

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08570

研究課題名（和文）DR6による末梢免疫細胞制御における分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Molecular function of DR6 for controlling peripheral immunological cells

研究代表者

藤倉 大輔 (Fujikura, Daisuke)

北里大学・獣医学部・特任准教授

研究者番号：70547794

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：末梢T細胞の高度な活性化、あるいは長期的な活性化の持続は、リウマチやSLEなどの自己組織炎症疾患を誘発し、一方で、抑制は病原体に対する易感染や癌の発生を誘発する。このため、生体内では末梢T細胞の活性を正に、あるいは負に厳密に制御するメカニズムが存在する。本研究では、免疫抑制性制御因子と目されるDR6に着目し、これを介したT細胞活性化制御に対する細胞内シグナル機構の分子詳細について解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、自己免疫性炎症性疾患の一つである全身性エリテマトーデスのモデルマウス病態発症制御において、DR6分子を介したメカニズムの存在が示唆された。本知見から、DR6分子が上記疾患の治療標的の一つとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Activation of peripheral T cells is tightly restricted to prevent induction of auto immunological diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE). Here we report molecular details of an orphan immune regulator, death receptor 6 (DR6/TNFRSF21) in lupus-like disease progression in mice.

研究分野：分子免疫学

キーワード：DR6 SLE T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末梢 T 細胞の高度な活性化、あるいは長期的な活性化の持続は、リウマチや SLE などの自己組織炎症疾患を誘発し、一方で、抑制は病原体に対する易感染や癌の発生を誘発する。このため、生体内では末梢 T 細胞の活性を正に、あるいは負に厳密に制御するメカニズムが存在する。この厳密な制御を担う共刺激因子の機能メカニズムに関する理解は、有効な免疫制御薬の開発に直結する。これまでの報告から、TNFRSF21/DR6 タンパク質は T 細胞の活性化を抑制しうることが報告されているが、その役割と細胞内シグナルの分子詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

末梢 T 細胞の病的な活性化あるいは抑制は、リウマチや SLE (Systemic lupus erythematosus) などの自己組織炎症疾患あるいは易感染や癌の発生を誘発する。このため、生体は末梢 T 細胞の活性化を正にあるいは負に適切に調節するメカニズムを有し、その人為的応用は効果的な疾患治療法を供する。しかし、疾患原因となる、T 細胞の活性化異常の誘因メカニズムと、これを防ぐ制御メカニズムに関する分子詳細は不明な点が多い。申請者らは、抑制性共刺激因子と目される Death receptor 6 (DR6) が異常活性化 T 細胞に発現され、異常活性化 T 細胞を抑制することにより疾患発症抑制に重要な機能を担う事を明らかにしつつ有る。本研究では、DR6 により誘導される細胞内シグナルの分子メカニズムとその是正される作用点を明らかにし、どのようなメカニズムで異常活性化 T 細胞が形成されるのか、そしてどうすればこれを制御できるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 全身性エリテマトーデスモデルマウスにおける DR6 の機能

全身性エリテマトーデスモデルマウスである NZB/W F1 マウス (BWF1) および野生型正常マウスである C57BL/6 マウス (B6) の 10 週齢および 24 週齢時における脾臓 CD4 および CD8T 細胞における DR6 発現をフローサイトメトリー法により解析した。

(2) DR6 と Syndecan-1 結合の解析

ヒト Syndecan-1 (hSdc1) あるいはマウス Syndecan-1 (mSdc1) 遺伝子を安定発現させた T 細胞培養細胞株である D011.10T 細胞と組換え DR6 細胞外タンパク質 (DR6-Fc) の結合をフローサイトメトリー法により解析した (図 2-A)。DR6 細胞外領域に存在する 4 つの Cysteine Rich Domai (CRD) をそれぞれ部分欠損させた DR6 変異体組換えタンパク質 (CRD 1~4) と A20 細胞上に発現する Syndecan-1 タンパク質との結合を共免疫沈降法により解析した (図 2-B)。D011.10T 細胞を抗 CD3 抗体および組換え Syndecan-1 タンパク質 (recSdc1) と共に刺激し、NFAT あるいは NFκB 転写因子活性化をレポーター遺伝子アッセイ法により解析した (図 2-C)。

(3) T 細胞シグナルにおける DR6 架橋の影響の解析

DR6 野生型 (DR6_{WT}) および DR6 の細胞内領域を全欠損させた変異体 (DR6_{dT}) を恒常的に発現させた内在性 DR6 遺伝子欠損 D011.10 細胞を作成し、それぞれを抗 CD3 抗体および抗 DR6 抗体による各種コンビネーションにより刺激し、ZAP70 のリン酸化レベルを、抗リン酸化 ZAP70 抗体を用いた Flowcytometry 法により解析した。

(4) DR6 遺伝子欠損マウスの作成と解析

Balb/c マウス受精卵の *TNFRSF21* ゲノムを標的とした CRISPR-Cas9 法により、遺伝子変異を導入した受精卵を仮親に移植し、複数の仔マウスを得た。それぞれマウスについて、*TNFRSF21* ゲノム遺伝子上の標的領域を PCR 法により増幅し、DNA シーケンス法により挿入変異を解析した。産出された仔マウスのうち、比較的大きな領域が欠損されたマウスをバッククロス交配によりライン化し、Balb/c-*TNFRSF21*^{mut} マウス系統を樹立した。Balb/c マウスおよび Balb/c-*TNFRSF21*^{mut} マウスに DNP-KLH 抗原を投与し、それぞれのマウスの脾臓 T 細胞の活性化を対象に解析を行った。

4 . 研究成果

(1) 全身性エリテマトーデスモデルマウスにおける DR6 の機能

全身性エリテマトーデスモデルマウス (NZBW/F1, BWF1) および野生型正常マウス (C57BL/6, B6) の 10 週齢 (10wks) および 24 週齢 (24wks) における脾臓内 CD4 あるいは CD8T 細胞上の DR6 発現解析結果を右図に示す。B6 においては、10 週齢および 24 週齢において、いずれの T 細胞における DR6 の発現に顕著な変化は認められなかったのに対し、BWF1 の CD4 陽性 T 細胞においては、発症前 10 週齢に対して発症期 24 週齢に移行するとともに DR6 発現量の亢進が認められた。

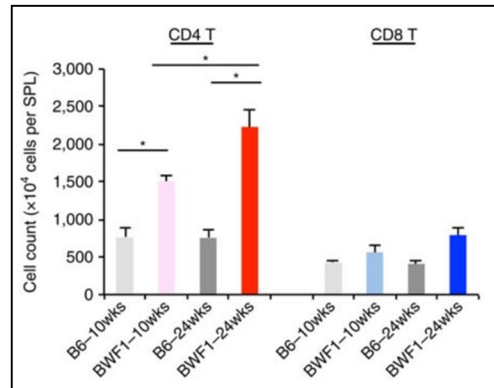


図 1 全身性エリテマトーデスモデルマウス発症に伴う DR6 の発現

(2) DR6 と Syndecan-1 結合の解析

DR6 が属する TNF 受容体分子は、その特異的結合因子との結合により活性化することが知られているが、T 細胞における DR6 結合因子は明らかにされていない。DR6 細胞外領域に親和性を示す A20 細胞から作成した cDNA ライブラリーを用いた発現クローニング法により、DR6 細胞外領域結合因子をコードする遺伝子として

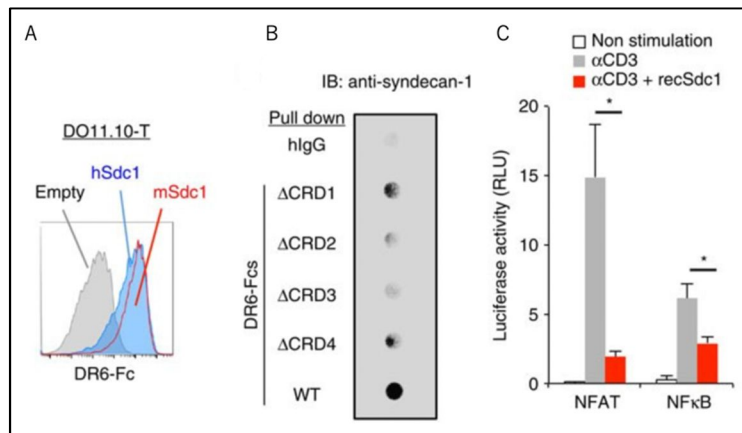


図 2 T 細胞における DR6 と Syndecan-1 結合の解析

Syndecan-1 (Sdc1) を単離した (図 2 A) 。組換え DR6 細胞外領域部分欠損変異体と Sdc1 結合解析から、DR6 細胞外領域を構成する Cysteine Rich Domain (CRD) 1 ~ 4 のうち、CRD2 および CRD3 領域が結合に必須であることが明らかとなった (図 2 B) 。また、培養 T 細胞株を用いた解析から、抗 CD3 抗体刺激による NFAT および NFkB 転写因子の活性化は、組換え Sdc1 タンパク質 (recSdc1) の投与により抑制された。これらの結果から、DR6 と Sdc1 との

結合は、DR6 分子上の CRD2 および 3 を介して、T 細胞活性化刺激における NFAT および NFκB 活性化経路を抑制しうるということが明らかとなった。

(3) T 細胞活性化シグナルにおける DR6 の作用

T 細胞の活性化は細胞表面上に発現される T 細胞受容体架橋により誘導される。その刺激情報は T 細胞受容体架橋の後、その直下に位置する CD3 タンパク質の集簇、更に ZAP70 タンパク質のリン酸化レベルの上昇を介してより下流のタンパク質情報伝達系に伝えられることが知られている。上記の T 細胞受容体刺激による細胞内情報伝達系における DR6 刺激の作用点について検討を行った。D011.10-DR6_dT 細胞株および D011.10-DR6WT 細胞株ともに、未刺激条件下と比較して抗 CD3 抗体単独刺激条件において ZAP70 リン酸化レベルの上昇が検出された。また、抗 CD3 抗体と抗 DR6 抗体の共刺激条件において、D011.10-DR6_dT 細胞株では抗 CD3 抗体単独刺激条件下と同様に ZAP70 リン酸化レベルの上昇が誘導されていたのに対し、D011.10-DR6WT 細胞株においては、ZAP70 リン酸化レベルの上昇はより低値であった。これらの結果から、T 細胞受容体刺激による細胞内情報伝達系における DR6 刺激の作用点は、T 細胞受容体直下に位置する可能性が示唆された。

(4) 野生型マウスにおける DR6 の役割

外来性抗原として DNP-KLH 抗原を投与した Balb/c マウスおよび Balb/c-*TNFRSF21^{mut}* マウスの脾臓 T 細胞を対象に、Tfh 細胞の形成を比較したが、顕著な差は認められなかった。また、DNP-KLH 抗原を投与した C57BL/6 マウスの脾臓 Tfh 細胞における DR6 発現は、BWF1 マウスにおける脾臓 Tfh 細胞に比較して低値であった (図 3 a,b および c)。

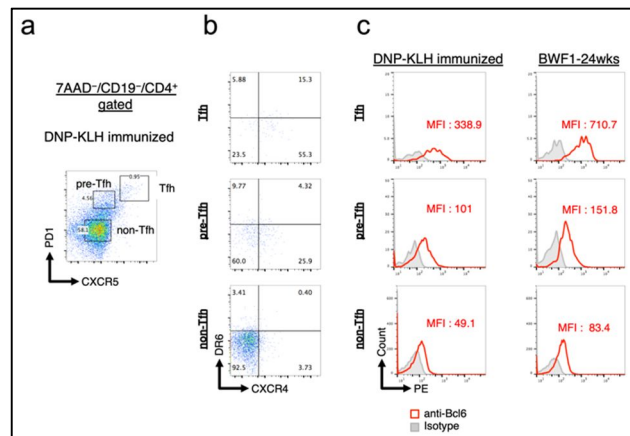


図 3 外来性抗原依存性免疫における DR6 の関与

本研究成果により、DR6 の自己免疫性炎症疾患である全身性エリテマトーデス発症との関与が示唆された。また、DR6 結合因子や作用点等を含む DR6 を介した T 細胞シグナル制御の分子メカニズムの一端が見いだされ、そのメカニズムは外来性抗原による免疫応答と自己免疫疾患における応答において異なる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sekiya T, Mifsud Edin J, Ohno M, Nomura N, Sasada M, Fujikura D, Daito T, Shingai M, Ohara Y, Nishimura T, Endo M, Mitsumata R, Ikeda T, Hatanaka H, Kitayama H, Motokawa K, Sobue T, Suzuki S, Itoh Y, Brown Lorena E, Ogasawara K, Kino Y, Kida H	4. 巻 37(15)
2. 論文標題 Inactivated whole virus particle vaccine with potent immunogenicity and limited IL-6 induction is ideal for influenza	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 2158-2166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2019.02.057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Simbotwe Manyando, Fujikura Daisuke, Ohnuma Miyuki, Omori Ryosuke, Furuta Yoshikazu, Muuka Geoffrey Munkombwe, Hang'ombe Bernard Mudenda, Higashi Hideaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Development and application of a Bacillus anthracis protective antigen domain-1 in-house ELISA for the detection of anti-protective antigen antibodies in cattle in Zambia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0205986	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 -
1. 著者名 Fujikura Daisuke, Miyazaki Tadaaki	4. 巻 19
2. 論文標題 Programmed Cell Death in the Pathogenesis of Influenza	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2065 ~ 2065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19072065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kondoh Tatsunari, Letko Michael, Munster Vincent J, Manzoor Rashid, Maruyama Junki, Furuyama Wakako, Miyamoto Hiroko, Shigeno Asako, Fujikura Daisuke, Takadate Yoshihiro, Yoshida Reiko, Igarashi Manabu, Feldmann Heinz, Marzi Andrea, Takada Ayato	4. 巻 218
2. 論文標題 Single-Nucleotide Polymorphisms in Human NPC1 Influence Filovirus Entry Into Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 S397 ~ S402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiy248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitamura Hiroshi, Saito Natsuko, Fujimoto Junpei, Nakashima Ken-ichi, Fujikura Daisuke	4. 巻 18
2. 論文標題 Brazilian propolis ethanol extract and its component kaempferol induce myeloid-derived suppressor cells from macrophages of mice in vivo and in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Complementary and Alternative Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12906-018-2198-5	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 -

1. 著者名 Fujikura Daisuke, Muramatsu Daisuke, Toyomane Kochi, Chiba Satoko, Daito Takuji, Iwai Atsushi, Kouwaki Takahisa, Okamoto Masaaki, Higashi Hideaki, Kida Hiroshi, Oshiumi Hiroyuki	4. 巻 163
2. 論文標題 Aureobasidium pullulans-cultured fluid induces IL-18 production, leading to Th1-polarization during influenza A virus infection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 31 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvx062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Hirohito, Kajihara Masahiro, Nao Naganori, Shigeno Asako, Fujikura Daisuke, Hang 'ombe Bernard, Mweene Aaron, Mutemwa Alisheke, Squarre David, Yamada Masao, Higashi Hideaki, Sawa Hirofumi, Takada Ayato	4. 巻 9
2. 論文標題 Characterization of a Novel Bat Adenovirus Isolated from Straw-Colored Fruit Bat (<i>Eidolon helvum</i>)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 371 ~ 371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v9120371	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

1. 著者名 Kondoh Tatsunari, Manzoor Rashid, Nao Naganori, Maruyama Junki, Furuyama Wakako, Miyamoto Hiroko, Shigeno Asako, Kuroda Makoto, Matsuno Keita, Fujikura Daisuke, Kajihara Masahiro, Yoshida Reiko, Igarashi Manabu, Takada Ayato	4. 巻 12
2. 論文標題 Putative endogenous filovirus VP35-like protein potentially functions as an IFN antagonist but not a polymerase cofactor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0186450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0186450	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

1. 著者名 Fujikura D, Ikesue M, Endo T, Chiba S, Higashi H and Uede T	4. 巻 8:13957
2. 論文標題 Death receptor 6 contributes to autoimmunity in lupus-prone mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncomms13957.	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

1. 著者名 Fujikura D, Toyomane K, Kamiya K, Mutoh M, Mifune E, Ohnuma M and Higashi H	4. 巻 78(8)
2. 論文標題 ANTXR-1 and -2 independent modulation of a cytotoxicity mediated by anthrax toxin in human cells.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci.	6. 最初と最後の頁 1311-1317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.15-0727.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 0件)

1. 発表者名 藤倉大輔
2. 発表標題 ヒト狼瘡動物モデルNZB/W F1マウスの発症におけるDeath receptor 6の関与
3. 学会等名 第14回北海道実験動物研究会総会・学術集会
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----