

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09976

研究課題名(和文) ガレクチン9ノックアウトモデルマウスを用いたSLEの病態制御機構の解析

研究課題名(英文) Lgals9 deficiency attenuates nephritis and arthritis in lupus model

研究代表者

川畑 智子 (Kawabata, Tomoko)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90600669

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)：SLEにおけるガレクチン(Gal)-9の病態への関与を解明するため、代表的自然発症SLEモデルマウスであるMRL/lprマウスおよび誘導系疾患モデルであるプリスタン投与Balb/c背景Gal-9欠損マウスを用いて表現型の差異を検討した。両モデルとも、dsDNA抗体産生やB細胞分化には差異を認めなかったが、プリスタン投与系ではGal-9欠損マウスにおいて腎炎及び関節炎の進展が抑制された。プリスタン投与Gal-9欠損Balb/cマウスの表現型の差異は、正常型マウスで認められたプリスタン投与部位におけるlipogranuloma形成が抑制されていることに起因すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガレクチン-9 (Galectin 9; Gal-9)は我々が最初に発見した分子であり、免疫関連組織や細胞を含む種々の臓器に広く発現している。全身性エリテマトーデス(SLE)をはじめとした自己免疫疾患への治療応用を念頭においた病態解明が求められるが、未だ不明な点も多い。しかし本研究では誘発系疾患モデルであるGal欠損マウスに対してプリスタン投与を行った結果、関節炎や腎症の活動性が低下、またlipogranulomaの形成が抑制された。Gal-9の拮抗は活性化マクロファージを介して、SLE腎症や関節炎の治療に効果ある可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Galectin 9 (Gal-9, Lgals9) is a b-galactoside-binding lectin that has been used for clinical application in autoimmune diseases. This study was undertaken to investigate whether deficiency of Lgals9 has beneficial or deleterious effects on lupus in a murine model. Lgals9 deficiency protected against the development of immune complex glomerulonephritis, arthritis, and peritoneal lipogranuloma formation in BALB/c mice in this murine model of pristane-induced lupus. Furthermore, Lgals9 deficiency protected against pristane-induced lupus without altering the Toll-like receptor type 1 interferon pathway. Gal-9 is required for the induction and development of lupus nephritis and arthritis in this murine model of SLE. The results of the current investigation provide a potential new strategy in which antagonism of Gal-9 may be beneficial for the treatment of nephritis and arthritis in patients with SLE through targeting of activated macrophages.

研究分野：リウマチ

キーワード：SLE ガレクチン9

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ガレクチン-9 (Galectin 9; Gal-9)は我々が最初に発見した分子であり、免疫関連組織や細胞を含む種々の臓器に広く発現している。Gal-9 及びその受容体である Tim-3 を介した免疫応答に関する多くの報告から、全身性エリテマトーデス (SLE) をはじめとした自己免疫疾患への治療応用を念頭においた病態解明が求められるが、未だ不明な点も多い。現時点で SLE における免疫応答と臓器障害についての一定の見解は得られていない。特に Gal-9 の作用は Tim-3 に依存する系と独立する系が存在し、かつ各種細胞サブセットにより抗炎症性に働く系と炎症を惹起する系が混在しており、治療効果や副作用を検証する上で、Gal-9 ノックアウト疾患モデルでの表現型の検証は必要不可欠である。本研究では Gal-9 ノックアウトモデルマウスを用い、SLE の病態制御機構の解析をおこなう。

2. 研究の目的

SLE におけるガレクチン (Gal)-9 の病態への関与を解明するため、代表的自然発症 SLE モデルマウスである MRL/lpr マウスおよび誘導系疾患モデルであるプリスタン投与 Balb/c 背景 Gal-9 欠損マウスを用いて表現型の差異を検討する。

3. 研究の方法

代表的自然発症 SLE モデルマウスである MRL/lpr マウスおよび誘導系疾患モデルであるプリスタン投与 Balb/c 背景 Gal-9 欠損マウスを用いて表現型の差異を検討した。最初に Gal-9 欠損 SLE モデルマウスの作成を行った。Gal-9^{-/-}MRL/lpr ♀と対照群として同一週齢の野生型 MRL/lpr ♀ (Gal-9^{+/+}MRL/lpr)、及び Gal-9 ヘテロノックアウト MRL/lpr ♀ (Gal-9^{+/-}MRL/lpr)を用いた。

BALB/c ♀ (Gal-9^{+/+} BALB/c) と BALB/c ♀ (Gal-9^{-/-} BALB/c) マウスにプリスタン腹腔内投与を行い尿たんぱく定量、関節炎の肉眼所見と組織所見を評価しスコア化した。免疫蛍光染色法 (IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, C3)及び PAM 染色を用い、腎炎の活動性評価として糸球体及び間質の浸潤細胞の程度と種類を同定した。Lipogranuloma, 脾臓、リンパ節の組織染色を行い胚中心形成の差異を検討した。MRL/lpr ♀ (Gal-9^{-/-} MRL/lpr) 並びに MRL/lpr ♀ (Gal-9^{+/+} MRL/lpr)においても同様の解析を行った。

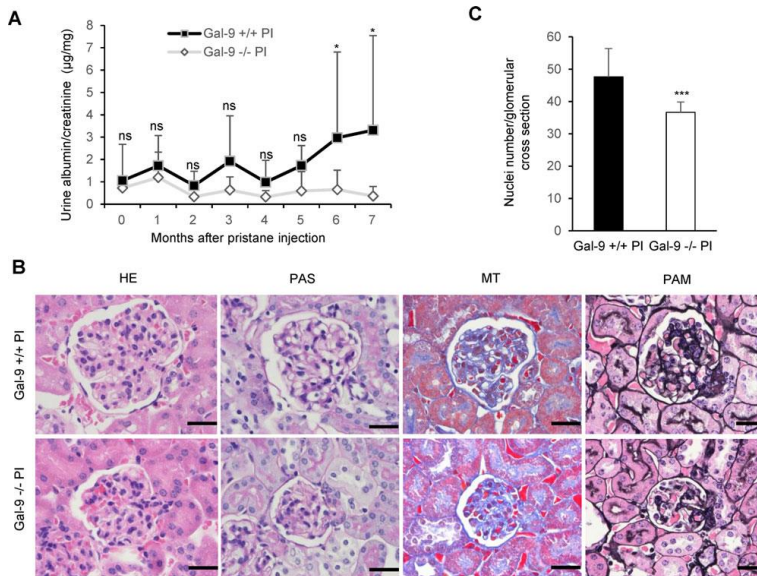
BALB/c ♀ (Gal-9^{+/+} BALB/c) と BALB/c ♀ (Gal-9^{-/-} BALB/c) マウスにプリスタン腹腔投与後の関節や lipogranuloma、腹膜マクロファージより、mRNA を抽出し real-time PCR にて各種サイトカインの定量を行った。MRL/lpr ♀マウスの脾臓、腹膜や腋窩リンパ節より Flow Cytometer にて濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh;CD4+CXCR5+Bcl-6+PD-1high) 及び胚中心 B 細胞 (GC B cells;B220+ AA4.1-FAS+GL-7+) の差異を検討した。

BALB/c、MRL/lpr マウスの血清より ELISA 法にて抗 ds-DNA 抗体価、抗 RNP 抗体、補体、IgG を測定した。Western Blot にて Gal-9、GAPDH 等、蛋白定量を行った。BALB/c ♀ (Gal-9^{+/+} BALB/c) と BALB/c ♀ (Gal-9^{-/-} BALB/c) マウスにプリスタン腹腔内投与後 24 時間の腹膜マクロファージを単離培養し、Toll like receptor (TLR) リガンドにて刺激し、mRNA を抽出し各種サイトカインを定量した

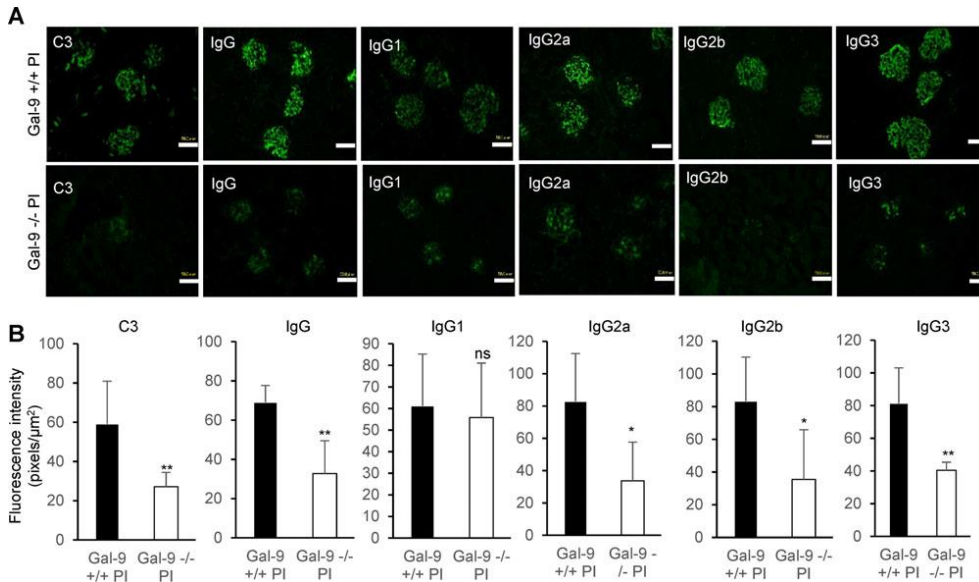
4. 研究成果

SLE におけるガレクチン (Gal)-9 の病態への関与を解明するため、代表的自然発症 SLE モデルマウスである MRL/lpr マウスおよび誘導系疾患モデルであるプリスタン投与 Balb/c 背景 Gal-9 欠損マウスを用いて表現型の差異を検討した。

(1) BALB/c (Gal-9+/+) マウスでは BALB/c 背景 Gal-9 欠損マウスと比較して、下図で示すようにと比較してプリスタン投与後 6 か月以降にて尿中アルブミン/Cr 値の有意な上昇を認め、7 か月後の糸球体内の核数や糸球体のサイズ増加やメサンギウム領域の拡張なども伴っていた。しかし MRL/lpr (Gal-9^{-/-} MRL/lpr) マウスでは MRL/lpr (Gal-9^{+/+} MRL/lpr) マウスと比較して腎炎の活動性の差異は認められなかった。



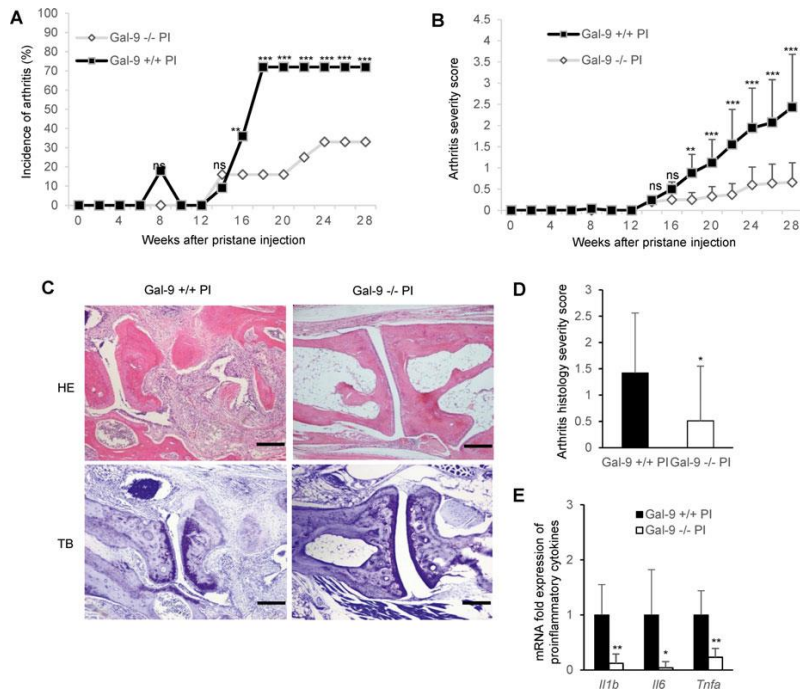
(2) Balb/c 背景 Gal-9 欠損マウスの腎組織では BALB/c (Gal-9+/+ PI) マウスと比較して IgG、IgG サブクラス、C3 染色において有意に糸球体の免疫複合体の沈着が減少していた。



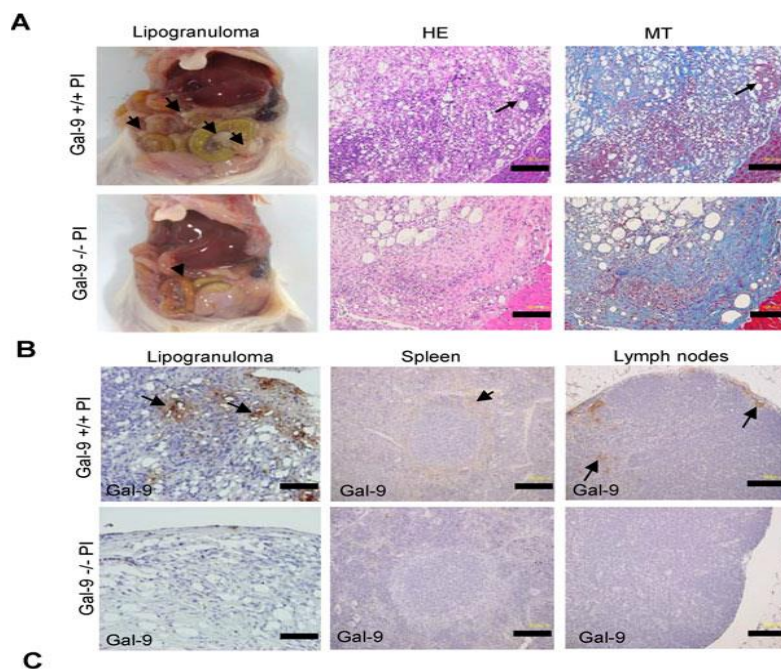
MRL/lpr (Gal-9^{-/-} MRL/lpr) では MRL/lpr (Gal-9^{+/+} MRL/lpr) マウスでは両群とも IgG 沈着の差異は認めなかった。

(3) 血清学的検査で Balb/c 背景 Gal-9 欠損マウスは BALB/c (Gal-9+/+ PI) マウスと比較して IgG は有意に減少していたが、抗 dsDNA、抗 RNP 抗体については有意差を認めなかった。

(4) 関節所見では BALB/c (Gal-9+/+ PI) マウスは Balb/c 背景 Gal-9 欠損マウスと比較して関節炎の発症率とスコアは上昇し、有意差を認めた。関節の TNF α 、IL-6、IL1 β mRNA は共に有意に高値を示した。



(5) 腹腔内の Lipogranuloma は BALB/c (Gal-9+/+ PI) マウスは Balb/c 背景 Gal-9 欠損マウスと比較して多く認められた。Lipogranuloma、脾臓やリンパ節内では濾胞様の構造を多く認めた。BALB/c (Gal-9+/+ PI) と Balb/c (Gal-9-/- PI) において脾臓やリンパ節におけるフローサイトメトリーでは特に B 細胞や T 細胞サブセットの差は認められず、Gal-9-/-MRL/lpr の脾臓では Gal-9+/+MRL/lpr と比較して有意に double negative T 細胞数の減少を示した。



(6) プリスタン投与後に腹腔内に集積するマクロファージ数、及び腹腔内マクロファージの TLR7-IFN-I 系のシグナル伝達経路の検討を行った。Balb/c 背景 Gal-9 欠損マウス ではプリスタン投与後に Gal-9+/+と比較して腹腔内に集積するマクロファージ数で差は認めなかった。腹腔内マクロファージの TNF α mRNA は Gal-9 欠損マウスにて減少を示したが、ISGs (Mx1, Cxcl10, and Irf7) ならびに IFN-I 系シグナル(Ccl2, Ccl17, and Ccl12)は差を認めず、TLR7-IFN-I 系の

シグナル伝達経路は両群で差を認めなかった。lipogranuloma は Gal-9^{-/-}/PI マウスにて有意にリンパ濾胞様構造の形成が減少した。また Tim-3 抗体投与による明確な効果が得られず、Galectin-9-Tim-3 以外の経路の存在が示唆された。

以上の結果より、Balb/c、MRL/lpr の両モデルとも、dsDNA 抗体産生や B 細胞分化には差異を認めなかったが、Balb/c マウスのプリスタン投与系では Gal-9 欠損マウスにおいて腎炎及び関節炎の進展が抑制された。しかし、I 型インターフェロン系を経由しなかった。プリスタン投与 Balb/c 背景 Gal-9 欠損マウスの表現型の差異は、Gal^{+/+}マウスのプリスタン投与部位における lipogranuloma 形成が抑制されていることに起因すると考えられた。本研究では Gal-9 の拮抗は活性化マクロファージを介して、SLE 腎症や関節炎の治療に効果があることを示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zeggar S, Watanabe KS, Teshigawara S, Hiramatsu S, Katsuyama T, Katsuyama E, Watanabe H, Matsumoto Y, Kawabata T, Sada KE, Niki T, Hirashima M, Wada J.	4. 巻 70
2. 論文標題 Role of Lgals9 Deficiency in Attenuating Nephritis and Arthritis in BALB/c Mice in a Pristane-Induced Lupus Model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arthritis Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 1089-1101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.40467	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----