

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19106

研究課題名(和文) LUBAC欠損型自己炎症性疾患における抗炎症性T細胞の同定と機能解析

研究課題名(英文) A role of anti-inflammatory T cell subset on LUBAC-deficient autoinflammatory diseases

研究代表者

佐々木 克博 (SASAKI, KATSUHIRO)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：70739862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン鎖修飾酵素の一つであるLUBAC複合体は、炎症や免疫との関連が深い細胞内NF- κ Bシグナル経路の活性化を介して、細胞の生存及び組織恒常性を維持する。LUBACの機能が低下したマウスは、細胞死亢進と自然免疫細胞の活性化から、重度の自己炎症性皮膚炎を発症する。本研究では、これまで関与が否定されてきたもう一つの免疫システムである獲得免疫(特にTリンパ球)に着目し、T細胞を主体とした新たな細胞死誘起メカニズムが存在し、自己炎症性皮膚炎の病態形成に寄与していることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC), which is one of ubiquitin ligase family, has critical roles to sufficient activation of canonical NF- κ B signaling and regulation of cell death upon TNFR signaling activation. Spontaneous LUBAC-defective mice, called chronic proliferative dermatitis (cpdm) mice, show enhanced TNF α -induced cell death of the epithelial keratinocytes that induces chronic autoinflammation including severe dermatitis, in which innate immune cells have been recognized to dominantly involve in the inflammatory processes. In this study, we focused on the pathological roles of T cells, which have been ignored because they were rarely detected on the skin lesions. As a result, we concluded that T cells drive progression of the skin cell death and chronic inflammatory environment through a novel mechanism.

研究分野：免疫学

キーワード：炎症 T細胞 Treg 細胞死 自己免疫 自己炎症 LUBAC cpdm

1. 研究開始当初の背景

自然免疫システムの亢進と、それに基づく炎症性サイトカインの過剰産生を特徴とする自己炎症性疾患は、免疫異常に基づき自律的に発症する新しいタイプの慢性炎症性疾患群として知られている。自然免疫と対比される獲得免疫の異常は、T細胞を含むリンパ球を主体とした自己免疫疾患を引き起こすことが明らかであるが、自己炎症の発症における獲得免疫の関与については明らかになっていない。

近年、直鎖状ユビキチン鎖の生成酵素であるユビキチンリガーゼ複合体LUBACの構成因子が、ヒト自己炎症性疾患の原因遺伝子として報告された(引用文献 1,2)。LUBACはSharpin、Hoil-11及び活性中心を持つHoipの三者から構成されている。炎症や生存に重要な役割を担うNF- κ B細胞内シグナルの一部はIKK複合体を介するが、LUBACはIKK複合体中の制御分子NEMO(IKK γ)を基質とし、ユビキチン鎖を生成することで、NF- κ Bシグナルの活性化を担う。また、LUBAC構成因子の一つであるSharpin遺伝子の一塩基欠損マウス(cpdm)が報告されており、全身でSharpinが欠損したこのマウスは、生後、表皮細胞の細胞死亢進を伴い、慢性的な自己炎症様の皮膚炎を発症することが知られている。研究代表者は、これまで否定されてきたcpdmの皮膚炎の病態形成におけるリンパ球の関与を改めて検証することにした。予備実験の結果から、抗炎症性T細胞サブセットであるFoxp3陽性制御性T細胞(T_{reg})がcpdmにおいて減少していることや、SharpinのコンディショナルTgマウスを用いることで、cpdmのT細胞特異的にSharpinの発現を回復させたマウスでは、炎症症状が劇的に寛解することを見出している。

2. 研究の目的

先行研究から、T細胞(T_{reg}を含む)の機能異常が自己炎症の亢進に寄与していることが示唆された。本研究では、全身Sharpin欠損マウスcpdmにおける、T_{reg}の役割に着目し、自己炎症を抑制する抗炎症性T細胞の存在及び、T細胞による自己炎症誘起メカニズムの存在を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)自己炎症発症におけるT_{reg}の関与を探索する。SharpinをT_{reg}特異的に回復させたcpdmマウス(T_{reg}単独でLUBACの発現及び機能が正常化する)を作成し、自己炎症性皮膚炎の発症にT_{reg}が抑制的に関与するか明らかにする。Sharpin欠損時、T_{reg}への影響を遺伝子発現解析や免疫反応抑制機能等を解析することにより明らかにする。

(2)抗自己炎症性T細胞において、特異的に

Sharpinを欠損させたマウスを作成し、自己炎症発症メカニズムの解明を行う。また、研究代表者は、Sharpinに加え、Hoip(LUBACの活性中心を持つ)のコンディショナル欠損マウスを保持しており、これらマウスを用いてLUBACとしての機能障害と自己炎症との関連を探索する。

4. 研究成果

(1)自己炎症様皮膚炎の病態形成におけるT_{reg}の役割を明らかにするために、cpdmとSharpinコンディショナルTg及びFoxp3-Creマウスを交配し、T_{reg}単独でSharpinの発現が回復したcpdm(*cpdm Rosa26-Sharpin/Foxp3^{Cre}*)を作成した。10-12週齢(cpdmでは既に皮膚炎が生じている時期)のマウスを解析した結果、皮膚炎の発症、及び二次的に引き起こされると考えられる肺や肝臓など多臓器における免疫細胞の浸潤が抑制されていた。また、脾臓の肥大や自己炎症様所見である好酸球や好中球といったミエロイド系細胞の全身での増加についても、明らかな改善が認められた。このマウスでは、皮膚炎発症の大幅な遅延が認められたものの、生後4-5ヶ月齢で、皮膚炎を発症し始めることから、cpdmの皮膚炎発症の一つの要因として、T_{reg}内でのSharpinの消失が大きく寄与していることが明らかとなった。これまで、cpdmにおいて、T細胞の関与が疑われてこなかったことを考えると、免疫疾患においては、病理学的観察結果と、病因学的本質とは必ずしも一致しないのではないかという問題を提起した重要な成果であると考えている。

(2)cpdmの皮膚炎においては、表皮細胞内でのSharpin消失が細胞死を招き、慢性的な炎症を引き起こすと考えられている。(1)の解析で作成された*cpdm Rosa26-Sharpin/Foxp3^{Cre}*マウスでは、表皮細胞のアポトーシス細胞死も顕著に抑えられていたことから、T_{reg}を介した免疫抑制状態の破綻もまた、結果として皮膚組織での細胞死を誘導するのではないかと考えられた。そこで、T細胞が主導する皮膚炎を実験的に作り出すため、T_{reg}特異的にSharpinを欠損させたマウス(*Sharpin^{fl/fl}Foxp3^{Cre}*)を作成した。興味深いことに、このマウスは生後、皮膚炎を主体(肺で僅かに炎症所見)とした表現型を示した。脾臓や末梢リンパ節内のT_{reg}を解析したところ、細胞数や存在比率、機能的細胞表面マーカー(GITR、CTLA4等)の発現レベルの変化は認められなかった。しかし、Rag2欠損マウスへのT細胞移入により発症する腸炎モデルを用いて、その抑制を指標としたin vivoにおけるT_{reg}の機能解析を行ったところ、Sharpinを欠損したT_{reg}では腸炎抑制能の消失が認められた。さらに、腸管所属リンパ節の解析から、正常のT_{reg}に比べて、リンパ節内への集積が明らかに少ないことから、炎症

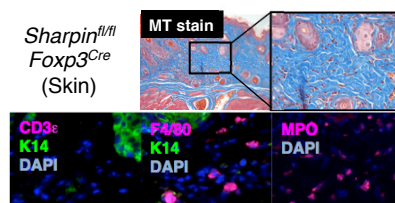
組織への移行や炎症部位での増殖過程に影響があると予想された。マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果、僅かに発現の低下を示す遺伝子群が存在し、その中には、免疫反応抑制能が強いとされるエフェクター T_{reg} 亜群で発現が亢進している遺伝子群 (*CD83*, *Pdcd1*, *Bcl6*, *Tnfrsf9*, *Irf4*, *Egr2*, *Cxcl10*, *IL1r2*) に加え、T細胞が皮膚や腸管を含む末梢組織へ移行する際に必要なホーミングレセプター群 (*Ccr4*, *Ccd6*, *Ccr9*) が検出された。以上の結果から、*Sharpin* 欠損により、 T_{reg} の免疫抑制機能が完全では無く、部分的な障害を受けていることが証明された。T細胞レセプター (TCR) の共刺激因子として NF- κ B シグナルの活性化に寄与する CD28 を T_{reg} 特異的に欠損したマウスにおいても、皮膚炎を主体とした免疫疾患が引き起こされる報告があり (引用文献 3)、*Sharpin* の欠損が、LUBAC の NF- κ B 活性化機能の減弱を導くことが強く示唆された。この点に関しては、*Sharpin* を欠損させた Jurkat 細胞や特定の TCR を持つ T細胞ハイブリドマを TCR 刺激した際に、NF- κ B のシグナルが部分的に減弱する (*Hoip* の欠損では完全に消失する) ことで明らかにしている。

(3) 次に、*Sharpin^{fl/fl}Foxp3^{Cre}* マウスの表現型を詳細に解析した。脾腫やリンパ節腫脹が認められる。 T_{reg} の機能障害であれば、一般的に、末梢免疫寛容の破綻に伴う Tリンパ球を主体とした免疫疾患を発症していると予想された。脾臓、末梢リンパ節内 TCR β 陽性 CD4 及び CD8T 細胞のフローサイトメトリー解析により、これらの T細胞がエフェクター様の活性化細胞表面マーカーの発現パターン (*CD44^{hi}CD62L^{lo}*, *CD69^{hi}*, *GITR^{hi}*, *CD25^{hi}*) を示し、さらに炎症タイプを調べるために T細胞を TCR 刺激後、産生するサイトカインを調べたところ、多くはインターロイキン(IL)-4、5、10、13 を産生することから、ヘルパーT細胞タイプ II (Th2) が関与する特定の炎症反応が有意に亢進していることが証明された。

(4) *Sharpin^{fl/fl}Foxp3^{Cre}* マウスは皮膚炎を主徴とする。皮膚炎発症における T細胞及びその他免疫細胞の関与を組織病理学的観察から理解するために、皮膚組織標本に対して免疫染色を行った。その結果、興味深いことに、病巣にはリンパ球 (B細胞と T細胞) はほとんど検出されず、寧ろ好中球やマクロファージといったミエロイド系の血球細胞が優位に検出された。この組織病理学的観察からは、一般的に自己免疫疾患とは確定できず、*cpdm* の皮膚病理像に酷似していることから、自己炎症様の病態生理が疑われた。*cpdm* の自己炎症性皮膚炎の発症は、表皮細胞での *Sharpin* の欠損と、それに起因する TNF α 依存的細胞死亢進が主因と考えられている。我々は、*Sharpin* を皮膚特異的に欠損

させ、免疫システムに遺伝学的異常が無く、皮膚の自律的細胞死によってのみ進行されるシンプルな自己炎症性皮膚炎モデルマウス (*Sharpin^{fl/fl}K5^{Cre}*) の作成を試みた。このマウスは生後 3 週間ほどで *cpdm* 及び *Sharpin^{fl/fl}Foxp3^{Cre}* と酷似した病理像 (リンパ球の関与は認められない) を示す皮膚炎を発症し、三者の皮膚炎は従来の観点から区別することは不可能であった (図 1)。以上の結果、*Sharpin^{fl/fl}Foxp3^{Cre}* (自己免疫の素因を持つ遺伝学的環境) では、T細胞が自己炎症を誘導しうる可能性を強く示唆した。

図 1. *Sharpin^{fl/fl}Foxp3^{Cre}* 皮膚での自己炎症様 (リンパ球非依存性) 病理学的炎症所見



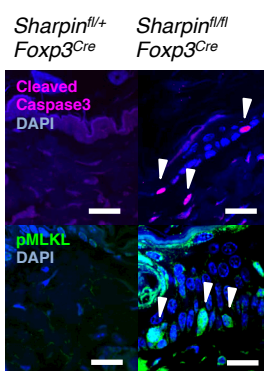
(5) *Sharpin^{fl/fl}Foxp3^{Cre}* で起こる皮膚炎が T細胞依存的であるならば、 T_{reg} による免疫抑制能と T細胞エフェクター機能とのバランスの破綻が皮膚炎に先行していると考えられる。*cpdm* でも同様の原理で皮膚炎が起きていることを検討するため、*Lck-Cre* マウスを用いて、*cpdm* と同様、T細胞系列全てで *Sharpin* を欠損したマウス (*Sharpin^{fl/fl}Lck^{Cre}*) を作成した。このマウスのほとんどは正常に発育し、皮膚炎を発症しない (*Sharpin^{fl/fl}Foxp3^{Cre}* の皮膚炎が T細胞依存的であることを支持した)。しかしながら、10%の確率で *Sharpin^{fl/fl}Foxp3^{Cre}* に酷似した皮膚炎を発症することを見出した。以上の結果は、*cpdm* で T細胞依存的な炎症誘導機構が存在することを示唆した(1)の結果を支持した。

(6) LUBAC は *Sharpin* を含む三者複合体として機能しており、相互が複合体の安定化 (存在維持) に重要である (重要性: *Sharpin* < *Hoil-1* < *Hoip*)。 T_{reg} 内での LUBAC の機能を、更に段階的に低下させる目的で *Hoip* のコンディショナル欠損マウスを利用し、さらに二系統の自己免疫疾患モデルマウスを作成した (LUBAC 機能: *Hoip^{fl/fl}Foxp3^{Cre}* < *Sharpin^{fl/fl}Hoip^{fl/+}Foxp3^{Cre}* < *Sharpin^{fl/fl}Foxp3^{Cre}*)。その結果、LUBAC の障害程度に応じて、 T_{reg} の機能低下に加え、二次リンパ節内 T_{reg} の細胞数及び存在比率の低下が認められた。(3)で示した T細胞の活性化、サイトカイン産生を含むエフェクター機能も段階的に亢進し、組織学的にも、皮膚以外のさらに多くの臓器で免疫細胞の浸潤が明らかに検出された。特に、*Hoip^{fl/fl}Foxp3^{Cre}* マウスは生後 3 週齢前後に 100%の確率で死亡する。この表現型は、 T_{reg} のマスター転写

因子として知られる **Foxp3** を欠損した突然変異マウス **Scurfy** に酷似していることから、**T_{reg}** の恒常性維持に **LUBAC** は必須であることを証明している。以上の同一複合体の構成因子を標的としたマウス遺伝学的解析手法から、これまで理解されてこなかった、段階的な典型的自己免疫症状を容易に比較解析することが可能となった。さらに、温和な自己免疫環境が **Sharpin^{fl/fl} Foxp3^{Cre}** の表現型を誘導していることを証明した。

(7) なぜ、**Sharpin^{fl/fl} Foxp3^{Cre}** は自己炎症様の病理像を示したのか？皮膚の免疫染色の結果から、**Sharpin^{fl/fl} Foxp3^{Cre}** の皮膚では、**cpdm** や **Sharpin^{fl/fl} K5^{Cre}** と同様の自律的細胞死の亢進が認められた。自律的なプログラム細胞死としてよく知られたアポトーシスは、活性型 **Caspase3** の存在を指標に、これらの組織で亢進していることが検出されている。さらに近年、形態学的にはネクrosis様であるが、特定の細胞内シグナルに基づく自律的細胞死メカニズムが明らかになっている。その中で特に詳細に解析されているネクロプトーシス細胞死の皮膚内での存在を、リン酸化 **MLKL** を指標に組織免疫染色により探索したところ、こちらについても皮膚表皮細胞で多く検出された (図 2)。以上の結果は、**Sharpin^{fl/fl} Foxp3^{Cre}** の皮膚では異なるタイプの細胞死が混在し炎症を維持していること、**T** 細胞がその細胞死を直接誘導している可能性を強く示唆した。

図 2. **Sharpin^{fl/fl} Foxp3^{Cre}** 皮膚でのプログラム細胞死の亢進



(8) 実際に、細胞死感受性を持つ **Sharpin** 欠損マウス線維芽細胞 (**MEF**) を用いた *in vitro* culture 実験から、通常検出できないレベルの **TNF α** を介して **T** 細胞が **MEF** に細胞死を誘導することが明らかになった。さらに **TCR** 刺激後には **T** 細胞膜表面に発現する **TNF α** の発現レベルは急激に上昇することを突き止めた。以上の結果をもとに、**TNF α** またはネクロプトーシスの実行因子として知られる **RIPK3** を欠損した **Sharpin^{fl/fl} Foxp3^{Cre}** マウスを作成した。これらのマウスの皮膚の炎症状態を、生後数ヶ月にわたりスコア化し解析した結果、皮膚炎の遅延は認められなかった

ものの、重症度の減弱は有意に認められた。以上の結果から、自己炎症環境における新たな **T** 細胞障害機構として、**T** 細胞が **TNF α** (膜結合型が主体となると考えている) を介して、皮膚構成細胞に対し、アポトーシス及びネクロプトーシスを含む異なる細胞死を誘導するモデルが想定された。実際、マウスでは、遺伝学的なストレタジーから重度の自己免疫症状が誘導されるため、リンパ球の関与が認められない炎症所見は観察されにくいのかもかもしれない。ヒトにおける慢性炎症性疾患群においては、病理学的所見が病名の特定、及び処置方針に繋がることを考えれば、本研究の重要性は言うまでも無い。

<引用文献>

- ① Boisson B, et al. Immunodeficiency, autoinflammation and amylopectinosis in humans with inherited HOIL-1 and LUBAC deficiency. Nat Immunol. 2012 Dec;13(12): 1178-86.
- ② Boisson B, et al. Human HOIP and LUBAC deficiency underlies autoinflammation, immunodeficiency, amylopectinosis, and lymphangiectasia. J Exp Med. 2015 Jun 1;212(6):939-51.
- ③ Zhang R, et al. Requirement for CD28 in effector regulatory T cell differentiation, CCR6 induction, and skin homing. J Immunol. 2015 Nov 1;195(9):4154-61.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)
現在、論文投稿中。

〔学会発表〕 (計 4 件)

- (1) 佐々木克博、**Sharpin** 欠損マウスにおける免疫恒常性の破綻、第 8 回シグナルネットワーク研究会、2016 年
- (2) Katsuhiko Sasaki and Kazuhiro Iwai, LUBAC deficiency of regulatory T cells induces autoinflammatory-like pathology as an alternative autoimmune manifestation. 第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年
- (3) 佐々木克博、直鎖状ユビキチン鎖生成酵素 **LUBAC** による免疫恒常性維持と炎症制御、ConBio2017、2017 年
- (4) 佐々木克博、**LUBAC** による炎症制御機構、第一回ユビキチン研究会、2018 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者
佐々木 克博 (SASAKI, Katsuhiko)
京都大学・大学院医学研究科・特定研究員
研究者番号：70739862