

機関番号：21601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890204

研究課題名（和文）ループス腎炎発症に CD4 陽性 T 細胞が直接関与する

研究課題名（英文）CD4 positive T cells directly associate with development of lupus nephritis.

研究代表者

関根 英治 (SEKINE HIDEHARU)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40363759

研究成果の概要（和文）：転写因子 Interferon regulatory factor 4(Irf4)を欠損する SLE モデルマウス (Irf4<sup>-/-</sup> MRL/lpr) では、自己抗体や免疫複合体が形成されないにも関わらず、細胞増殖性の糸球体腎炎と、脾臓 CD4<sup>+</sup>T細胞数の著明な増加が認められる。同マウスでの腎炎のメカニズムを明らかにするために、同マウスで増殖している CD4 陽性 T 細胞の解析を行ったところ、対照群と比較して Irf4<sup>-/-</sup> MRL/lpr マウスでは IFN- $\gamma$  産生 Th1 細胞、および CD62L<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> のメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞と CD62L<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>のエフェクターCD4<sup>+</sup>T細胞の有意な増加が認められた。Irf4 欠損の SLE モデルマウス NZM2410 系でも同様の解析を行ったところ、軽度の細胞増殖性糸球体腎炎と IFN- $\gamma$  産生 Th1 細胞の増加が認められた。以上の結果から、Irf4 は IFN- $\gamma$  産生性のメモリーTh1 細胞やエフェクターTh1 細胞の分化に関与し、それらの細胞が Irf4 欠損 SLE モデルマウスで観察される免疫複合体非依存性のループス様腎炎へ関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Lupus-prone MRL/lpr mice, that lack interferon regulatory factor 4 (Irf4<sup>-/-</sup> MRL/lpr), develop cellular proliferative glomerulonephritis with significantly increased numbers of splenic CD4<sup>+</sup> T cells, despite lack of antibody production and immune complex (IC) formation. To investigate the underlying mechanisms of the development of nephritis in these mice, CD4<sup>+</sup> T cells proliferating in their spleen were analyzed. Compared to controls, Irf4<sup>-/-</sup> MRL/lpr had significantly increased numbers of IFN- $\gamma$  producing Th1-type cells, and significantly increased numbers of CD62L<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> memory CD4<sup>+</sup> T cells and CD62L<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> effector CD4<sup>+</sup> T cells. Similar results were observed in Irf4<sup>-/-</sup> NZM2410 mice, another murine lupus model. These results suggest that Irf4 associate with the development of IFN- $\gamma$  producing memory and effector Th1 cells, and the association of these cells with the development of non-IC-dependent lupus-like glomerulonephritis observed in Irf4-deficient murine models of human SLE.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、インターフェロン調節因子 4、CD4 陽性 T 細胞、Th1、Th17

## 1. 研究開始当初の背景

代表的な自己免疫性疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) におけるループス腎炎は、免疫複合体の腎への沈着によって補体古典経路の活性化が起こり、一連の補体活性化のカスケードを通じて炎症が惹起されるとされる。したがって、発症には自己抗体産生 B 細胞の存在が必須とされる。しかし、抗体産生性 B 細胞の成熟に必須である転写因子 Interferon regulatory factor 4 (Irf4) を欠損した SLE のモデルマウス (Irf4<sup>-/-</sup> MRL/*Ipr* マウス) では、血清免疫グロブリンや抗 dsDNA 抗体などの自己抗体、腎糸球体への免疫複合体や補体 C3 の沈着が観察されないにも関わらず、細胞増殖性の糸球体腎炎や皮膚炎・耳介壊死も観察され、同マウスにおいて免疫複合体非依存性の腎炎等の炎症のメカニズムの存在が示唆された。同マウスでは、脾臓 CD4 陽性 T 細胞数の著明な増加が認められたことから、ループス腎炎において、免疫複合体非依存性の未知の腎炎のメカニズムが存在し、その病態には CD4 陽性 T 細胞の集団が関与するという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

上記仮説の立証のため、本研究では全エクソンとプロモータ領域を含む Irf4 遺伝子の全領域を mutational recombination にて自然欠損した SLE モデルマウス (Irf4<sup>-/-</sup> MRL/*Ipr* マウス) を用いて、自己抗体 (免疫複合体) 非存在下でも生じる細胞増殖性の腎炎のメカニズムを解明することを目的とした。本研究では同マウスの脾臓で異常増殖している CD4 陽性 T 細胞の集団に着目し、その細胞集団による、同マウスにおける腎炎への関与を明らかにするために以下の研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) Irf4 欠損 MRL/*Ipr* マウスにおける腎炎への CD4<sup>+</sup> T 細胞の関与に関する研究に関して、12 週齢の Irf4<sup>+/+</sup>、Irf4<sup>+/-</sup>、Irf4<sup>-/-</sup> MRL/*Ipr* マウスの脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞を磁気分離法 (MACS) を用いて分離し、PMA/ionomycin で 4 時間刺激した後、サイトカイン産生を細胞内染色にて検出し、IFN- $\gamma$  産生性 Th1 細胞、IL-4 産生性 Th2 細胞、IL-17 産生性 Th17 細胞数をフローサイトメトリーで解析した。確認のため、IFN- $\gamma$  産生性 Th1 細胞、IL-4 産生性 Th2 細胞、IL-17 産生性 Th17 細胞数を ELISPOT 法でも検討した。比較対照として、健常マウスである C57BL/6 系マウスでも

Irf4<sup>-/-</sup> MRL/*Ipr* マウスを 8 世代バッククロスすることで Irf4<sup>+/+</sup>、Irf4<sup>+/-</sup>、Irf4<sup>-/-</sup> C57BL/6 マウスを作成し、同様に Th1 細胞、Th2 細胞、および Th17 細胞数を検討した。

(2) 6、12、および 24 週齢の Irf4<sup>+/+</sup>、Irf4<sup>+/-</sup>、Irf4<sup>-/-</sup> MRL/*Ipr* マウスの脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞におけるナイーブ T 細胞数、メモリー T 細胞数、およびエフェクター T 細胞数を、APC 標識-抗 CD4 抗体、PE 標識-CD62L 抗体、および FITC 標識-抗 CD44 抗体を用いてフローサイトメトリーで検討した。6、12、および 24 週齢の Irf4<sup>+/+</sup>、Irf4<sup>+/-</sup>、Irf4<sup>-/-</sup> C57BL/6 マウスの脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞でも同様に検討した。

(3) 他の SLE モデルマウスである NZM2410 マウスにおいて Irf4<sup>-/-</sup> NZM2410 マウスを作成し、同マウスにおけるループス様腎炎の有無、および脾臓での CD4 陽性 T 細胞の characterization を Irf4<sup>-/-</sup> MRL/*Ipr* マウスと同様に行なった。Irf4<sup>-/-</sup> NZM2410 マウスの作成は、Irf4<sup>-/-</sup> MRL/*Ipr* マウスを NZM2410 マウスに 6 世代バッククロスして作成した。NZM2410 マウスのバックグラウンドの到達度は speed congenics 法で確認しながら行った。30 週齢で屠殺し、腎の病理組織学的検討を行なった。また同週齢における脾臓 CD4 陽性 T 細胞数、および IFN- $\gamma$  産生性 Th1 細胞、IL-4 産生性 Th2 細胞、IL-17 産生性 Th17 細胞数を Irf4<sup>-/-</sup> MRL/*Ipr* マウスと同様にフローサイトメトリーで検討した。

## 4. 研究成果

(1) 全週齢において、Irf4<sup>+/+</sup> および Irf4<sup>+/-</sup> MRL/*Ipr* マウスの両者では Th1 細胞、Th2 細胞、および Th17 細胞が細胞内染色法による FACS 解析法、および ELISPOT 法でもそれぞれ確認された。Irf4<sup>-/-</sup> MRL/*Ipr* マウスでは IL-17 産生性 Th17 細胞が FACS 解析法、および ELISPOT 法でも殆ど確認されなかった。この結果は以前報告された結果と矛盾しなかった (rustle A, et al. Nat Immunol 8:958-966, 2007)。注目すべき点として、Irf4<sup>+/+</sup>、Irf4<sup>+/-</sup> MRL/*Ipr* マウスと比較して、Irf4<sup>-/-</sup> MRL/*Ipr* マウスでは IFN- $\gamma$  産生性の Th1 細胞数の著しい増加が認められた。IL-4 産生性の Th2 細胞数の増加も認められたが、その割合は Th1 細胞数の約 20% であった。したがって、Irf4<sup>-/-</sup> MRL/*Ipr* マウスにおいて認められる細胞増殖性糸球体腎炎や皮膚炎・耳介壊死には自己反応性 B 細胞や Th17 細胞が関与するのではなく、Th1 細胞または Th2 細胞が強く関与している事が示唆された。

健常マウスである C57BL/6 系においても脾臓 CD4 陽性 T 細胞における Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞の検討を行なったところ、野生型と比較して *Irf4*<sup>-/-</sup> C57BL/6 マウスで IFN- $\gamma$  産生性の Th1 細胞数の有意な増加が認められた。しかし 2 4 週齢の *Irf4*<sup>-/-</sup> C57BL/6 マウスでは糸球体腎炎や皮膚炎・耳介壊死などは観察されなかった。以上の結果から、*Irf4*<sup>-/-</sup> C57BL/6 マウスでは Th1 細胞の有意な増加が認められたものの、糸球体腎炎や皮膚炎・耳介壊死などは認められなかったことから、*Irf4*<sup>-/-</sup> MRL/*Ipr* マウスで観察される糸球体腎炎や皮膚炎・耳介壊死は、自己抗体などで構成される免疫複合体依存性のメカニズムによって引き起こされるのではなく、自己抗原反応性の IFN- $\gamma$  産生性 Th1 細胞がその発症のメカニズムに強く関与することが示唆された。

(2) *Irf4*<sup>+/+</sup>、*Irf4*<sup>+/-</sup> MRL/*Ipr* マウスと比較して、*Irf4*<sup>-/-</sup> MRL/*Ipr* マウスでは 12 週齢以降に CD62L<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> のメモリー CD4<sup>+</sup> T 細胞数と CD62L<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> のエフェクター CD4<sup>+</sup> T 細胞数が有意に増加している事が判明した。CD62L<sup>+</sup>/CD44<sup>-</sup> のナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞数は、全週齢を通じてその細胞数に、*Irf4*<sup>-/-</sup> MRL/*Ipr* マウスと *Irf4*<sup>+/+</sup>、*Irf4*<sup>+/-</sup> MRL/*Ipr* マウスとの間で有為差は無かった。健常マウスである C57BL/6 系においても検討を行なったところ、同様の結果を得た。以上の結果から、*Irf4* は CD4 陽性 T 細胞の分化成熟を制御していることが示唆された。

(3) MRL/*Ipr* マウスに比べて軽度であるが、*Irf4*<sup>-/-</sup> NZM2410 マウスでも細胞増殖性糸球体腎炎と IFN- $\gamma$  産生 Th1 細胞の著増が観察され、IRF4 欠損 SLE モデルマウスにおける腎炎のメカニズムとして、著増した Th1 細胞から産生される IFN- $\gamma$  によってメサングウム細胞が活性化され、免疫複合体非依存性の細胞増殖性糸球体腎炎が引き起こされている可能性が示唆された。

すなわち、本研究において IRF4 は B 細胞や Th17 細胞の成熟または維持に必須であり、これらの細胞に対して正の調節因子として作用しているが、Th1 細胞に対しては過剰な成熟または維持について抑制を行う負の調節因子として作用していることが示された。本研究では、SLE モデルマウスにおいて観察されるループス様腎炎において、CD4 陽性 Th1 細胞が直接関与するメカニズムが示唆され、その CD4 陽性 Th1 細胞の調節因子として IRF4 が強く関与することが示された。近年、ループス腎炎では B 細胞を標的とした治療戦略 (rituximab など) が行われてきたが、本研究の結果、CD4 陽性 T 細胞も標的とした治療戦略の必要性も示唆された。

## 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 1 件)

- ① Sekine H, Ferreira RC, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Gilkeson GS, Behrens TW. Comment on "Reassessment of the role of mut S homolog 5 in Ig class switch recombination shows lack of involvement in cis- and trans-switching". J Immunol, 査読有, 182: 2009, 496-497.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Hideharu Sekine, IRF4-Deficient lupus-prone MRL/lpr Mice lack serum Ig/auto-Abs and Th17 cells but develop non-immune complex-mediated diffuse proliferative glomerulonephritis and dermatitis/ear necrosis, American College of Rheumatology 74<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, 平成 22 年 11 月 8 日, Atlanta, USA
- ② 関根英治, ループス腎炎と補体・補体第 2 経路を特異的に標的とする治療戦略、第 47 回補体シンポジウム、第 47 回補体シンポジウム、平成 22 年 9 月 10 日、福島
- ③ Hideharu Sekine, IRF4-deficient lupus-prone MRL/lpr mice lack serum immunoglobulin and glomerular immune complex/C3 deposits but develop diffuse proliferative glomerulonephritis and dermatitis/ear necrosis, 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 平成 22 年 8 月 23 日, Kobe, Japan
- ④ Hideharu Sekine, Targeted inhibition of the alternative pathway ameliorates progression of renal disease in murine models of systemic lupus erythematosus, XXIII International Complement Workshop, 平成 22 年 8 月 3 日, New York, USA
- ⑤ 関根英治, 転写因子 IRF4 欠損 SLE モデルマウスが示唆するループス腎炎の新たなメカニズム、Rheumatology Conference 2010、平成 22 年 6 月 26 日、東京

[図書] (計 1 件)

- ① 関根英治、メジカルビュー社、補体への招待、  
2011年、88-94ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 英治 (SEKINE HIDEHARU)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40363759

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

ゲーリー ギルケソン (GARY GILKESON)  
米国サウスカロライナ州立医科大学・教授  
(Professor of Medicine, Medical  
University of South Carolina, USA)