

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860814

研究課題名(和文) SLEにおけるFli-1を介した形質細胞様樹状細胞の分化・IFNの発現機構の解明

研究課題名(英文) Roles of Fli-1 in differentiation of plasmacytoid dendritic cells and in mechanisms of expression of IFN in SLE patients

研究代表者

鈴木 英二 (Suzuki, Eiji)

福島県立医科大学・医学部・病院助手

研究者番号：50443883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：全身性エリテマトーデス(SLE)患者における病態における、転写因子Fli-1とEts-1の役割を形質細胞様樹状細胞(PDC)との関連を中心に検討した。疾患活動性が低いSLE44名、関節リウマチ(RA)40名、健常人(HD)25名の末梢血を用いた。SLE群ではFli-1とEts-1の発現が低値であった。インターフェロン関連分子ではIRF5とTYK2がHD群と比較してSLE群とRA群で低値であった。SLE群ではB細胞およびCD4細胞の比率が低かったが、PDCには差が認められなかった。ステロイド投与量が多い程Fli-1とEts-1の発現が低い傾向があり、今後治療による修飾を考慮した検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of the transcription factors Fli-1 and Ets-1 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE), focusing especially on the roles of plasmacytoid dendritic cells (PDC). We enrolled 44 SLE patients with low disease activity, 40 rheumatoid arthritis (RA) patients, and 25 healthy donors (HDs). Compared to HDs, Fli-1 and Ets-1 expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of SLE patients was lower, and IRF5 and TYK2 (transcription factors involved in type 1 interferon signaling) gene expression in SLE and RA patients was lower. The percentages of B and CD4 T cells were significantly lower in SLE patients than in RA patients and HDs. The PDC percentages were not significantly different between the 3 groups. Fli-1 and Ets-1 gene expression in SLE patients that were administered a high dose of prednisolone tended to be low. Further research is necessary to clarify the roles of Fli-1 and Ets-1 in SLE, and the influence of prednisolone treatments.

研究分野：リウマチ膠原病学

キーワード：全身性エリテマトーデス 形質細胞様樹状細胞 型インターフェロン Fli-1 Ets-1

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)は未だに原因が不明な慢性炎症性疾患である。免疫系細胞、特にリンパ系細胞の異常が病態に深く関与していると言われている。

Ets family transcriptional factor は共通の Ets domain を有し、GGAA/T の部位に結合し、その作用を発揮する。主に細胞増殖に関わる転写因子群として知られるが、lymphoid cell の機能を制御する働きも有することが報告されている。Friend Leukemia Insertion Site 1 (Fli-1) は Ets transcriptional factor の一つであり、血球細胞や血管内皮細胞に高発現し、免疫担当細胞の制御にも関与することが報告されている。Georgiou P らは、活動性の SLE 患者末梢血単核球では、Fli-1 mRNA の発現が亢進していたことを報告した(Int J Oncol, 1996, 9:9-18)。

申請者および前所属機関では、Dr. Watson の協力のもと、ループモデルマウスである MRL/lpr マウスおよび NZM2410 マウスの Fli-1 heterozygous knockout マウスを作成し、研究を行ってきた(Fli-1 knockout マウスは胎生致死である)。両ループモデルマウスにおいて、Fli-1 heterozygous knockout マウスは野生型マウスと比較して a)ds-DNA 抗体値が低値であること、b)尿蛋白が少ないこと、c)病理組織学的に腎炎の程度が軽度であること、そして、d)生存期間が延長することを報告してきた(Zhang XK et al. J Immunol, 2004, 173:6481-89, Mathenia J et al. Clin Exp Immunol, 2010, 162:362-71)。しかし、Fli-1 が SLE の病態に影響を与える機序に関しては十分に解明されていない。

近年、interferon(IFN)が SLE の発症および悪化に重要な役割を果たしているという事が、ヒト検体および疾患モデルマウスを用いた研究にて報告されてきている。中でも形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell: PDC)は、単鎖 RNA を認識する Toll like receptor (TLR)7 や CpG DNA を認識する TLR 9 を介したシグナル伝達によって大量に type I IFN を産生することが知られ、SLE の病態に多大な影響を与えていることが推察される。また、我々は、Fli-1 の C-terminal transactivation (CTA) domain を欠いた C57/B6(B6)マウスの脾細胞において、PDC の比率が増加していることを報告した(Suzuki E et al. Immunology, 2013, 139:318-27)。

以上より、ループモデルマウスにおいて、Fli-1 の発現量による違いが SLE の病態に影響を与える機序の一つとして、Fli-1 が末梢リンパ組織において PDC の分化および機能を制御し、type I IFN の血中濃度をコントロールし、SLE の病態に影響を与えている機序を推察し、研究を計画した。

2. 研究の目的

Fli-1 が SLE の病態に与える機序の解明、特に、IFN 産生制御や PDC の分化成熟に Fli-1 が与える影響に焦点をあて、以下の事を明らかにする。

1) SLE 患者の末梢血単核球より cDNA を作成して、Fli-1 および他の Ets transcriptional factor である Ets-1 の発現を realtime PCR で計測し、健常人および疾患コントロールとして関節リウマチ(RA)患者と比較し、Ets transcriptional factor の発現量に差がないかを検討する。また、I 型 IFN の発現に影響を与える分子の発現量を計測し、Fli-1 および Ets-1 の発現量との関連について検討する。

2) SLE 患者の末梢血単核球における、T 細胞、B 細胞、樹状細胞および形質細胞様樹状細胞の割合を、flowcytometry を用いて計測をする。Fli-1 の発現量による差がないかを検討する。また、健常人および RA 患者においても同様に検討を行う。

3) 上記 1)および 2)の項目に関しては、SLE の臨床症状、疾患活動性および治療内容との関連についても検討する。

4) ループモデルマウスである MRL/lpr マウスの Fli-1 heterozygous knockout マウスの脾細胞から形質細胞様樹状細胞を単離し、Toll like receptor (TLR) 7 のリガンドであるイミキモドや TLR 9 のリガンドである CpG DNA を加え、Fli-1 発現量による IFN 産生能の違いを検討する。

3. 研究の方法

1) 患者と疾患コントロール、健常人
SLE 患者 44 人、疾患コントロールとして RA 患者 40 人、健常人コントロールとして 25 人を対象とした。SLE および RA 患者は福島県立医科大学附属病院リウマチ膠原病内科に通院中の患者で、研究内容について文章で説明を行い、同意を取得した者とした。健常人コントロールにおいても文章による説明と同意を取得した。患者のプロファイルに関しては表 1 に示した通りである。尚、本研究を遂行するにあたり、福島県立医科大学倫理委員会による承認を得た。

2) 末梢血単核球の採取
患者および健常人より 10ml の血液を、ヘパリン加試験管に採取し、Lymphoprep tube (Axis-Shield) を用いて末梢血単核球を回収した。回収した末梢血単核球のうち、 1×10^6 個の細胞を RNA 抽出後 cDNA の作成に用い、残りの細胞はフローサイトメトリーに使用するため -80 に保存した。また、同時に採

取した血清も-80 に保存した。

3) Realtime PCR による遺伝子発現の計測
1×10⁶ 個の末梢血単核球を用いて TRIzol (Life Technologies)にて RNA を抽出した。抽出した RNA から SuperScript First-Strand Synthesis Supermix (Life Technologies)を使用して cDNA を合成した。得られた cDNA を使用して StepOne Realtime PCR System (Applied Biosystems) にて realtime PCR を行い、半定量的に遺伝子発現量を計測した。

測定には TaqMan gene expression assay (Applied Biosystems) を使用した。プライマーは ETS1 (Hs00428293_m1)、FLI1 (Hs00956711_m1)、IFIH1 (Hs01070332_m1)、IRF5 (Hs00158114_m1)、IRF7 (Hs01014809_g1)、TYK2 (Hs00177464_m1)、内在性コントロールとして GAPDH (Hs02786624_g1)を使用した。

4) IFN および IFN の測定

2) で保存した血清を使用し、Human interferon alpha mulyi-subtype serum ELISA kit (pbl assay science)にて IFN 血中濃度を ELISA 法にて計測した。また、cytometric bead assay (Becton Dickinson) を用いて、IFN の血中濃度を測定した。

5) フローサイトメトリー

2) で回収し凍結保存した末梢血単核球を解凍し PBS に浮遊させ、抗体で染色した。抗体は、Anti-Human CD3 PerCP-Cyanine5.5 (45-0036)、Anti-Human CD4 FITC (11-0049)、Anti-Human CD8a PE (12-0087)、Anti-Human CD19 APC (17-0198)、Anti-Human CD123 PE (12-1239)、Anti-Human HLA-DR PerCP-Cyamine5.5(45-9956)、Human Hematopoietic Lineage FITC Cocktail (22-7778) (以上 eBioscience)、Pacific Blue anti human CD11c (301626)、APC anti-human CD45 (304012) (以上 BioLegend) を使用した。染色後、PBS で細胞を洗浄し、FACS Canto (Becton Dickinson) にて細胞表面抗原の測定を行った。T 細胞: CD3+かつ CD4+ または CD8a+、B 細胞: CD19+、convectinal dendritic cells (cDC): CD45+ かつ Lineage- かつ HLA-DR+ かつ CD11c+、PDC: CD45+ かつ Lineage- かつ HLA-DR+ かつ CD123+ とした。

6) マウス

Fli-1^{+/-} マウスはサウスカロライナ医科大学 Watson 博士により作成された (Spyropoulus DD et al. Mol Cell Biol, 2000, 20:5643-5652)。Zhang 博士によりループモデルマウスである MRL/lpr マウスと 7 世代戻し交配を施行された (J Immunol, 2004, 15:6481-6489)。Zhang 博士の好意により同マウスを供与していただいた。

Fli-1^{+/-}MRL/lpr マウスとその同胞の野生型マウスを実験に使用した。全てのマウスは福島県立医科大学医学部附属実験動物研究施設内で飼育された。

7) マウス脾細胞から形質細胞様樹状細胞の単離と脾細胞の培養

18 週齢の Fli-1^{+/-}MRL/lpr マウスおよび野生型マウスから脾臓を採取し、定法にて脾の単核球細胞を採取した。脾単核球細胞 1×10⁸ 個を Plasamacytoid Dendritic Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) を用いて、細胞分離を行った後、単離した細胞を Anti-Human/Mouse CD45R FITC (11-0452, eBioscience) と Anti-Mouse CD317 PE(12-3172 eBioscience) にて染色を行い、FACS Aria セルソーター (Becton Dickinson) にて CD45R+ かつ CD317+ の細胞を回収した。この細胞 1×10⁵ 個を 1ml の RPMI1640 (10% FCS 添加) にて培養した。その際、リガンド無添加、イミキモドおよび CpG DNA (ODN2216) を加え、24 時間後の上清を回収し、IFN および IFN の濃度を ELISA にて測定する。

4. 研究成果

1) 患者プロフィール

本研究にエントリーした患者のプロファイルを提示する (表 1)。SLE 患者は RA 患者と比較して若年で女性の患者が多かった。プレドニゾロンの平均使用量が 10.2mg/日、SLE の疾患活動性を表す指標の一つである SLEDAI-2K は中央値が 4 点であり、比較的活動性が低い患者が多かった。

表 1 患者プロフィール

	SLE	RA	健常人	P	
				SLE vs. RA	SLE vs. 健常人
人数	44	40	25		
年齢の平均 (範囲)、歳	38.4 (21-76)	61.0 (20-77)	33.7 (20-58)	<0.0001	0.1190
女性の人数	40	27	19	0.0130	0.1521
罹病期間の中央値 (範囲)、歳	10.5 (1-33)	6 (0.5-40)	NA	0.0670	-
プレドニゾン投与量 (範囲)、mg/日	10.2 (0-30)	1.4 (0-8)	NA	<0.0001	-
SLEDAI-2K (範囲)	4 (0-24)	NA	NA	-	-
赤沈の平均値 (範囲)、mm/時	9.4 (2-79)	13.5 (0-47)	NA	0.1729	-

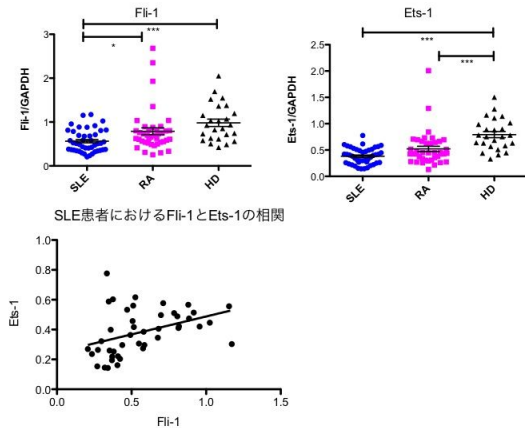
2) Fli-1 および Ets-1 の発現

各患者の末梢血より抽出した RNA より作成した cDNA を用い、realtime PCR にて計測した Fli-1、Ets-1 の発現を提示する (図 1)。Fli-1 は、SLE 群において RA 群および健常人群と比較して有意に発現量が少なかった。また、Ets-1 は、SLE 群および RA 群ともに、健常人群と比較して有意に発現量が低かった。SLE 患者における、Fli-1 と Ets-1 の発現量には正の相関関係が認められた (r=0.4858, N=44, p=0.0008)。

患者血清を使用して ELISA やマイクロビーズを用いて Flowcytometry にて INF の計測を試みたが、発現量が非常に低く、計測不能

であった。そのため、今後、IFN により発現を誘導される分子である interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1)、interferon-induced protein 44 (IFI44)、PRKR の発現量を realtime PCR で計測する予定である。

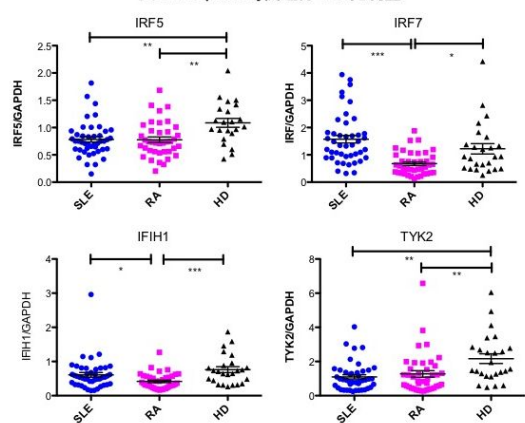
図1 Fli-1 および Ets-1 の発現量と SLE 患者における Fli-1 と Ets-1 の相関



3) IFN pathway に関連する分子の発現量

過去の報告にて、SLE 患者における遺伝子検索にて、I 型 IFN の発現に関連する分子として Interferon regulatory factor (IRF)5、IRF7、interferon-induced helicase C domain-containing protein 1 (IFIH1) および tyrosine kinase 2 (TYK2) が報告された。本研究では、前述の分子の発現量に関して、realtime PCR にて計測した (図2)。IRF5 および TYK2 は SLE 群 および RA 群では健康人群と比較して発現が低かった。また、IRF7 および IFIH1 は RA 群が他群と比較して有意に低値であった (図2)。

図2 IFN pathway 関連分子の発現量



4) 末梢血単核球におけるリンパ球および樹状細胞の比較

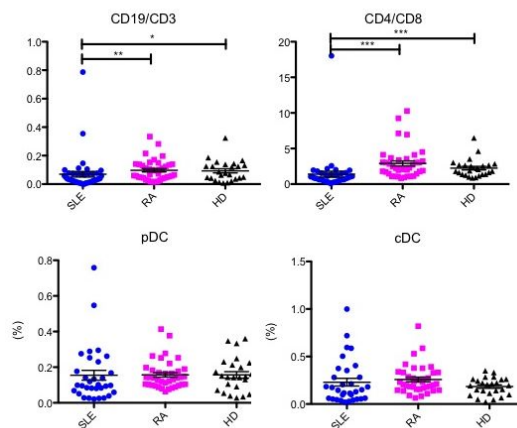
フローサイトメトリーを用いて、末梢血単核球の表面マーカーを計測し、リンパ球および樹状細胞の割合を計測した。

T 細胞と B 細胞の割合を CD19/CD3 (B 細胞

/T 細胞) で比較した。SLE 群では有意に CD19/CD3 が低い、即ち、B 細胞の割合が低かった。また、T 細胞の中で CD4/CD8 比を比較したが、SLE 群では有意に CD4/CD8 比が低かった (図3)。尚、いずれの値においても Fli-1 および Ets-1 の発現量との相関は認められなかった。

次に、末梢血中の CD11c 陽性樹状細胞および PDC の割合を白血球共通抗原である CD45 陽性細胞中の割合で比較を行った。尚、両樹状細胞の計測に関しては、細胞の採取、凍結および再解凍に問題があり、十分な個数を計測できていない例も多く、今後、検体を再度採取して計測を行う予定である。

図3 末梢血単核球の細胞腫の比較



5) 臨床検査成績と Fli-1 および Est-1 との関連

SLE 患者において、発症時の臨床症状について、皮膚症状、関節炎、漿膜炎、腎症および神経症状の有無による Fli-1、Ets-1 の発現の差異を確認した。発症時に腎症を有する患者では Ets-1 の発現量が有意に高値であった ($p=0.0393$)。また、関節炎を有する患者において Fli-1 の発現量が低い傾向にあった ($p=0.0726$) (図4)。次に、検体採取時における SLEDAI-2K および臨床検査値と Fli-1、Ets-1 との相関について確認を行った。SLEDAI-2K 値および、補体 (C3, C4) 尿蛋白の間には相関が認められなかった。末梢血では、リンパ球数と Ets-1 の発現量の間には正の相関が認められた ($r=0.3294$, $N=42$, $p=0.0331$)。しかし、他の末梢血との相関は認められなかった。また、プレドニゾン投与量と Fli-1 および Ets-1 の発現量の相関を確認した。いずれも有意ではなかったものの、プレドニゾン投与量と Fli-1 と Ets-1 の発現量の間には負の関連がある傾向があった (Fli-1: $r=-0.2382$, $N=44$, $p=0.1194$, Ets-1: $r=-0.2560$, $N=44$, $p=0.0935$) (図5)。最後に疾患コントロールとして用いた RA 患者の検査値の中で関節滑膜炎を反映する MMP-3 と Fli-1 および Ets-1 の相関を確認したところ、Ets-1 の発現量と MMP-3 値の間には負の相関が認められた ($r=-0.4084$, $N=28$, $p=0.0310$) (図6)。

図4 SLE発症時の臨床症状とEts-1・Fli-1の発現量

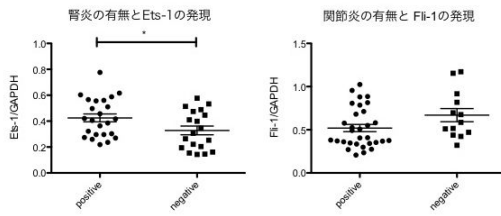


図5 SLE患者の臨床検査値およびプレドニゾンとEts-1・Fli-1の発現

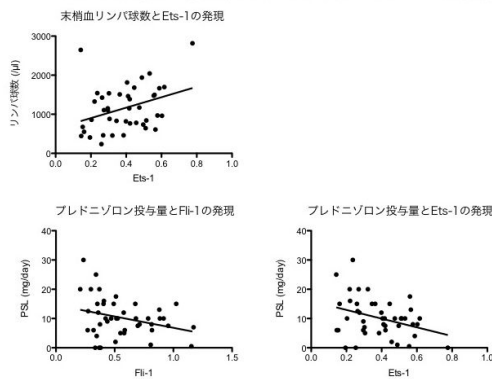
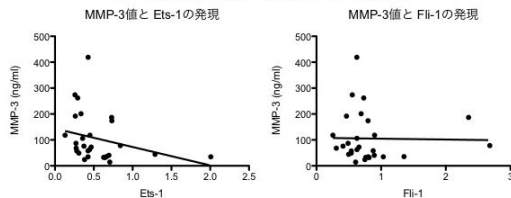


図6 RA患者のMMP-3とEts-1・Fli-1の発現



6) Fli-1^{-/-}/MRL/lpr マウスに関する研究に関しては、現在、マウス脾細胞から形質細胞様樹状細胞の単離およびリガンドによる刺激に関する実験系を確立中である。

本研究では、研究者らにより先行して行われたモデルマウスを用いた研究の結果から予測したものは反対の結果が得られた。つまり、SLE 患者においては Fli-1 の発現量が他群と比較して有意に低く、Ets-1 の発現は RA とともに健常人と比較して有意に低値であった。また、Ets-1 と Fli-1 は同じく Ets binding site に結合するためお互いの発現量に関しては負の相関が認められると予測したが、実際には正の相関が認められた。これらは、当研究で対象とした SLE 患者が罹病期間の中央値が 10.5 年、SLEDAI-2K の中央値が 4 と比較的治療後症状が安定している例が多いこと、プレドニゾンが平均で 10.2mg/日使用されていることが影響しているものと

思われた。実際、図 4 で提示したように、プレドニゾン使用量が多いほど Fli-1・Ets-1 の発現量は低下する傾向にはあり、ステロイドがこれら転写因子の発現に影響を与えている可能性が考えられた。また、マウスの検討で Fli-1 はリンパ球、特に B 細胞で発現が認められていた。しかし、本研究の SLE 患者群では疾患による影響やステロイド治療による影響で B 細胞やヘルパー T 細胞の比率が低値であり、結果として Fli-1 の発現が低値となっている可能性が考えられた。一方、PDC や樹状細胞の比率を計測するには十分量の末梢血単核球を得ることができず、これらの細胞比に関しては十分な検討を行うことができなかった。今後、再検を試みる予定である。

IFN pathway 関連分子の中でも、IRF5、IRF7 は SLE の発症に関して重要であるとの報告が数多くなされていた。SLE 群において IRF5、TYK2 の発現は低値であり、これらは、疾患活動性が低く治療されていることから、治療によりこれらの遺伝子発現が制御されている可能性が考えられた。しかし、IRF5、IFIH1 では疾患コントロールである RA 群において他群と比較して低値であり、解釈に関しては今後の検討を加えていく予定である。

SLE 発症時の臨床症状と検体採取時の検査値との関連に関しては、発症時腎症がある患者で Ets-1 の発現量が高値であり、検体採取時のリンパ球数が高値である患者で Ets-1 の発現量が高かった。腎症およびリンパ球数の抑制と Ets-1 の発現には関連があることが示唆された。一方 Fli-1 では発症時に関節炎がある患者で Fli-1 の発現が低い傾向が認められた。今後、INF により誘導される分子群も計測し IFN との関連を含め検討を加えたい。

また、本研究ではステロイド治療前の SLE 患者が 1 名しかおらず、ステロイド治療前の SLE 患者の検体を集積するとともに、既治療群との差を検討したい。

最後に、Fli-1^{-/-}マウスを用いた系にて PDC の TLR リガンドに対する感受性の差、遺伝子発現の差、また、PDC の臓器による分布の差などの検討を加えていき、SLE の病態における Fli-1 および Ets-1 の関わりと I 型 IFN との関わりを明らかにしていきたい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 英二 (SUZUKI, Eiji)
福島県立医科大学・医学部・消化器・リウ
マチ膠原病内科学講座・病院助手
研究者番号：50443883