

令和 2 年 4 月 10 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09969

研究課題名(和文) SLEの病態形成における濾胞ヘルパーT細胞分化誘導因子Ascl2の役割の解明

研究課題名(英文) Role of Ascl2 in Tfh cell development in SLE

研究代表者

鈴木 浩太郎 (SUZUKI, KOTARO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90554634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：濾胞ヘルパーT細胞(Tfh細胞)は、全身性エリテマトーデス(SLE)の発症に関与していることが報告されている。近年、ヘリックスループヘリックスファミリーであるAscl2がTfh細胞分化に重要であることが示されたが、SLE発症時のTfh細胞の分化にAscl2が重要であるか否かについては不明だった。今回、CD4陽性T細胞特異的Ascl2欠損マウスにイミキモド誘発性ループスを惹起し、Tfh細胞の分化を解析したところ、コントロールマウスに比してTfh細胞分化が障害されていた。以上よりAscl2がSLE発症時のTfh細胞分化に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

濾胞ヘルパーT細胞(Tfh細胞)は、リンパ節胚中心においてB細胞が抗原高親和性の抗体を産生するのに必須なCD4陽性T細胞のサブタイプであり、全身性エリテマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患の発症にも関与していることが報告されている。近年、ヘリックスループヘリックスファミリーであるAscl2がTfh細胞分化に重要であることが示されたが、自己免疫疾患の発症時におけるTfh細胞の分化にAscl2が重要であるか否かについては不明だった。今回の研究でAscl2がSLE発症時のTfh細胞分化に重要な役割を果たしていることが明らかになり、Ascl2がSLEの治療ターゲットになりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been well known that follicular helper T cells (Tfh cells), a subset of CD4 T cells, are involved in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). In addition, achaete-scute homologue 2 (Ascl2), a basic-helix-loop-helix family member protein, plays an important role in Tfh cell development. However, roles of Ascl2 in Tfh cell development in SLE has been undetermined. In this study, I examined Tfh cell development in a imiquimod-induced lupus model using CD4-specific Ascl2-deficient mice. The number of Tfh cells was decreased in CD4-specific Ascl2-deficient mice as compared with that in control mice. Moreover, expression of CXCR5 and PD-1 on Tfh cells were decreased in CD4-specific Ascl2-deficient mice as compared with that in control mice. These results suggest that Ascl2 plays an important role in Tfh cell development in SLE.

研究分野：リウマチ学

キーワード：濾胞ヘルパーT細胞 SLE CD4陽性T細胞 Ascl2

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)は、本邦で約6~7万人の患者が存在すると推測され、DNA や核蛋白質に対する自己抗体の産生と免疫複合体の組織沈着により起こる多彩な全身性炎症性病変を特徴とする自己免疫疾患である。近年の診断と治療法の進歩により5年生存率は95%を超えるが、ほとんどの症例で寛解と増悪を繰り返し、また治療抵抗性の難治性病態も少なからず存在するため、新規治療ターゲットの同定と特異性の高い治療戦略の確立が急務である。

濾胞ヘルパーT細胞(Tfh細胞)は、抗原刺激時に2次リンパ組織の濾胞内胚中心でB細胞が形質細胞へと分化する上で必須なT細胞であり、感染防御に重要な役割を果たしている。一方、VinuesaらはRNA結合蛋白であるRoquinの変異マウス(Sanroqueマウス)の解析により、Sanroqueマウスでは、1) Tfh細胞が増加し、濾胞形成が亢進すること、2) ICOS発現の増加によりTfh細胞が増殖し、IL-21産生が増加すること、3) 抗核抗体や抗ds-DNA抗体が出現し、糸球体腎炎などヒトSLEに類似した表現型を示すことを報告し、SLEの病態形成におけるTfh細胞の重要性を提唱した(Nature 2005 435:452)。ヒトSLEにおいてもChoiらは1) SLE患者の末梢血中でCXCR5^{high} ICOS^{high} PD-1^{high}のTfh様細胞が健常者に比して増加していること、2) SLE患者の末梢血中で増加しているTfh様細胞はIL-21を産生していること、3) 末梢血中のTfh様細胞上のPD-1発現がSLEDAIや抗ds-DNA抗体の陽性率と関連することを報告している(Arthritis and Rheumatol. 2015 67:988)。以上より、Tfh細胞がSLE病態形成に重要な役割を果たしていることが強く示唆されているが、Tfh細胞を標的としたSLEの治療法は未だ確立されていない。

Tfh細胞の分化メカニズムに関しては、B-cell CLL/lymphoma 6(BCL-6)が、GC Tfh細胞の分化に重要な役割を果たしていることが広く知られているが(Crotty S, Ann Rev Immunol 2011 29:621)、近年、basic-helix-loop-helix転写因子群のひとつであるAchaete-scute homologue 2 (Ascl2)がBCL-6の下流分子としてGC Tfh細胞分化に重要な役割を果たすことが報告された(Liu X, Nature 2014 507:513)。しかし、Ascl2のSLEの病態形成における役割は依然不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、1) CD4陽性T細胞特異的なAscl2欠損マウスを用いたSLEモデルの解析、2) Ascl2によるTfh細胞分化の解析により、Ascl2とその標的分子のTfh細胞とSLEの病態形成における役割を明らかにし、Ascl2をターゲットとしたSLEの新規治療法の開発に向けた基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

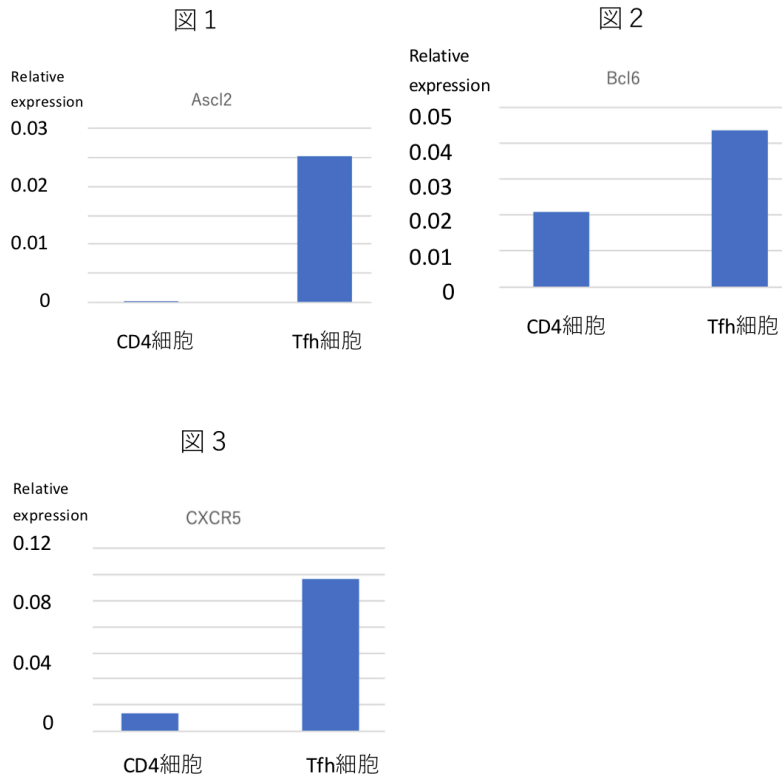
CD4陽性T細胞特異的Ascl2欠損マウス(CD4-Cre x Ascl2-floxedマウス)とコントロールマウスにTLR7アゴニストであるイミキモドを塗布してヒトループス様病態を惹起する(イミキモド誘導性ループス)。イミキモド塗布開始後、マウスを解剖後脾臓を採取し以下の解析を行う。

- 1) Cell sorterを用いてCXCR5+PD-1+ FOXP3-CD4+細胞(Tfh細胞)をsortし、ASCL2 mRNA、CXCR5 mRNA、BCL6mRNAの発現をqPCR法にて定量する。
- 2) FACS解析によりCXCR5+PD-1+FOXP3-CD4+細胞(Tfh細胞)を解析し、脾臓中のTfh細胞数を解析する。さらにCD4+細胞におけるTfh細胞割合を検討する。
- 3) FACS解析によりTfh細胞に発現するCXCR5やICOSの発現レベルを解析する。

4. 研究成果

- 1) イミキモド誘発性ループスにおけるTfh細胞発現遺伝子

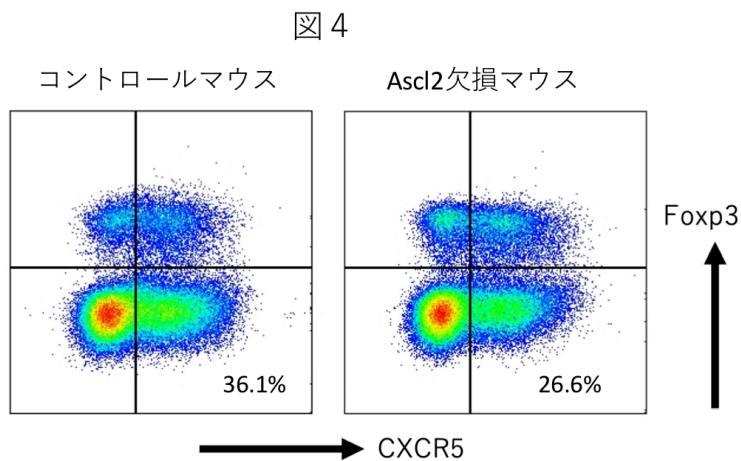
野生型マウスに TLR7 アゴニストであるイミキモド誘導性ループスを惹起し、イミキモド塗布開始4週後に脾臓を採取し Cell sorter を用いて CXCR5+PD-1+ FOXP3-CD4+細胞(Tfh 細胞)を sort し、ASCL2 mRNA、CXCR5 mRNA、BCL6mRNA の発現を qPCR 法にて定量した。コントロールとして CD4 陽性 T 細胞も sort し、同様の実験を行なった。

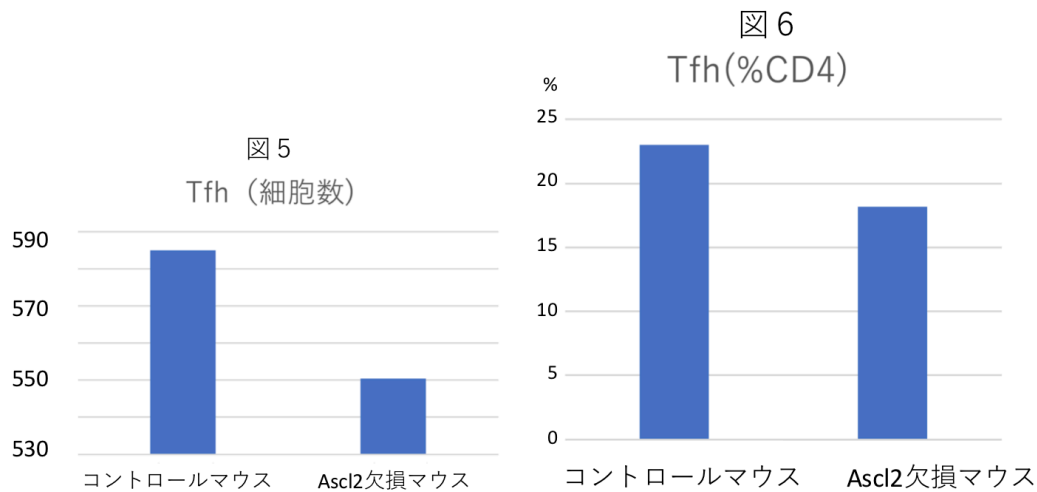


ASCL2 mRNA (図 1)、BCL6mRNA (図 2)、CXCR5mRNA (図 3) の発現は Tfh 細胞で優位に上昇していた。

2) イミキモド誘発性 ループスにおける Tfh 細胞分化

CD4 陽性 T 細胞特異的 Ascl2 欠損マウス(CD4-Cre x Ascl2-flxed マウス)とコントロールマウスに TLR7 アゴニストであるイミキモド誘導性ループスを惹起し、イミキモド塗布開始4週後に脾臓を採取し、FACS 解析により CXCR5+PD-1+FOXP3-CD4+細胞(Tfh 細胞)を解析し、脾臓中の Tfh 細胞数を解析する。さらに CD4+細胞における Tfh 細胞割合を検討した。

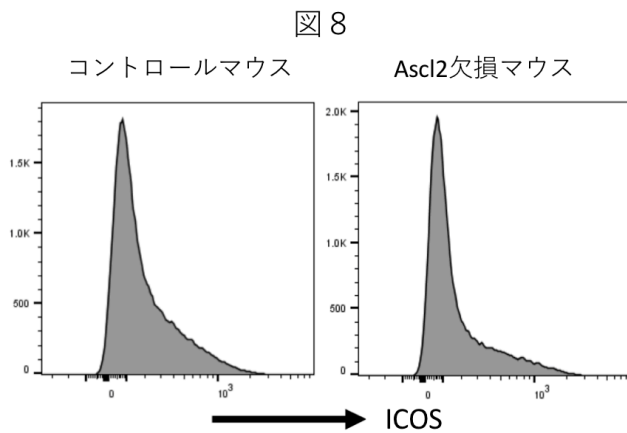
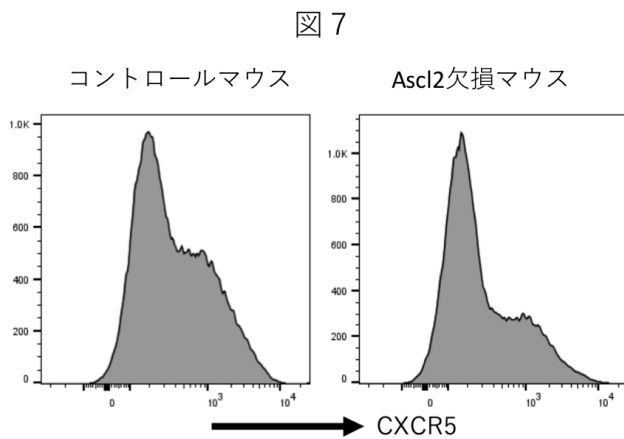




Tfh 細胞は、CD4 特異的 Ascl2 欠損マウスにおいて減少していた (図 4、図 5、図 6)。また、

3) イミキモド誘発性 ループスにおける Tfh 細胞上 CXCR 5、PD-1 の発現

CD4 陽性 T 細胞特異的 Ascl2 欠損マウス(CD4-Cre x Ascl2-floxed マウス)とコントロールマウスに TLR7 アゴニストであるイミキモド誘導性ループスを惹起し、イミキモド塗布開始4週後に脾臓を採取し、FACS 解析により Tfh 細胞に発現する CXCR5 や ICOS の発現レベルを解析した。



Tfh 関連分子である、CXCR5 (図 7) や ICOS (図 8) の発現は、CD4 特異的 Ascl2 欠損マウスで減弱していた。

これまで、Ascl2 が Tfh 細胞の分化に重要な役割を果たしているという報告は散見されていたが、SLE 発症時の Tfh 細胞分化における Ascl2 の役割に言及したものはなかった。本研究では、イミキモド誘導性ループスモデルを用いて、SLE 発症時の Tfh 細胞分化における Ascl2 の役割を明らかにした点が新規の知見となる。当初の計画では末梢血中における Tfh 細胞についても解析する予定であったが、イミキモド塗布開始 4 週間後においては、末梢血中の Tfh 細胞数は少なかった。今後はイミキモド塗布 8 週間後や 12 週間後の末梢血中の Tfh 細胞についても解析する予定である。今回の研究では、Tfh 細胞に限定して解析を行なったが、今後は、CD4 細胞特異的 Ascl2 欠損マウスにイミキモド誘発性 ループスを惹起した時の、抗 double-strand DNA 抗体 (抗 dsDNA 抗体) 価や胚中心 B 細胞、胚中心の形成、さらに糸球体腎炎などのヒトループスで見られる内臓病変についても解析を加える予定である。

以上の結果より、Ascl2 がイミキモド誘導性ループスにおける Tfh 細胞分化や抗 double-strand DNA 抗体 (抗 dsDNA 抗体) 価や胚中心 B 細胞、胚中心の形成、さらに糸球体腎炎などのヒトループスで見られる内臓病変に重要な役割を果たしていることが明らかになれば、Ascl2 をターゲットにした新たな SLE 治療の基盤が構築されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka S, Suto A, Iwamoto T, Kageyama T, Tamachi T, Takatori H, Suzuki K, Hirose K, Ohara O, Lefebvre V, Nakajima H.	4. 巻 215
2. 論文標題 Sox12 promotes T reg differentiation in the periphery during colitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Exp Med.	6. 最初と最後の頁 2509-2519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20172082.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Makita S, Takatori H, Tamachi T, Suto A, Suzuki K, Nakajima H.	4. 巻 Sep;67S
2. 論文標題 Analyses of dermal innate lymphoid cells in mice lacking T-bet and STAT6.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Allergol Int.	6. 最初と最後の頁 S51-S53.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2018.05.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furuya H., Ikeda K., Iida K., Suzuki K., Furuta S., Tamachi T., Suzuki K., Miura G., Hiraguri M., Hase R., Hikosaka K., Norose K., Nakajima H.	4. 巻 28
2. 論文標題 Disseminated toxoplasmosis with atypical symptoms which developed with exacerbation of systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lupus	6. 最初と最後の頁 133 ~ 136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0961203318815583	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato Manami, Ikeda Kei, Kageyama Takahiro, Kasuya Tadamichi, Kumagai Takashi, Furuya Hiroki, Furuta Shunsuke, Tamachi Tomohiro, Suto Akira, Suzuki Kotaro, Nakajima Hiroshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Successful Treatment for Refractory Interstitial Lung Disease and Pneumomediastinum With Multidisciplinary Therapy Including Tofacitinib in a Patient With Anti-MDA5 Antibody-Positive Dermatomyositis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCR: Journal of Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/RHU.0000000000000984	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Furuya H, Ikeda K, Miyachi K, Nakamura K, Suzuki K, Furuta S, Tamachi T, Hirose K, Sakagami T, Nakajima H
2. 発表標題 An important differential diagnosis of SAPHO syndrome: disseminated nontuberculous mycobacterial infection with neutralizing anti-IFN autoantibody in apparently immunocompetent patient.
3. 学会等名 21st APLAR Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤愛美、池田 啓、影山貴弘、粕谷忠道、熊谷崇、古矢裕樹、古田俊介、玉地智宏、須藤 明、鈴木浩太郎、中島裕史
2. 発表標題 トファシチニブを含めた集学的治療により救命し得た、治療抵抗性間質性肺炎・縦隔気腫を伴う抗MDA5抗体陽性皮膚筋炎の一例
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 福田匡志、鈴木浩太郎、田中 繁、鈴木一正、岩田有史、古田俊介、玉地智宏、池田 啓、前澤裕子、須藤 明、中島裕史
2. 発表標題 ポドサイトに発現する suppressor of cytokine signaling 3(SOCS3) はイミキモド誘発性ループスにおける糸球体腎炎を抑制する
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 上原悠治、玉地智宏、策愛子、影山貴弘、岩田有史、鈴木浩太郎、廣瀬晃一、中島裕史
2. 発表標題 コーヒー(green coffee bean GCB))焙煎によるI型アレルギーの1例
3. 学会等名 第67回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2018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
研究 分担 者	中島 裕史 (NAKAJIMA HIROSHI) (00322024)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	