

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：94508

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06933

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答による病原性T細胞の生成と膠原病の発症機序の解明

研究課題名(英文) Studies on the induction of pathogenic T cell by endoplasmic reticulum stress and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus

研究代表者

積山 賢 (Tsumiyama, Ken)

株式会社膠原病研究所・研究部・主任研究員

研究者番号：20514607

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)：全身性エリテマトーデス(SLE)を発症させる病原性T細胞の生成や病態形成における小胞体ストレス応答の関与について検討した。その結果、SLEの発症時において、病原性CD4 T細胞では一部の小胞体ストレス応答経路が特異的に活性化していた。またこの病原性T細胞では、Wntシグナル伝達経路に関わる分子の発現に変化が見られた。病原性T細胞の生成と小胞体ストレス応答の関与をin vivoで検討するために、マウスにSLEを誘導する際に小胞体ストレス誘導剤を投与すると、自己抗体の産生および組織傷害が亢進した。以上より、小胞体ストレス応答により変調したT細胞がSLEの病態形成を促進させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、難病であるSLEの発症機序の一端を明らかにすることができた。この中で、細胞の恒常性を維持する機構である小胞体ストレス応答がT細胞の変調を引き起こし、SLEの病態形成に関与することを示した。これにより、小胞体ストレス応答関連分子を標的としたSLEの治療の可能性を示すことができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined the involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in the induction of pathogenic T cell that causes systemic lupus erythematosus (SLE). We found that when SLE was induced in mice, the expression of unfolded protein response (UPR)-related molecules was increased in CD4 T cells. In these CD4 T cells, the gene expression of several molecules related to Wnt signaling pathway was changed. In vivo administration of ER stress inducer accelerated the production of autoantibody and autoimmune tissue injury. The result suggests that ER stress contributes to the pathogenesis of SLE by modulating the function of T cell.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：全身性エリテマトーデス(SLE) 小胞体ストレス CD4 T細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小胞体ストレスは、細胞内動態や代謝の変調、生体機能の恒常性異常の原因として、医学や細胞生物学など様々な分野からその重要性が注目されている。この小胞体ストレスを回避する機構である小胞体ストレス応答は、近年の詳細な解析により、様々な細胞において機能し、生体の恒常性を保っていることが強く示されている。しかし一方で、小胞体ストレス応答関連分子が疾患の発症や病態形成に関わることも報告されつつある。私達はこれまでに、小胞体ストレス応答による樹状細胞(DC)における抗原のクロスプレゼンテーションの促進が、全身性エリテマトーデス(SLE)の発症に関わることを示した。その根拠は、

- ・ 外来抗原を繰り返し投与すると、健常マウスにSLEの発症が誘導された(Tsumiyama *et al.* PLoS One 4:e8382, 2009)。
- ・ 糸球体腎炎の成因は免疫複合体だけでは不十分で、エフェクターとして細胞傷害性T細胞(CTL)が組織を傷害することを示した。また、SLE発症マウスのCTLを健常マウスに移入すると腎炎が発症した(Tsumiyama *et al.* J Immunol 191:91, 2013)。
- ・ SLE発症マウスのDCでは小胞体ストレス応答関連分子Sec61の発現が増加しており、これにより抗原のクロスプレゼンテーションが促進されてCTLが生成し、腎炎が発症した。一方でSec61を阻害するとCTLは増加せず、腎炎は抑制された。

また小胞体ストレスおよび小胞体ストレス応答は、T細胞においてもその重要性が報告されている。小胞体ストレス応答関連分子は、CD4 T細胞の表現型や活性化に関わること(Cancer Immunol Res 5:666, 2017)や、T細胞による慢性腎炎の病態形成に関与すること(Sci Rep 7:41572, 2017)が示された。

T細胞については、SLEの発症においても重要である事が示唆されている。SLE発症マウスのCD4 T細胞は、抗DNA抗体や抗Sm抗体など自己抗体の産生を誘導するだけでなく、CD8 T細胞をヘルプしてCTLを生成させて、組織傷害を引き起こすことを私達は示した。またこのCD4 T細胞は、IL-21を高産生するCXCR5<sup>hi</sup>ICOS<sup>hi</sup>PD-1<sup>hi</sup>の細胞であることも突き止めた。しかし、このCD4 T細胞がどのようにして生成するのかについては、解明できていない。

近年の報告および私達の研究成果から、小胞体ストレス応答は生体にとって良い働きを行う一方で、その遷延化や増強は細胞の変調を引き起こして炎症の原因となり、延いては疾患の発症に関わる事が推測された。以上の経緯から、「小胞体ストレス応答はT細胞を変調させてSLEの発症を誘導するか？」という疑問が生まれた。

### 2. 研究の目的

本研究は、T細胞が変調して病原性を獲得する過程における小胞体ストレス応答の関与を解析し、SLEの発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。これを達成するために、以下の3点について検討した。

- (1) SLEが発症する際、T細胞で小胞体ストレス応答が働いているか
- (2) 小胞体ストレス応答はどのようにT細胞を変調させるか
- (3) 小胞体ストレス応答はSLEを発症させるか

このように、ストレス応答がT細胞を変調させることで、SLEの発症に寄与するか否かを明らかにするための検討を行った。

### 3. 研究の方法

- (1) SLEが発症する際、T細胞で小胞体ストレス応答が働いているか

SLE発症マウスのT細胞における小胞体ストレス応答関連分子の発現を検討した。

マウスに外来抗原として卵白アルブミン(OVA)を繰り返し投与し、SLEの発症を誘導した(PLoS One 4:e8382, 2009)。

このマウスの脾臓からCD4 T細胞を単離し、タンパク質を抽出して、小胞体ストレス応答関連分子の発現、および活性化をウエスタンブロットにより検討した。

- (2) 小胞体ストレス応答はどのようにT細胞を変調させるか

小胞体ストレス誘導剤を用い、*in vitro*において小胞体ストレス応答により病原性T細胞の生成を誘導できるかを検討した。また、小胞体ストレス応答がどのような分子を介してT細胞の変調に関わるかを検討した。

ナイーブマウスのT細胞を小胞体ストレス誘導剤と共に培養して、小胞体ストレス応答を誘導した。

この細胞について、フローサイトメーターを用いて細胞表面マーカーを解析し、小胞体ストレス応答によって病原性T細胞に似た表現型へと変化するかを検討した。

この細胞を抗CD3/CD28抗体で刺激培養し、培養上清中のサイトカインをELISAによって検出した。

- (1) - のSLEを発症したマウスの脾臓から病原性T細胞を単離し、マイクロアレイ解

析を行い、この細胞における遺伝子発現の変化を検討した。

### (3) 小胞体ストレス応答は SLE を発症させるか

マウスに SLE の発症を誘導する際、小胞体ストレス誘導剤を投与し、病原性 T 細胞の生成および組織傷害の有無、程度を解析した。これにより、小胞体ストレス応答と病原性 T 細胞生成の関連を *in vivo* で解析し、SLE の発症における小胞体ストレス応答の関与を検討した。

マウスに OVA を繰り返し投与し、SLE の発症を誘導した (PLoS One 4:e8382, 2009)。その際、小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンを OVA と共に投与した。

自己抗体の産生を検討するために、血清を回収し、抗 dsDNA 抗体を ELISA により検出した。組織傷害として糸球体腎炎を評価するために、尿を回収して尿中アルブミンを ELISA により検出した。

腎炎を発症させるエフェクター細胞である細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の生成を検討するために、細胞内染色により脾臓の IFN $\gamma$  産生 CD8 T 細胞をフローサイトメーターで検出した。

病原性 CD4 T 細胞をフローサイトメーターで検出し、当該細胞の生成を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) SLE が発症する際、T 細胞で小胞体ストレス応答が働いているか

正常マウスと比較して、SLE を発症したマウスの CD4 T 細胞では、一部の小胞体ストレス応答関連分子 (Bip、eIF2 $\alpha$ 、リン酸化 e-IF2 $\alpha$ ) の発現が増加していた。一方で、小胞体ストレス応答関連分子のうち、CD4 T 細胞における IRE1、PERK 等の発現は、正常マウスと SLE 発症マウスの間に差は見られなかった。これらのことから、SLE の発症時において、病原性 CD4 T 細胞では小胞体ストレス応答が働いており、このうち一部の小胞体ストレス応答経路が特異的に活性化していることが示唆された。

### (2) 小胞体ストレス応答はどのように T 細胞を変調させるか

今回の *in vitro* における短期培養では、小胞体ストレス応答による病原性 T 細胞に似た表現型への変化は見られなかった。また、小胞体ストレス応答によるサイトカイン産生についても、変化は見られなかった。

一方、SLE 発症マウスの病原性 T 細胞におけるマイクロアレイ解析では、Wnt シグナル伝達経路に関わる分子の発現に変化が見られた。このことより、小胞体ストレス応答と Wnt シグナル伝達経路の相互作用が、SLE を発症させる病原性 T 細胞の生成に関与する可能性が示された。

### (3) 小胞体ストレス応答は SLE を発症させるか

SLE の発症を誘導する際にツニカマイシンを投与したマウスでは、ツニカマイシン非投与の SLE 発症マウスと比較して、抗 dsDNA 抗体および尿中アルブミンの上昇が見られたが、統計学的に有意な差ではなかった。また、脾臓の IFN $\gamma$  産生 CD8 T 細胞と病原性 CD4 T 細胞についても、ツニカマイシンの投与により増加傾向が見られたが、統計学的な有意差はなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 積山賢、塩沢俊一
2. 発表標題 SLEの発症を誘導する自己抗体産生誘導性CD4 T細胞（aiCD4 T細胞）の解析；濾胞性ヘルパーT細胞とIL-21産生CXCR5-ICOShiPD-1hi CD4 T細胞
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩沢俊一、積山賢、櫻井恵一、香川英俊、山根隆志、織部元廣、石井宏治、堀内孝彦、吉原良祐、村田美紀、塩沢和子
2. 発表標題 SLE発症の自己臨界点説（SLEが自己臨界点を超える繰り返す抗原刺激の結果発症する）の証明：DOCK8陽性CD4 T細胞=aiCD4 T細胞によるSLEの発症
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiozawa S, Tsumiyama K, Miyazaki Y, Sakurai K, Horiuchi T, Oribe M, Yamane T, Kagawa H, Shiozawa K
2. 発表標題 Systemic lupus erythematosus (SLE) is caused by expanded DOCK8-positive autoantibody-inducing CD4 T (aiCD4 T) cell
3. 学会等名 アメリカリウマチ学会2019（国際学会）
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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