

令和元年5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06633

研究課題名(和文) Fli1の発現異常を軸とした膠原病の病態における T細胞の機能解析

研究課題名(英文) The analysis of the role of gammadelta T cell in the pathogenesis of connective tissue disease on the axis of abnormal expression of Fli1

研究代表者

三枝 良輔 (Saigusa, Ryosuke)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50800992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)： T細胞特異的Fli1ノックアウトマウスを用いて、強皮症の代表的モデルマウスであるブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの作成および解析を行った。ブレオマイシン投与により強皮症類似の血管障害が誘導されるが、 T細胞特異的Fli1ノックアウトマウスにおいて血管障害が増強していた。さらにFli1がノックアウトされた T細胞においてIL-17Aの発現が上昇している可能性を見出した。 T細胞およびIL-17Aは強皮症の血管障害に重要な役割を果たしている可能性が示唆されており、Fli1をノックアウトした T細胞におけるIL-17Aの過剰発現が強皮症の血管障害に寄与している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠原病は全身の複数の臓器に炎症が起こり、臓器の機能障害をもたらす一連の疾患群である。その中で皮膚も侵す疾患として全身性強皮症、全身性エリテマトーデスが知られている。新規治療開発のためにはその病態の解明が不可欠であるが、近年その病態への T細胞の関与が注目されている。またこれまでの遺伝学的な多くの検討により、転写因子Fli1の様々な細胞における発現変化が、特に全身性強皮症、全身性エリテマトーデスでその発症に関与している可能性が指摘されており、病態を解明する基礎データの構築はこれらの難治性疾患に対する新規治療開発に極めて重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：As a part of its immune abnormalities, SSc T cells preferentially attack vascular endothelial cells, possibly triggering the development of this disease. We generated T cell-specific Fli1 knockout (Fli1 Tck0) mice and assessed the contribution of T cells to the three pathological processes of SSc. According to histological analyses, hyperpermeability of vasculature, and increased expression of IL-17A in T cells were much more evident in BLM-treated Fli1 Tck0 mice than in BLM-treated control mice. Moreover, Fli1-deficient T cells were more sensitive to IL-23 stimulation than wild type T cells in terms of IL-17A production. These results altogether indicate that Fli1-deficient T cells augment the pathological processes of SSc at least partly via IL-17A overproduction, suggesting a potential contribution of Fli1 deficiency in T cells to the development of SSc.

研究分野：免疫

キーワード：全身性強皮症 全身性エリテマトーデス T細胞 転写因子 インターロイキン

1. 研究開始当初の背景

I. 膠原病における $\gamma\delta$ T細胞の役割

ヒトの末梢血中に含まれるTリンパ球のほとんどが $\alpha\beta$ 鎖のT細胞受容体(TCR)を発現している $\alpha\beta$ T細胞であるが、 $\gamma\delta$ 鎖のTCRを発現する $\gamma\delta$ T細胞が数%存在し、極めて多くの機能を持つ細胞として知られている。膠原病の病態においては、メモリーT細胞としての機能、他の自然免疫、獲得免疫細胞の機能調節、抗原提示細胞としての機能、およびTh1/2/17あるいは制御性T細胞様の機能を果たすことでその関与が想定されている。

II. 全身性強皮症の病態における $\gamma\delta$ T細胞の関与

全身性強皮症は様々な自己免疫異常を背景とし、微小血管障害を発症した後、皮膚および内臓諸臓器の線維化を生じる原因不明の全身性疾患である。 $\gamma\delta$ T細胞には様々なサブタイプが存在し、自己免疫に関与している可能性が近年指摘されているが、全身性強皮症においては $\gamma\delta$ T細胞の一つのサブタイプがIFN- γ 産生を介して全身性強皮症に合併する間質性肺炎を抑制する可能性が報告されている。さらに全身性強皮症由来の $\gamma\delta$ T細胞は*in vitro*の検討で血管内皮細胞に対して著明な細胞毒性を示し、全身性強皮症の病態に重要な微小血管障害を誘導する可能性が指摘されている。さらに、強皮症マウスモデルでも $\gamma\delta$ T細胞のその病態への関与が報告されている。

III. 全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus; SLE)の病態における $\gamma\delta$ T細胞の関与

SLEは発熱、全身倦怠感などの炎症を示唆する症状と、関節、皮膚、そして腎臓、肺、中枢神経などの内臓のさまざまな症状が一度に、あるいは経過とともに起こりうる。SLEの病態形成において $\gamma\delta$ T細胞は、抗原提示細胞としての役割、向炎症性のサイトカインの分泌、免疫調節機能、制御性T細胞との相互作用、B細胞に働きかけることで自己抗体の産生を促進させる機能といった多岐にわたる機能を果たすことで、その病態に関与している可能性が考えられている。

IV. 全身性強皮症、SLEの病態における転写因子Fli1の発現異常

全身性強皮症とSLEは異なる病態が想定されているが、ともに自己抗体の産生を伴う膠原病であり、圧倒的に女性に多く発症することやステロイドをはじめとする免疫抑制剤でその病勢コントロールを目指す点など共通点も多く、臨床的にオーバーラップすることもしばしば経験される疾患である。両疾患ともに遺伝的な因子と後天的な因子が複雑に病態形成に関与している可能性が高いと考えられている。申請者は、その一塩基多型が全身性強皮症の重症度に関与しているとこれまで報告されてきた転写因子IRF5に着目し、全身性強皮症の病態における役割をIRF5ノックアウトマウスを用いて詳細に明らかにした(Saigusa R et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112:15136-41)。また、一般的に後天的な環境要因などによって影響を受けるDNAメチル化といったepigeneticsの関与がその発症および進行に想定されているが、これまで蓄積されたデータから、T細胞におけるメチル化に関与する異常な遺伝子の発現とメチル化の状態が重要なepigeneticなhallmarkと考えられており、メチル化の異常に関与する重要な遺伝子として転写因子Fli1が知られている。Fli1はEts transcription factor familyに属する転写因子で、特に全身性強皮症においてはそのepigeneticな修飾により、その発現は強皮症皮膚組織の様々な細胞で低下しており、特に皮膚線維芽細胞、血管内皮細胞においてFli1を発現低下させると、それぞれの細胞において全身性強皮症における異常を再現する。さらに申請者らは上皮細胞におけるFli1の発現低下が全身性強皮症の病態に深く関与していることを明らかにした(Takahashi T, Saigusa R et al. J Exp Med. 2017;214:1129-1151)。また、SLEにおいては、Fli1遺伝子の低メチル化が観察され、末梢リンパ球などでその発現上昇が見られ、病勢と相関していることが報告されている。さらにマウスにおいてFli1を過剰発現させるとSLE様の表現型を呈し、逆にSLEマウスモデルでFli1を発現低下させるとB細胞によって産生された自己抗体価の低下やSLEに特徴的な腎炎の抑制などが観察され、SLEに特徴的な免疫異常の病態においてもFli1の発現異常に関与している可能性が報告されている。

2. 研究の目的

膠原病は全身の複数の臓器に炎症が起こり、臓器の機能障害をもたらす一連の疾患群の総称であり、皮膚も侵す疾患として全身性強皮症、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎などが知られている。その病態は未だ不明な点が多く、新規治療開発のためにはその解明が不可欠であるが、近年その病態への $\gamma\delta$ T細胞の関与が注目されている。また、これまでの遺伝学的な多くの検討により、転写因子Fli1の様々な細胞における発現変化が、膠原病の中でも特に全身性強皮症、全身性エリテマトーデスでその発症に関与している可能性が指摘されており、その機序の解明が待たれるところである。そのような背景から、 $\gamma\delta$ T細胞が全身性強皮症および全身性エリテマトーデスの病態において果たす役割を、転写因子Fli1の発現変化に注目しながら明らかにしていくことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、まずはじめに①Fli1遺伝子の発現異常が $\gamma\delta$ T細胞の表現型の変化を誘導するか

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

検討を行い、その上で②表現型の変化に関与する遺伝子プロモーター領域に転写因子 Fli1 が直接転写調節因子として機能するか検討を行う。また、 $\gamma\delta$ T細胞特異的 Fli1 ノックアウトマウスを用いて、③ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの作成および解析、④イミキモド誘発 SLE モデルマウスの作成、解析を行い、それぞれ $\gamma\delta$ T細胞における Fli1 の発現低下が、強皮症及び SLE の病態へ関与するか、さらにはそのメカニズムに関して評価検討する。

4. 研究成果

$\gamma\delta$ T細胞特異的 Fli1 ノックアウトマウスを用いて、強皮症の代表的モデルマウスであるブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスの作成および解析を行った。ブレオマイシン投与により強皮症類似の血管障害が誘導されるが、 $\gamma\delta$ T細胞特異的 Fli1 ノックアウトマウス (Fli1 $\gamma\delta$ TcKO) においてコントロールマウス (Ctrl) に比較して血管障害が増強していた (図1)。さらに Fli1 がノックアウトされた $\gamma\delta$ T細胞 (Fli1 KO $\gamma\delta$ Tc) において、IL-17A の発現を強く誘導することが知られている IL-23 刺激に対する IL-17A の発現が上昇している可能性を見出した (図2)。また、Fli1 がノックアウトされた $\gamma\delta$ T細胞において IL23 受容体の発現が上昇しており、さらに転写因子 Fli1 が IL-23 受容体遺伝子 (*Il23r*) のプロモーター領域に作用している可能性をクロマチン免疫沈降法で示した (図3)。 $\gamma\delta$ T細胞および IL-17A は強皮症の血管障害に重要な役割を果たしている可能性が示唆されており、Fli1 をノックアウトした $\gamma\delta$ T細胞における IL-17A の過発現が強皮症の血管障害に寄与している可能性を示した。SLE モデルマウスに関しては現在モデルマウスを作成し解析を予定している。

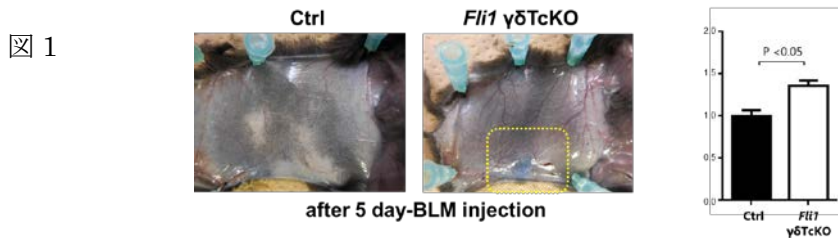


図2 Splenic $\gamma\delta$ TCR⁺ T cells stimulated with IL-23

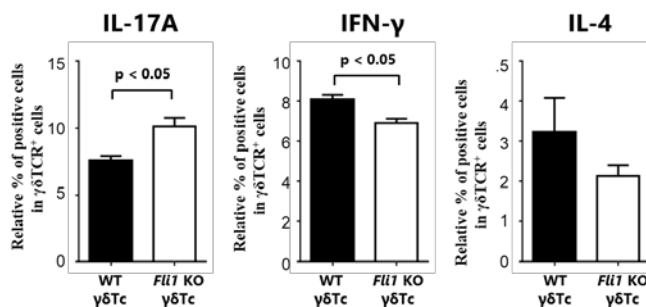
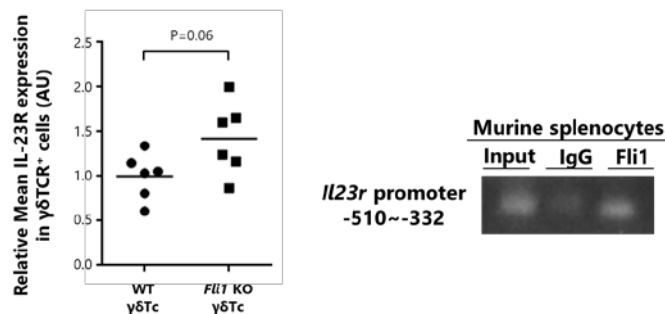


図3



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。