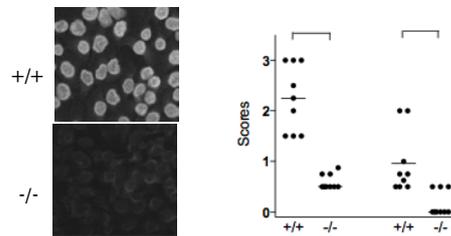


図 2. 抗核抗体

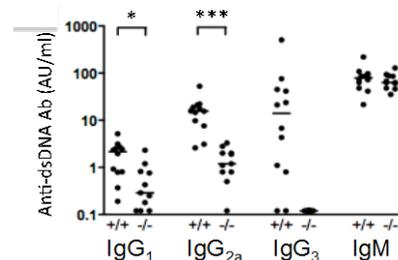


図 3. 抗 dsDNA 抗体値

(3) ループス腎炎. 組織学的な評価では、糸球体腎炎 (メザンギウムの増殖、壊死、分葉化、半月体形成など) の程度は IRF5KO-lpr ではコントロールよりも著しく軽度であった。さらに血管周囲の細胞浸潤もきわめて軽度であり、尿細管間質病変も軽度であった。それぞれの病変を病理学者によりスコア化

するといずれも有意な差を認めた (図4、■ +/+、□ -/-、***p<0.001, ****p<0.0001, *p<0.05) また糸球体へのIgGと補体C3の沈着もIRF5KO-1prで有意に減少していた。血清BUN値も同様に低値であった(29.7 mg/dl vs 40.2 mg/dl)。腎における細胞浸潤を免疫染色で評価すると、糸球体内においてはIRF5KO-1prでCD4陽性T細胞とマクロファージの浸潤が低下していた。また間質ではマクロファージの減少が認められた(図5、■ +/+、□ -/-、*p<0.05, **p<0.005)。腎皮質におけるサイトカイン、ケモカインのmRNA発現については、TNF α 、IL-6、CCL5の発現レベルはIRF5KO-1prで有意に低下していた。IFN γ については差を認めなかった。以上よりループス腎炎の程度はIRF5の欠損により著しく軽減すると考えられた。

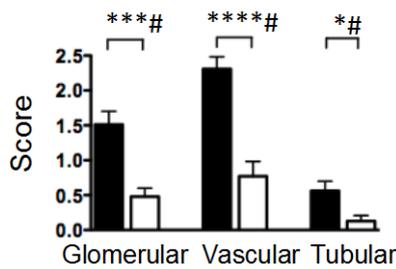


図4. ループス腎炎の組織学的評価

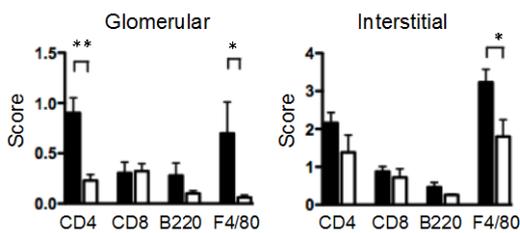


図5. 腎における細胞浸潤

(4)脾細胞分画. IRF5KO-1prではCD4陽性T細胞が低下し、CD19陽性B細胞とCD8陽性T細胞の比率が上昇していた。CD4陽性T細胞の亜分画では、メモリーT細胞と活性化T細胞の分画が低下していたが、ナイーブT細胞と調節性(Foxp3陽性)T細胞には差を認めなかった。また、マクロファージとplasmacytoid DCは増加していた。DCの活性化をCD80とCD86の発現で評価すると、両者ともにCD86のみ発現が見られたが、IRF5KO-1prとコントロールで差は認めなかった。以上よりIRF5KO-1prでは活性化、およびメモリーCD4陽性T細胞の減少が特徴的であった。

(5)DCのTLR刺激に対する反応. 脾臓より分離したCD11c陽性DCの亜分画(plasmacytoid DCとconventional DCの比)はIRF5KO-1pr

とコントロールで差を認めなかった。DCをTLRリガンド(TLR3、4、5、7、9)で24時間刺激したときのサイトカイン産生を測定した。IRF5KO-1prのDCにおいて、TNF α 、IL-6、IL-10産生はTLR7リガンドとTLR9リガンド刺激に対して低下が認められ、IFN γ とMCP-1の産生はTLR9刺激に対して低下が認められた(図6、**p<0.01, ***p<0.005)。また、TLR9リガンドで刺激した際のIFN α の産生についてもIRF5KO-1prDCで低下が認められた。マウス血清から精製したICでDCを刺激したときのTNF α とIL-6産生について検討すると、コントロールマウスDCではICの刺激に対して用量依存的にサイトカインの産生増強が認められたが、IRF5KO-1prでは産生増強効果は認められなかった(図7、*p<0.05)。これらの結果よりIRF5はDCのTLR7とTLR9に対する活性化およびICによる活性化に重要であることが示された。

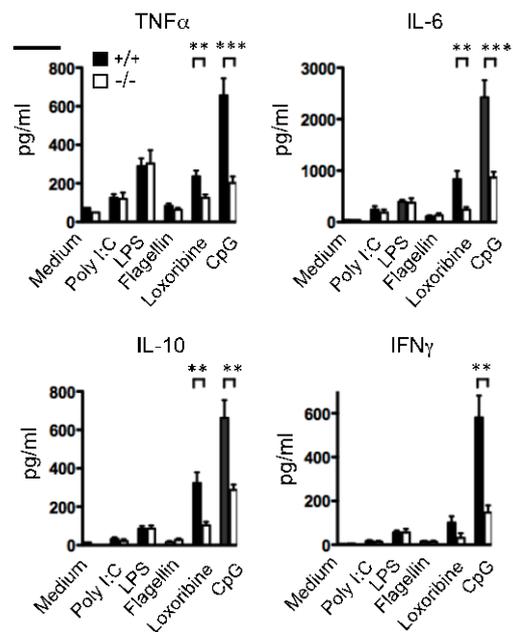


図6. TLRリガンド刺激に対するDCのサイトカイン産生

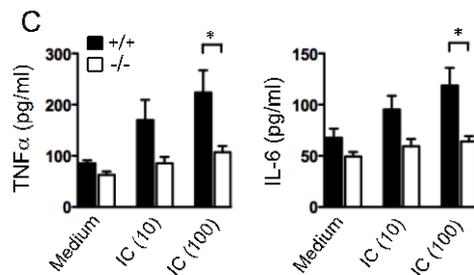


図7. IC刺激に対するDCのサイトカイン産生

(6)まとめ. 以上よりIRF5はマウスモデルにおいて、ループス腎炎の発現および自己抗体産生にきわめて大きな役割を担っており、

IRF5 が無い状態ではループスの病変が著明に軽減することが明らかになった。そのメカニズムとして、DC の TLR や IC の刺激に対する活性化において IRF5 が重要な働きをしていることが考えられた。これまでヒト SLE の遺伝子多型研究において IRF5 は発症に関連する重要な因子と考えられていたが、本研究によって IRF5 はループスの病態発現において非常に重要な役割を果たすことが明らかとなった。これはさらに今後 IRF5 をターゲットとしたループス腎炎の治療が有望であることを示唆している。

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 6 件)

- ① Koarada S, Tada Y. RP105-negative B cells in systemic lupus erythematosus. Clin Dev Immunol、査読有、2012;2012:259186. doi: 10.1155/2012/259186.
- ② Koarada S, Tada Y, Suematsu R, 他 4 名. Phenotyping of P105-negative B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. Clin Dev Immunol、査読有、2012;2012:198206. doi: 10.1155/2012/198206.
- ③ 多田芳史. MRL/lpr マウスのループス様病変発症には IRF5 が必須である。リウマチ科、査読無、2011;46:552-557.
- ④ Tada Y, Kondo S, Aoki S, Koarada S, 他 5 名. Interferon regulatory factor 5 is critical for the development of lupus in MRL/lpr mice. Arthritis Rheum、査読有、2011;63:738-748. doi: 10.1002/art.30183.
- ⑤ 多田芳史. 全身性エリテマトーデスとインターフェロン-IFN α 、IRF-5、Toll-like receptor に関する最近の知見。九州リウマチ、査読無、2010;30:55-59.
- ⑥ Koarada S, Tada Y, Sohma Y, 他 8 名. Autoantibody-producing RP105-negative B cells from patients with systemic lupus erythematosus, showed more preferential expression of BCMA compared with BAFF-R than normal subjects. Rheumatology 査読有、2010;49:662-670. doi: 10.1093/rheumatology/kep437.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Koarada S, Ohta A, Tada Y. Increased novel human late B cell subsets of RP105-negative B cells in patients with

systemic lupus erythematosus. 第 41 回日本免疫学会学術集会. 2012. 12. 5-12. 7. 神戸

- ② 小荒田秀一、田代知子、末松梨絵、他 3 名、6 番目. SLE および自己免疫疾患における自己抗体産生 RP105 陰性 B 細胞上の BCMA/BAFF-R の発現の解析. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2012. 4. 26-29. 東京
- ③ 多田芳史、小荒田秀一、青木茂久、他 5 名. インターフェロン制御因子 5 (IRF5) のループスマウスの病態発現における作用とそのメカニズム. 第 39 回日本臨床免疫学会総会. 2011. 9. 15-17. 東京
- ④ 多田芳史、近藤誠司、小荒田秀一、他 5 名. IRF5 欠損 MRL/lpr マウスでは TLR を介したサイトカイン産生が抑制される. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2011. 7. 17-20. 神戸
- ⑤ 小荒田秀一、多田芳史、井上久子、他 4 名. SLE 由来自己抗体産生 RP105(-)B 細胞の BCMA の発現-RP105(-)B 細胞のフェノタイプ解析. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2011. 7. 17-20. 神戸
- ⑥ 多田芳史、近藤誠司、小荒田秀一、長澤浩平. IRF5 はループスマウスの病態発現に重要な役割をはたす. 第 30 回福岡臨床免疫研究会. 2010. 1. 23. 福岡
- ⑦ 多田芳史、近藤誠司、小荒田秀一、他 5 名. IRF5 はループスマウスの病態発現に重要な役割をはたす. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2010. 4. 22-25. 神戸
- ⑧ Tada Y, Koarada S, Aoki S, Koarada S, 他 4 名. Interferon regulatory factor-5 (IRF-5) is critical for the development of lupus in MRL/lpr mice. American College of Rheumatology annual scientific meeting. 2010. 11. 6-11. 米国アトランタ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 芳史 (TADA YOSHIFUMI)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号：70284627

(2) 研究分担者

小荒田 秀一 (KOARADA SYUICHI)
佐賀大学・医学部・講師
研究者番号：50304887

長澤 浩平 (NAGASAWA KOHEI)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：00108721
(平成 23 年度)

(3)連携研究者

近藤 誠司 (KONDO SEIJI)

独立行政法人国立病院機構九州医療セ
ンター (臨床研究センター)

研究者番号 : 30253842