

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08413

研究課題名(和文) TFH細胞機能制御を利用した全身性エリテマトーデスの治療法開発に関する基盤的研究

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategy based on the functional regulation of TFH cells for systemic lupus erythematoses

研究代表者

倉沢 和宏 (Kurasawa, Kazuhiro)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：30282479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、c-Mybの自己免疫疾患の病態における役割を解明するために、活性化T細胞特異的c-Myb欠損マウスについて全身性エリテマトーデス(SLE)モデルの解析を行った。その結果、T細胞におけるc-Mybの欠損はSLEの病態(腎炎、抗dsDNA抗体価、リンパ組織における胚心形成とTfh細胞分化)に影響した。特に、c-MybはGC-Tfh細胞とTreg細胞で重要な機能を見出し、獲得免疫に関与することを明らかにした。GC-Tfh細胞とTreg細胞におけるc-Mybの機能的なバランス異常はSLEなど自己免疫疾患の発症や病態の維持に繋がる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患の疾患特異的獲得免疫機構におけるリンパ球の機能制御の詳細なメカニズムは未だ明らかでない。我々は、獲得免疫におけるヘルパーT細胞、とりわけTfh細胞およびTreg細胞において機能が明らかでないc-Mybについて注目し、本研究により獲得免疫機能にc-Mybが関与することを見出した。また、T細胞におけるc-Mybの機能調節機能の解明が、今後の自己免疫疾患の病態研究に繋がる可能性を示した。本研究成果は、免疫システムの解明研究の発展に貢献する点に意義がある。またSLEなど難治性自己免疫疾患に対する新規治療薬の開発へとつながる点に社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of the transcriptional factor c-Myb in the pathology of autoimmune diseases, we analyzed the systemic lupus erythematosus (SLE) model in mice that specifically lack c-Myb in activated T cells. Mice lacking c-Myb specifically in activated T cells had modified SLE like pathologies (nephritis, anti-dsDNA antibody titers, germinal center formation and Tfh cell differentiation in lymphoid tissues). These results revealed that c-Myb functions in especially GC-Tfh cells and Treg cells and is involved in adaptive immunity. It is considered that the abnormal functional balance between GC-Tfh cells and Treg cells due to the pathological abnormal function of c-Myb may lead to the development of autoimmune diseases such as SLE.

研究分野：免疫学 膠原病学

キーワード：自己免疫疾患 SLE c-Myb

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫および自然免疫の複雑な共同連携による免疫機構において、自己抗原に対する免疫トレランスの破綻が SLE を代表とする自己免疫疾患の病態に深く関わると考えられるが、その発症機構は十分に理解されていない。近年、SLE の新たな治療戦略として複数の免疫抑制剤の使用により治療成績が向上した。しかし SLE に対する根治的治療はいまだ存在しないことから、SLE の病態の解明・理解とそれに基づく新規の効果的治療の開発が望まれる。獲得免疫において胚中心 (GC) で B 細胞は高親和性 IgG 抗体産生細胞としてメモリー B 細胞や長期生存形質細胞に分化する。この過程において濾胞ヘルパー T (Tfh) 細胞は、必須で極めて重要で本質的な役割を果たしている。一方、膠原病で検出される種々の高親和性自己抗体産生 B 細胞は Tfh 細胞の機能異常 (亢進) および制御性 T 細胞 (Treg) によって制御される自己トレランスの破綻が関与して GC 依存性に自己抗体の産生が促進し、自己免疫異常の病態に深く関与すると考えられている。SLE の患者では高親和性自己抗体産生 B 細胞が観察されており、臨床研究やマウス疾患モデル研究より、GC 由来と考えられる自己反応性 B 細胞の分化や機能異常が SLE の病態に深く関与する可能性が示唆されている。しかし Tfh 細胞の SLE における重要性は不明である。一方、核酸成分が Toll 様受容体 (TLR7/9) を介して発動する自然免疫系も獲得免疫系とリンクして自己免疫疾患に関与すると考えられている。B 細胞抗原受容体 (BCR) によって取り込まれた核酸蛋白複合体抗原 (自己抗原) は TLR7/9 を介して抗核抗体の過剰産生を誘導することが報告されている。また核酸蛋白複合体抗原-抗核抗体免疫複合体は TLR7/9 シグナルを介して骨髄系樹状細胞 (mDC) は抗原提示能増強により自己抗原反応性 Tfh 細胞の分化促進に働き、形質細胞様樹状細胞 (pDC) は IL-6 および IFN γ の産生を亢進してポリクローナルな B 細胞の活性化・増殖を促進する。これら樹状細胞の活性化は GC 非依存性・T 細胞非依存性に形質細胞へ分化・増殖して自己抗体産生が亢進し、SLE の病態維持や急性増悪に関与することが報告されている。このように SLE における免疫機構について獲得免疫系および自然免疫系の病態形成メカニズムは非常に複雑であり、いまだ、その本態は十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

転写抑制因子である Bcl6 は Tfh 細胞の分化マスター因子であるが、その制御機構は不明であった。最近、我々は Bcl6 による Tfh 細胞の分化誘導機構において転写因子である c-Myb が深く関与することを見出した。そこで本研究は、Bcl6 と c-Myb の機能的カスケードによる Tfh 細胞の分化・機能制御機構を解明する。さらに SLE 発症における Tfh 細胞に対する機能制御の治療的意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

c-Myb の CD4T 細胞に対する機能的役割を明らかにするために、c-Myb flox/flox マウスと OX40 遺伝子プロモーターを利用して Cre リコンビナーゼを発現させたマウスを交配して、活性化 T 細胞特異的 c-Myb コンディショナル (c) ノックアウト (KO) マウスを作製 (OX40-Cre-c-Myb-cKO) した。本研究では野生型マウスと cKO マウスを用いて以下の解析を行った。

(1) c-Myb のヘルパー T 細胞の分化誘導に関する基礎的研究

各マウスに対して、各 Th 細胞に対する分化誘導に対する役割について解析するために、ナイーブ CD4T 細胞に対して Th1 細胞、Th2 細胞、および Th17 細胞誘導条件下で抗 CD3 抗体および抗

CD28 抗体による刺激を行い、培養開始 5 日後に PMA およびイオノマイシンによる再刺激後の細胞内サイトカイン産生についてフローサイトメトリー法で解析を行った。また、分化誘導および再刺激後の細胞増殖について MTT アッセイを行い、アポトーシスについて annexinV 陽性 FAS 陽性細胞をフローサイトメトリー法で解析を行った。

(2) c-Myb の獲得免疫機構に関する基礎的研究

各マウスに対して、TNP-OVA/CFA (ip) で免疫 (day0) 後に TNP-OVA/IFA (ip) でチャレンジ (day42) を行い、以下の解析を行った。 Day14、48、56 の血清中の抗 TNP 抗体価を ELISA 法で測定。 day56 に脾臓細胞について Tfh 細胞、GC-Tfh 細胞、GC-B 細胞、抗原特異的産生細胞、形質細胞についてフローサイトメトリー法で解析。 Tfh 細胞、GC-Tfh 細胞をセルソーターで分取してリアルタイム qRT-PCR 法で種々のサイトカインや転写因子の mRNA の発現について解析した。

(3) SLE モデルにおける c-Myb の機能的役割

SLE マウスモデルは、TLR7 アゴニストである Imiquimod を耳介に経皮的に週 3 回、6 週間反復塗布投与することによりモデルを作製し、以下の解析を行った。 腎系球体病変および頸部リンパ節における GC 形成について病理組織学的解析。 腎系球体における IgG および補体 C3 の沈着について免疫組織化学染色により解析。 尿中アルブミン量を ELISA 法により測定。 SLE モデル成立まで継時的に血清中の抗 dsDNA 抗体価を ELISA 法での測定。 SLE モデル成立後に頸部リンパ節における GC-Tfh 細胞および Treg 細胞の出現についてフローサイトメトリー法により解析した。

4 . 研究成果

(1) ヘルパー T 細胞の分化誘導における c-Myb の機能

野生型および OX40-Cre-c-Myb-cK0 マウスのナイーブ CD4T 細胞の Th1 細胞、Th2 細胞、および Th17 細胞の誘導後の細胞内サイトカイン陽性細胞の出現頻度 (IFN γ 、IL-4、IL-17) についてフローサイトメトリーで解析を行った結果、野生型および OX40-Cre-c-Myb-cK0 の各細胞において有意な差を認めなかった。また分化誘導後および再刺激後の細胞増殖 (MTT アッセイ) およびアポトーシス細胞 (annexinV 陽性 FAS 陽性細胞) の出現頻度についても野生型および OX40-Cre-c-Myb-cK0 の各細胞において有意な差を認めなかった。以上より、in vitro における解析では、各ヘルパー T 細胞の分化および増殖とアポトーシスに対して明らかな c-Myb の機能的役割を認めなかった。

(2) 獲得免疫機構における c-Myb の機能

TNP-OVA/CFA (ip) で免疫 (day0) 後から TNP-OVA/IFA (ip) によるチャレンジ後までの血清中抗 TNP 抗体について IgM、IgG1、IgG2、および IgE のサブクラスの抗体価について検討した。その結果、免疫後早期の Day14 では野生型と OX40-Cre-c-Myb-cK0 マウスにおいて、いずれも抗体価に有意差を認めなかったが、その後の抗体価は cK0 マウスで有意な低下を認めた。また、チャレンジ 2 週後の脾臓中 CD4T 細胞数は野生型と cK0 マウスで有意差を認めなかった。B 細胞総数は野生型と cK0 マウスで有意差を認めなかったが、GC-B 細胞および抗 TNP 抗陽性 B 細胞の出現頻度と細胞数は cK0 マウスにおいて有意に減少した。一方、GC-Tfh の比率および細胞数は、予想に反して cK0 マウスにおいて野生型と比べ、約 2 ~ 3 倍に増加した。チャレンジ 2 週後の脾臓よりセルソート後の Tfh 細胞および GC-Tfh 細胞における遺伝子発現動態を検討した。その結

果、IL-4 の mRNA 発現量は野生型と比べ cKO マウスの Tfh 細胞および GC-Tfh 細胞いずれにおいても増加し、GATA3mRNA 発現量は cKO の GC-Tfh 細胞で 2 ~ 3 倍増加した。一方、T-Bet や IFN γ 、IL-5、IL-13、IL-21、Bcl6、BATF、および SAP の mRNA 発現量は野生型マウスと cKO マウス間に有意差を認めなかった。以上より、OX40-Cre-c-Myb-cKO マウスでは TNP 抗原に対する GC の形成が低下し、獲得免疫応答が抑制されたが、GC-Tfh 細胞の出現頻度および IL-4 産生が増強したことから、GC-Tfh 細胞以外の CD4T 細胞の機能異常が推測された。

(3) SLE モデルにおける c-Myb の機能

Imiquimod 誘導 SLE モデルにおいて野生型マウスで認められる頸部リンパ節と脾臓における GC 形成、腎組織における糸球体係蹄の肥厚、メサングウム細胞増多、および半月体形成などの腎糸球体病変は、OX40-Cre-c-Myb-cKO マウスで軽減を認めた。また、野生型マウスと比較して IgG や C3 の沈着の減少を認め、さらに電子顕微鏡による解析においても免疫複合体沈着の軽減が観察された。また尿蛋白量も同様に cKO マウスで軽減しており、腎病変の軽症化が示唆された。血清中抗 dsDNA 抗体価は Imiquimod 投与 2 週後の早期では、驚くことに野生型と比較して cKO マウスにおいて有意に増加していたが、その後継時的に減少し、Imiquimod 投与 42 週の後期には野生型マウスと比較して有意な減少を認めた。また、同時期の野生型マウスで認められた頸部リンパ節と脾臓における GC-B 細胞や形質細胞の出現頻度は cKO マウスで有意に減少した。しかし、TNP-OVA による免疫と同様に GC-Tfh 細胞の出現頻度と細胞数は cKO マウスで有意に増加した。一方、Treg 細胞の有意な増加を cKO マウスで認めた。また同時期の頸部リンパ節よりセルソート後の Tfh 細胞、GC-Tfh 細胞および Treg 細胞における遺伝子発現動態を検討した結果、TNP-OVA による免疫と同様に IL-4 の mRNA 発現量は野生型と比べ cKO マウスの Tfh 細胞および GC-Tfh 細胞いずれにおいても増加し、GATA3mRNA 発現量は cKO の GC-Tfh 細胞で増加した。また、Treg 細胞において分化誘導因子 Foxp3 の発現が cKO マウスで有意に増加した。一方、T-Bet や IFN γ 、IL-5、IL-13、IL-21、Bcl6、BATF、および SAP の mRNA 発現量は野生型と cKO マウス間に有意差を認めなかった。以上より、Imiquimod 誘導 SLE モデルにおいて c-Myb は GC-Tfh 細胞および Treg 細胞いずれにおいても抑制的に機能しており、c-Myb は GC-Tfh 細胞の維持や IL-4 産生を抑制する一方、Treg 細胞の機能を増強することが示唆された。

(まとめ)

本研究より c-Myb は GC-Tfh 細胞および Treg 細胞いずれにおいても機能しており、獲得免疫に関与することが明らかになった。c-Myb は GC-Tfh 細胞の維持や IL-4 産生を抑制する一方、Treg 細胞機能を増強することにより免疫応答に働くことが示された。両細胞間の c-Myb 機能のバランスは獲得免疫系機能に影響を与えられ、c-Myb の病的な異常機能による各 T 細胞間ネットワークの恒常性破綻は SLE など自己免疫疾患の発症や病態調節に繋がる可能性が考えられた。また、本研究で SLE モデルの発症に GC-Tfh 細胞および Treg 細胞いずれもが深く関与することが示されたことから、自己免疫疾患の病態コントロールに獲得免疫機能制御の重要性が確認された。c-Myb は、GC-Tfh 細胞および Treg 細胞のクロストークにおいて転写調節因子として重要な役割を果たしている可能性があると考えられることから、本研究の成果は将来、免疫系細胞の機能制御機構の解明と新規の治療開発へとつながる点に意義があると思われる。今後、自己免疫疾患における疾患特異的免疫ネットワーク形成メカニズムの解明を目指し、更に c-Myb の研究を進める予定である。

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 4件）

1. 著者名 Morita H, Shimizu Y, Nakamura Y, Okutomi H, Watanabe T, Yokoyama T, Soda S, Ikeda N, Shiobara T, Miyoshi M, Chibana K, Takemasa A, Kurasawa K.	4. 巻 67
2. 論文標題 Auto-antibody evaluation in idiopathic interstitial pneumonia and worse survival of patients with Ro52/TRIM21auto-antibody	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr.	6. 最初と最後の頁 199-205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.20-5.	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 -
1. 著者名 Hayashi K, Kaminuma O, Nishimura T, Saeki M, Matsuoka K, Hiroi T, Jutabha P, Iwata Y, Sugiura K, Owada T, Kurasawa K, Okayasu I, Ouchi M, Fujita T, Kanai Y, Endou H, Anzai N.	4. 巻 75
2. 論文標題 LAT1-specific inhibitor is effective against T cell-mediated allergic skin inflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 463-467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14019. Epub 2019 Sep 3.	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 -
1. 著者名 Hirata H, Yukawa T, Tanaka A, Miyao T, Fukuda T, Fukushima Y, Kurasawa K, Arima M.	4. 巻 49
2. 論文標題 Th2 cell differentiation from naive CD4+ T cells is enhanced by autocrine CC chemokines in atopic diseases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Exp Allergy	6. 最初と最後の頁 474-483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cea.13313. Epub 2018 Dec 13.	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 -
1. 著者名 Kurasawa K, Arai S, Namiki Y, Tanaka A, Takamura Y, Owada T, Arima M, Maezawa R.	4. 巻 57
2. 論文標題 Tofacitinib for refractory interstitial lung diseases in anti-melanoma differentiation-associated 5 gene antibody-positive dermatomyositis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford)	6. 最初と最後の頁 2114-2119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/key188.	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tanaka A, Owada T, Hasegawa A, Hiyama T, Takamura Y, Miyao T, Yamazaki R, Arai S, Maezawa R, Arima M, Kurasawa K.
2. 発表標題 TCZ might be a risk factor for worsening of ILD, particularly of chronic ILD.
3. 学会等名 EULAR (European League Against Rheumatism) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Owada T, Tanaka A, Hirata H, Arima M, Fukushima Y, Kurasawa K.
2. 発表標題 The Association Between Continuous Decreases in Serum RF Titers and Radiographic Remission of Joint Damage in RA Patients Treated with Biological or Targeted Synthetic DMARDs
3. 学会等名 ACR (American College of Rheumatology 's Annual Meeting) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Arima M, Tanaka A, Takamura Y, Miyao T, Hasegawa A, Hiyama T, Yamazaki R, Arai S, Maezawa R, Arima M, Owada T, Hirata H, Fukushima Y, Kurasawa K
2. 発表標題 Perturbation of macrophage functions results in severe bronchial asthma with altered phenotypes.
3. 学会等名 Congress of Interasma Japan / North Asia (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉沢 和宏
2. 発表標題 抗MDA5抗体陽性間質性肺炎に対するJAK阻害療法
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会（シンポジウム）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 生物学的製剤使用中関節リウマチに合併する間質性肺炎の増悪因子の検討
2. 発表標題 生物学的製剤使用中関節リウマチに合併する間質性肺炎の増悪因子の検討
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 倉沢 和宏 (分担)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 227
3. 書名 膠原病に伴う間質性肺疾患 診断・治療指針 2020	

〔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	有馬 雅史 (Arima Masafumi) (00202763)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	
研究分担者	幡野 雅彦 (Hatano Masahiko) (20208523)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	谷口 俊文 (Taniguchi Toshibumi) (20724826)	千葉大学・医学部附属病院・講師 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	大和田 高義 (Owada Takayoshi) (30456016)	獨協医科大学・医学部・講師 (32203)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関