

令和元年6月17日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15454

研究課題名(和文) FGF21の自己免疫および腫瘍免疫に及ぼす影響と治療への応用

研究課題名(英文) Effect of Fgf21 on autoimmunity and tumor immunity

研究代表者

増田 有紀 (Masuda, Yuki)

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40421284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺における自己反応性T細胞の排除、すなわち中枢性免疫寛容は、髄質胸腺上皮細胞または樹状細胞(DC)との相互作用により成立し、破綻すると自己免疫疾患を発症する。線維芽細胞増殖因子21(Fgf21)は胸腺上皮細胞で発現し、傍分泌的にT細胞分化に関与することが示唆されたが、個体の末梢T細胞応答への影響は不明であった。Fgf21ノックアウトおよび野生型マウスに実験的自己免疫性脳脊髄炎を誘導すると、ノックアウトマウスでは症状が悪化した。このメカニズムとして、Fgf21は胸腺で直接あるいは間接的にDCに作用することで未熟な自己反応性T細胞を除去し、自己免疫の抑制に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患の多くは難治性で、原因も明確でないことから難病に指定されており、その発症機序の解明や新たな治療法の開発が求められている。本研究では、臨床症状や免疫学的側面において多発性硬化症と多くの共通点を示す疾患モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎を用いてFgf21の影響について検討した。本研究でFgf21が自己免疫を抑制することが示唆されたため、Fgf21を用いた自己免疫疾患の新たな治療法の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In the thymus, medullary thymic epithelial cells (TECs) and dendritic cells (DCs) regulate central tolerance through elimination of autoreactive T cells. Disruption of self-tolerance induces autoimmune diseases. We have previously shown that Fibroblast growth factor 21 (Fgf21) is expressed in TECs and acts as intrathymic cytokine, inducing thymocyte development. However, the effect of Fgf21 on peripheral T cell response is still unknown. This study shows that knockout of Fgf21 accelerated progression of experimental autoimmune encephalomyelitis, and Fgf21 knockout mice showed lower thymic DCs and higher T cell infiltration into central nervous system than wild-type mice. These results suggest that Fgf21 could inhibit autoimmune response, by directly or indirectly increased thymic DCs which facilitate elimination of autoreactive T cells, and shed light on its potential as a therapeutic target.

研究分野：免疫学

キーワード：Fgf21 胸腺 実験的自己免疫性脳脊髄炎 樹状細胞

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

1. 研究開始当初の背景

線維芽細胞増殖因子 21 (Fgf21) は、主に肝臓で産生され、糖・脂質代謝を調節すると考えられている。一方で、Fgf21 が肝臓と同じく胸腺でも発現していることから、胸腺由来の Fgf21 が胸腺機能調節に関わる可能性が考えられた。

胸腺では、哺乳類において免疫応答の中心を担う T 細胞が、自己に寛容で非自己に応答する CD4⁺ のヘルパー T 細胞と CD8⁺ の細胞傷害性 T 細胞へと分化する。骨髄から胸腺へ移行したばかりの前駆細胞は、CD4、CD8 を両方発現しておらずダブルネガティブ (DN) 細胞と呼ばれる。これらは CD4、CD8 を共に発現するダブルポジティブ (DP) 細胞へと分化し、皮質胸腺上皮細胞 (cTEC) の MHC 分子に親和性を持った細胞が選択され (正の選択) 親和性の低すぎる細胞はアポトーシスにより排除される。生き残った細胞は CD4 あるいは CD8 のみを発現するシングルポジティブ (SP) 細胞となり、髄質胸腺上皮細胞 (mTEC) および樹状細胞 (DC) 上の MHC 分子と強く結合する自己反応性の T 細胞のみがアポトーシスにより排除され (負の選択) 生き残った細胞が成熟 T 細胞として末梢へと移行する。

これまでの研究で、Fgf21 が胸腺で成熟 mTEC に特異的に発現することを明らかにした。また Fgf21 ノックアウト (KO) マウス胸腺の解析や、胎児胸腺器官培養に対する組換え Fgf21 タンパクの添加実験などから、Fgf21 は胸腺において T 細胞の選択を調節し、分化を促進している可能性を見出した (Sci Rep, 23;7(1):330, 2017)。

2. 研究の目的

Fgf21 は胸腺内で傍分泌的に T 細胞分化に関与することが示唆されたが、個体の末梢における T 細胞応答への影響は不明であった。そこで本研究では、T 細胞応答が関与する代表的な病態である自己免疫疾患とがんについてモデルマウスを作成し、Fgf21 の役割について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデル

雌性 8 週齢 Fgf21 KO および野生型 (WT) マウスに、中枢神経由来 MOG ペプチドを結核菌の死菌と共に CFA に懸濁し背部に皮下接種し、EAE を誘導した。接種当日と翌日に百日咳毒素を腹腔内投与した。EAE は自己反応性 T 細胞が中枢神経へ浸潤し炎症を起こすことで、炎症性脱髄を主とした軸索変性を引き起こす。臨床症状は 1. 尾のトーヌス (緊張) 低下からはじまり、2. 尾の完全下垂、3. 歩行異常、4. 後肢の完全脱力、5. 前肢麻痺を含む後肢の完全脱力と進行し、6. 症状の進行により摂食不能と判断された場合をエンドポイントとした。臨床スコアを経時的に測定し、接種 3 週間後に脊髄、脾臓、胸腺における免疫細胞の解析を行った。

(2) B16F10 担がんモデルマウス

雌性 8 週齢 Fgf21 KO および WT マウスに、B16F10 メラノーマ細胞を 2×10^5 cells 皮下接種し、腫瘍の成長を経時的に測定した。3 週間後に脾臓における免疫細胞の解析を行った。

(3) 胎児胸腺器官培養 (FTOC)

胎生 15.5 日目の胎児胸腺を採取し、Millicell 0.4 μ m inserts (Millipore) 上で AIMV 培地を用いて培養した。このとき、recombinant human FGF21 (rhFGF21, 500 ng/ml) を添加し、3 日おきに培地を交換した。培養 14 日目に細胞を回収し、各細胞の割合についてフローサイトメトリーを用いて解析した。

(4) 免疫細胞の解析

胸腺はリベラーゼ処理、脾臓はセルストレーナーにより、細胞を分散させ解析に用いた。脊髄は、セルストレーナーで細胞を分散させたのち、38% percoll で遠心し沈殿した免疫細胞を採取し、解析に用いた。骨髄由来 DC は、WT マウスの骨髄細胞を採取し、GM-CSF と IL-4 存在下で 1 週間培養し分化させた。末梢 T 細胞分化の検討では、脾臓から Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec.) を用いてナイーブ CD4 陽性 T 細胞を単離し、抗 CD3/CD28 抗体存在下で増殖と Th1、Th2、Th17、制御性 T 細胞 (Treg) への分化能を検討した。

胸腺 T 細胞サブセットは TCR と CD69 の発現によって、次の 5 つの段階にわけ解析した (T1; TCR β -CD69⁻, T2; TCR β ^{int}CD69⁻, T3; TCR β ^{int}CD69⁺, T4; TCR β ^{hi}CD69⁺, T5; TCR β ^{hi}CD69⁻)。TEC (CD45-EpCAM⁺) と DC (CD11c⁺) について、細胞割合と MHC クラス発現量を検討した。脊髄へ浸潤した T 細胞は、CD45⁺CD4⁺ または CD45⁺CD8⁺、脾臓のエフェクター T 細胞は、IFN γ ⁺ あるいは IL-17⁺CD4⁺ T 細胞について検討した。

4. 研究成果

(1) Fgf21 の自己免疫および腫瘍免疫に与える影響

Fgf21 の自己免疫への影響を調べるために、Fgf21 KO および WT マウスを用いて EAE モデルを作成し、臨床スコアと自己免疫応答を検討した。EAE は、臨床症状や免疫学的側面において多発性硬化症と多くの共通点を示す疾患モデルとして広く研究されている。各マウスに EAE を誘導すると、Fgf21 KO マウスでは WT マウスと比較して EAE の増悪化が観察された (Fig.

1A)。このとき Fgf21KO マウスの中枢神経組織（脊髄）では、T細胞の浸潤が有意に増加した (Fig. 1B)。以上より、Fgf21 KO マウスでは T 細胞性自己免疫応答が亢進していると考えられた。

次に胸腺について調べると、EAE を誘導した Fgf21KO マウスでは、成熟 T 細胞の減少と、DC が低下していたが、TEC には変化は見られなかった (Fig. 1C)。また、TEC および DC における MHC クラス の発現が低下していた。胸腺では、TEC または DC が、MHC 分子を介して T 細胞と相互作用することで、自己免疫性 T 細胞が除去される。これらのことから、Fgf21 は TEC または DC の機能を維持し、自己応答性 T 細胞の除去、すなわち中枢性免疫寛容に寄与する可能性が示唆された。一方で Fgf21 KO マウスの脾臓では、エフェクター T 細胞の増加が確認されたことから、Fgf21 が末梢免疫組織における免疫寛容に関与する可能性も考えられた。

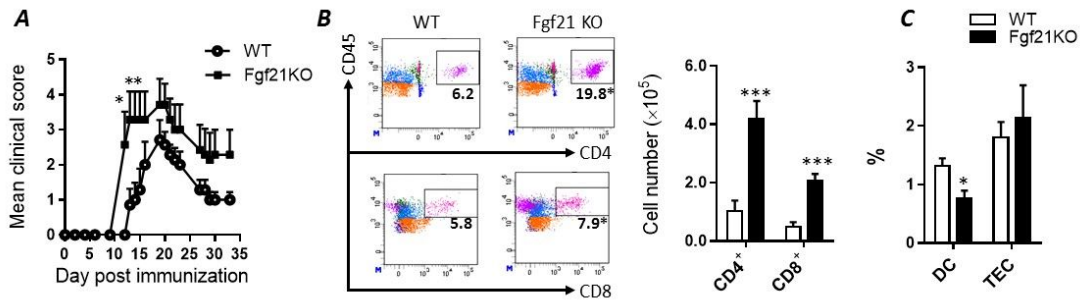


Fig. 1 Fgf21 KOマウスではEAE症状が悪化する
Fgf21 KOおよびWTマウスに、中枢神経由来MOG₃₅₋₅₅ペプチドを皮下接種し、EAEを誘導した。(A)臨床スコアを経時的に測定した。(B)接種3週間後に中枢神経(脊髄)へのT細胞の浸潤についてフローサイトメトリーを用いて検討した。(左)脊髄のCD45⁺細胞におけるCD4⁺およびCD8⁺T細胞の割合(右)脊髄のCD4⁺およびCD8⁺T細胞数。(C)接種3週間後の胸腺におけるDCとTECの割合 Mean±S.E. (n=7-9). **P < 0.05, ***P < 0.001 (vs. WT).

つぎに、がん免疫にかかわる影響を調べるために、KO および WT マウスに B16F10 細胞を移植したが、腫瘍の成長に有意な差は得られなかった。また、脾臓におけるエフェクター T 細胞にも差はみられなかった。以上より、Fgf21 は腫瘍免疫および腫瘍の成長に関与しないことが示唆された。

(2) Fgf21 は胸腺の古典的 DC に作用し、中枢性免疫寛容を誘導する

まず、Fgf21 の中枢性免疫寛容への関与を調べた。これまでの研究で、Fgf 受容体や共受容体である Klotho は、胸腺 T 細胞に発現せず、TEC またはそれ以外の細胞画分に発現することが分かっている。したがって、Fgf21 は胸腺で TEC または DC に対する作用を介して T 細胞分化を調節していると考えられた。EAE 誘導前の正常 KO マウス胸腺を WT と比較すると、TEC に差はなかったが、未熟 T 細胞が増加し、DC が有意に減少していた (Fig. 2A)。また、KO マウスの MHC クラス 分子の発現は、TEC で差はなかったが、DC では有意に低値を示した。DC は不均一な集団であり、機能の点から伝統的 DC (conventional DC: cDC) と形質細胞様 DC (plasmacytoid DC: pDC) とに大別される。これらの細胞の胸腺における機能については、いまだ不明な点も多いが、どちらも自己応答性 T 細胞を排除する負の選択に関与することが報告されている。Fgf21 KO マウス胸腺では、pDC には変化はなかったが、cDC が有意に減少していることが分かった (Fig. 2A)。そこで、胎児胸腺器官培養系に Fgf21 を添加した結果、TEC や pDC には変化は見られなかったが、cDC が有意に増加し、未熟 T 細胞が有意に減少した (Fig. 2B)。

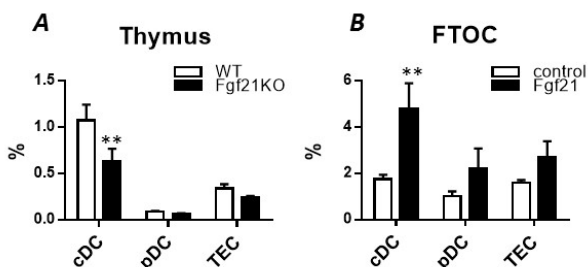


Fig. 2 Fgf21はcDCの増加を誘導する。
(A)EAEを誘導する前の Fgf21 KOマウスの胸腺におけるDCとTECの割合、(B)胎生15日目のC57BL/6マウス胸腺を採取し、Fgf21存在下または非存在下で胎児胸腺器官培養(FTOC)を14日間行った後、DCとTECの割合について、フローサイトメトリーで解析した。Mean±S.E. (n=9-12). **P < 0.01.

次に、Fgf21 の末梢免疫寛容への関与を調べるために末梢免疫組織の DC や T 細胞への作用について検討した。その結果、EAE 誘導前の正常 Fgf21 KO マウスの脾臓 pDC および cDC の細胞割合と MHC クラス 発現には差はみられなかった。また、一般的に末梢 cDC として実験に用いられている骨髄由来 DC に Fgf21 を添加しても、細胞数や MHC クラス 発現に影響はみられなかった。さらに Fgf21 KO および WT マウス由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞を採取し、in vitro での Th1、Th2、Th17、Treg への分化能と、FGF21 タンパク添加による影響を検討したが、差はみられなかった。このことから、Fgf21 は、末梢免疫組織において DC や T 細胞に直接作用せず、末梢免疫寛容には関与しないことが示唆された。

以上より、Fgf21 は胸腺の DC に特異的に作用するか、あるいは胸腺の他の細胞への作用を介して DC に作用している可能性が示唆された。胸腺の DC は、組織常在性の CD8⁺ cDC と、末梢免疫組織から移行する SIRP- α ⁺ cDC と pDC の 3 種類で構成されている。末梢免疫組織の移行がない条件での FTOC においても、Fgf21 は胸腺の cDC を増加させたことから、Fgf21 は末梢からの DC の移行には関与せず、すでに胸腺内に存在する cDC の増殖や成熟に関わると考えられた。

胸腺における自己反応性の T 細胞の排除、すなわち中枢性免疫寛容は、正常な免疫応答に重要であり、これが破綻すると自己免疫疾患をもたらす。自己免疫疾患の多くは難治性で、原因も明確でないことから難病に指定されており、その発症機序の解明や新たな治療法の開発が求められている。本研究より、胸腺において TEC から産生された Fgf21 が、直接あるいは間接的に胸腺 cDC に作用することで未熟な自己反応性 T 細胞を除去し、自己免疫の抑制に寄与している可能性が示唆された。以上より、Fgf21 が自己免疫を抑制することが示唆されたため、Fgf21 を用いた自己免疫疾患の新たな治療法の開発が期待できる。

5 . 主な発表論文等

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.kobepharma-u.ac.jp/micro-s/>

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。