

令和元年6月13日現在

機関番号：32713

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06939

研究課題名(和文) DOCK8陽性CD4陽性T細胞が実験的SLEを発症させる機序と治療標的候補の解明

研究課題名(英文) The role of DOCK8 positive CD4 T cell in pathogenesis of SLE and development of target for SLE

研究代表者

櫻井 恵一 (SAKURAI, KEIICHI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：50805273

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)：全身性エリテマトーデスは、多彩な臓器に病気を引き起こし、非常に重篤となりうる自己免疫疾患である。治療法はどんどん進歩しているが、その病因はいまだわかっていないところが多く、治療の過程で感染症などを起こしてしまうことがある。我々は、実験動物(マウス)でヒトの全身性エリテマトーデスと同様の症状を引き起こす方法を見出した。またそれによって生じる病気に特徴的な細胞を発見した。この細胞の特徴をうまくみだせば、副作用の少ない有効な治療をすることができる可能性がある。その特徴を捉える研究を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者達は、マウスにヒトの全身性エリテマトーデスと類似の病気を人工的に起こすことに成功し、そのマウスを研究し、病気に特異的な細胞を見出した。これをaiCD4T細胞と呼び、その特徴を検討したところ、その細胞に特徴的な表面分子を見出した。この分子をもつ細胞が病気の発症にかかわっている可能性が高いことを実験的に見出した。また、CD4陽性T細胞はT細胞受容体と呼ばれる、自己と非自己を見分ける機構があり、全身性エリテマトーデスではこの認識後の反応に問題があることが考えられている。今回そのT細胞受容体の種類と病気のマウスでの特徴を検討した。この研究が進めば副作用の少ない治療法の開発につながると考える。

研究成果の概要(英文)：Systemic lupus erythematosus(SLE) is the disease, which cause serious damages in various organs. New therapies have been introduced for SLE, but its pathogenesis is still unknown, so severe infections caused by therapy are often big problems. We found the method to induce mice with SLE. And in that SLE mice we found a disease specific T cell subset. We analyzed such subset by molecular biotechnology method, and progress the experience to clarify the character of this cell subset.

研究分野：膠原病

キーワード：全身性エリテマトーデス 自己臨界点説 aiCD4T細胞 自己反応性T細胞 自己抗体

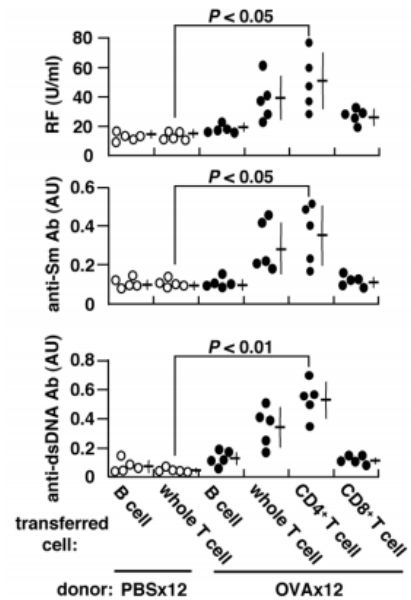
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) の病因は いまだ不明である。そのため、非特異的な免疫抑制による治療に頼らざるを得ず、易感染性がしばしば問題になる。(Fei, Yunyun, et al. *Clinical rheumatology* 33.1 (2014): 57-63.) 今後、疾患の病因を特定しそれに対する特異的な治療の開発が必須と考える。

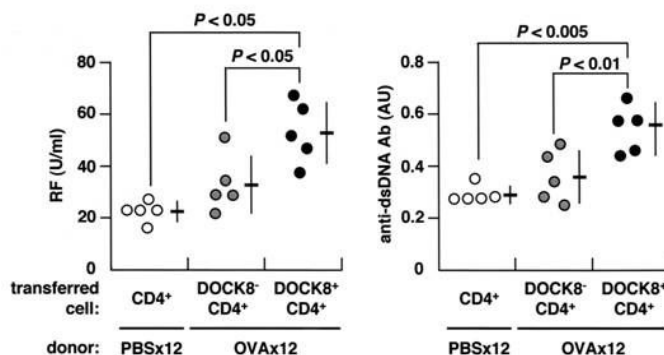
2. 研究の目的

SLE は自己免疫疾患であり、免疫の自己に対する寛容の破綻がその原因の主たるものであると推察される。我々は SLE 発症のバックグラウンドのないマウス (BALB/c) に対するトリ卵白アルブミン (OVA) の繰り返し免疫によってマウスに SLE 様の病態が発症 (自己抗体・腎炎の発症) することを示した。さらにその発症に RAG 遺伝子を発現する auto-antibody induce CD4+T 細胞 (aiCD4+T 細胞) が関与することを見出し、さらに移入実験で確認した (Tsumiyama, Ken, et al. *PLoS One* 4.12 (2009): e8382.) (右図も同じ文献から引用)。同細胞分画を表面マーカーで同定し、その細胞の分子生物学的な SLE 発症に果たす役割を解明することで、将来的な疾患特異的な治療のターゲットが明らかになると考える。



aiCD4+T 細胞について解析を進め、これが細胞表面マーカーである DOCK8 陽性の CD4+T 細胞であると判明した。DOCK8 はもともと欠損患者において高 IgE 血症、重篤なアレルギー症状、免疫不全を呈することが知られている細胞表面分子である (Engelhardt, Karin R., et al. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124.6 (2009): 1289-1302.)。DOCK8 は、PI3K に結合して GEF として cdc42 等を活性化したり、(Lambe, Teresa, et al. " *European journal of immunology* 41.12 (2011): 3423-3435.) TLR シグナル伝達系へ関与したりすることが指摘されているが (Jabara, Haifa H., et al. *Nature immunology* 13.6 (2012): 612-620.)、T 細胞においてもアクチンを介した遊走能への関与が指摘されている (Janssen, Erin, et al. *The Journal of Clinical Investigation* 126.10 (2016): 3837.)。また、自己免疫疾患の一つである多発性硬化症 (MS) のマウス実験モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) において DOCK8 と競合する LRCH1 欠損マウスにおいて重篤な脳炎を引き起こすことが判明している。(Xu, Xiaoyan, et al. *Journal of Experimental Medicine* (2016): jem-20160068.) T 細胞では炎症局所への遊走や免疫シナプスの形成にアクチンの活性化が重要であることは知られており、MS 以外の自己免疫疾患においても DOCK8 陽性 T 細胞が重要な役割を果たしている可能性は十分にあると考えられる。我々はこれらの知見から、aiCD4+T 細胞すなわち DOCK8 陽性 CD4+T 細胞の実験的 SLE の発症に関わる分子メカニズムを解明したい。さらにその知見から、SLE の発症の病因を踏まえた確実な治療を実現させたい。

DOCK8+ CD4+ T cell transfer



(上図: Shiozawa, Shunichi, et al. *Arthritis & Rheumatology* 67 (2015): 2143-2144.)

3. 研究の方法

- (1) DOCK8 ノックアウトマウスおよび DOCK8 トランスジェニックマウスに OVA を繰り返し投与し、実験的 SLE モデルを作成し、DOCK8 の発症への意義を検証する。
- (2) OVA を繰り返し投与することで起こる SLE モデルで誘導された *ai*CD4+T 細胞 (すなわち DOCK8 陽性 CD4+T 細胞) の B 細胞ヘルプについて B 細胞分化を検討する。
- (3) DOCK8 陽性 CD4+T 細胞における T 細胞受容体 (TCR) B 細胞受容体 (BCR) レパトアを解析し、T 細胞/B 細胞のクローナリティーの変化と特徴的な相補性決定領域配列を明らかにする。

4 . 研究成果

DOCK8 陽性細胞が繰り返し OVA 免疫によって誘導される T 細胞であることを確認し、実験的 SLE 発症に關与していることはすでに示している。

ここで OVA 免疫によって SLE で生ずるような B 細胞の異常は T 細胞を介して起こるのであるか？

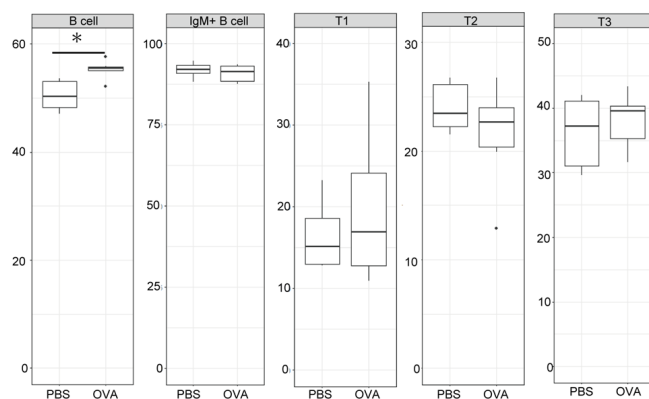
この点について B 細胞のクローナリティーや B 細胞の表面マーカーを使って検討した。

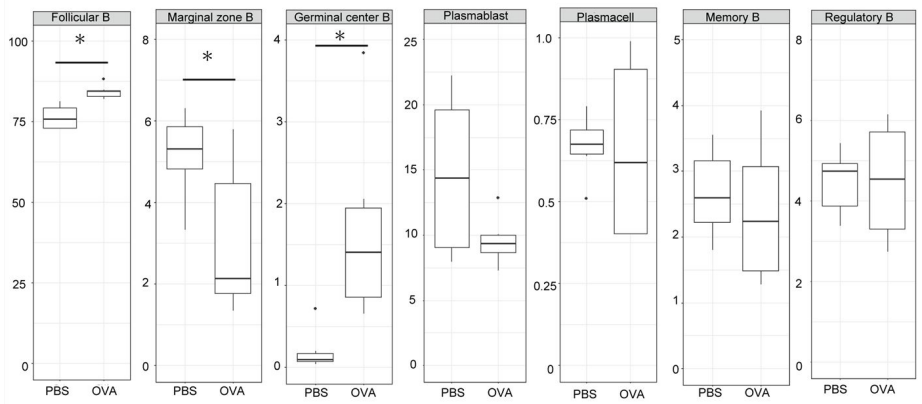
まず、OVA 免疫を行ったマウスの脾細胞では胚中心性 B 細胞が増加しており、T 細胞ヘルプが盛んに起こっている可能性が示唆された。

さらに B 細胞と T 細胞のレパトアを解析した。T 細胞では有意にレパトア多様性は減っている (ポリクローナルな増加が増えている) と考えられた。

一方 B 細胞ではレパトアは逆に増えており、これは T 細胞ヘルプによる体細胞変異の傍証と考えられる。そこで、BCR レパトアの CDR3 配列の相同性を編集距離により解析した。

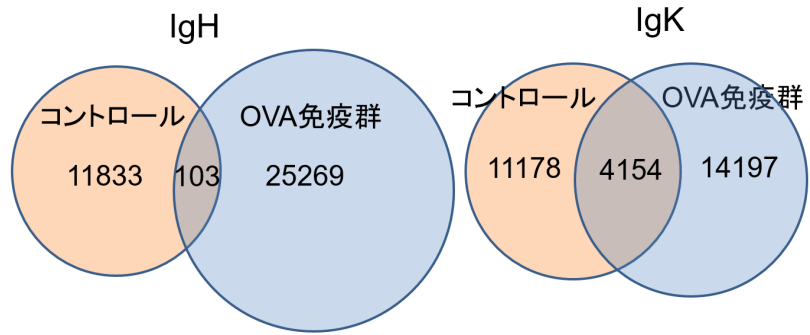
なお、これらの CDR3 と得られた VDJ 配列情報から特徴的な CDR3 配列を持つ TCR の全長配列を再構成し、この ・ 鎖を共に発現するベクターの作成準備を行った。





BCR repertoireのOVA免疫後の変化

OVA群とPBS群のclonotypeから作成したベン図。

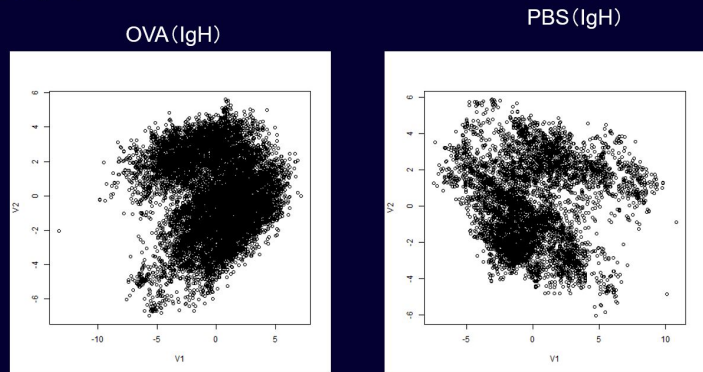


数字はclonotype数

IgHにおいてclonotypeは違いが多い。

BCRのCDR3の特徴

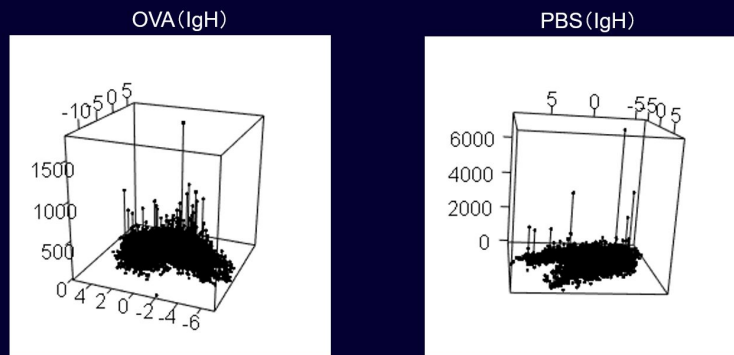
Levenstein距離行列から算出されたMDSのプロット



OVA群では、よりクローンが集まって存在する傾向があるように見える。

BCRのCDR3の特徴

Levenstein距離から算出したMDSプロットに、リード数の情報を組み合わせた



OVA群では、増加しているクローンの周囲に同様に増加しているクローンがみられる傾向があった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

(1) Keiichi Sakurai, Ken Tsumiyama, Shunichi Shiozawa, The contribution of autoantibody-inducing CD4+ T cell (aiCD4 T cell) help to the B cell maturation and possible autoantibody in Systemic Lupus Erythematosus

2018年 The American Association of Immunologists, Immunology 2018 (米国免疫学会)

(2) 櫻井恵一、積山賢、塩沢俊一、SLEの発症における自己抗体産生誘導性CD4 T細胞(aiCD4 T細胞)によるB細胞ヘルプの検証 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会 2018年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

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。