

令和 3 年 4 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15118

研究課題名（和文）ネクロプトーシス誘導を介したT細胞依存性自己炎症病態機構の解明

研究課題名（英文）T cell-induced autoinflammatory diseases

研究代表者

佐々木 克博（Sasaki, Katsuhiro）

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：70739862

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）：自己免疫と自己炎症は免疫システムの機能異常に伴う全身性の炎症性疾患である。自己免疫はT細胞やB細胞といったリンパ球を主体とする獲得免疫の異常である一方、自己炎症は自然免疫や自然免疫細胞が作り出す炎症性サイトカインの機能亢進により発症することから、双方は対称的な病因から形成される疾患群と考えられている。本研究ではLUBACとよばれる炎症関連酵素が自己免疫および自己炎症発症の責任因子であることや、2つの炎症タイプの詳細な比較解析により、T細胞機能異常を背景とした細胞死起因性の自己炎症という新たな炎症病態機序の存在を提唱することで炎症病態の複雑性を証明し、今後の炎症治療に繋がる成果を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって作製された複数のLUBACを標的とした疾患マウスは、典型的自己免疫疾患から典型的自己炎症疾患まで多彩な炎症を引き起こすことから、炎症分野の研究における解析ツールとして今後利用されることが大いに期待できる。また本研究から自己炎症の誘導におけるT細胞細胞障害機能が新たに示されたことから、自己免疫と自己炎症の概念の垣根を越えた、炎症誘導に寄与する未だ明らかにされていない多様な炎症細胞の特性や細胞間相互応答の理解の重要性を改めて示した。自己炎症疾患における病因・増悪化因子としてT細胞を提唱した本研究は、ヒト疾患の治療改善に繋がる可能性もある。

研究成果の概要（英文）：Autoimmunity and autoinflammation are immune-mediated systemic inflammatory diseases. The two types are contrasting on etiology; autoimmunity is induced by breakdown of immune tolerance and hyper-activation of self-reactive lymphocytes, whereas autoinflammation is contributed by innate immune-secreting inflammatory cytokines. This study has discovered the following two points in detail. 1. The LUBAC is recognized as a causative factor for both autoimmune and autoinflammatory diseases. 2. Self-reactive T cells can trigger autoinflammatory-like pathogenesis that may be a therapeutic target for atypical types of T cell-unrelated inflammatory diseases.

研究分野：炎症学

キーワード：自己炎症 自己免疫 細胞死誘導 T細胞 LUBAC ユビキチンリガーゼ Treg

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症性疾患の新規カテゴリーとして近年注目されている自己炎症性疾患の多くは、自然免疫システムの制御障害によって発症する遺伝性疾患であり、TNF や IL-1 等の炎症性サイトカインの過剰な産生を介して、皮膚や関節を始めとする全身性の炎症症状と慢性的かつ周期的な発熱を繰り返す。自然免疫細胞群の機能亢進に対して、自己抗体や抗原特異的 T 細胞が検出されない(自己免疫反応が乏しい)ことから、獲得免疫の機能異常(免疫寛容の破綻に基づく自己抗原応答亢進)により発症する自己免疫疾患とは病因学的に対称的な疾患群と捉えられ、獲得免疫との関連はほとんど解析されていない。しかしながら、自己炎症性疾患の広義(責任遺伝子が未同定かつ、自然免疫主体の炎症疾患)に含まれる疾患の中には、自己免疫反応も同時に検出される疾患も含まれており、従来の定義では因果関係を説明できない自己炎症性疾患が未だ数多く存在することも事実である。

先行研究から、自己炎症性疾患の責任因子として知られる炎症関連ユビキチンリガーゼ複合体 LUBAC の全身機能低下が重篤な自己炎症性皮膚炎の亢進に加え、自己免疫反応を惹起することを見出しており、さらに Treg 特異的な LUBAC 機能低下マウスの作製により、T 細胞依存的な皮膚炎の誘導を観察した。LUBAC の安定化機構に基づき、Treg 内で LUBAC を段階的に不安定化(Treg 機能低下)させたマウスを作製したところ、自己炎症様(自然免疫細胞を炎症反応の主体とする病理像)から自己免疫様(T 細胞を炎症反応の主体とする病理像)の多彩な病理像を示した。免疫寛容の低下による自己免疫を病因とした炎症反応であっても、自己炎症様病理像を顕す炎症性疾患として初めてその存在を示した。

2. 研究の目的

自己免疫疾患の成立には、自己抗原に対する獲得免疫細胞の過剰な免疫応答とそれに基づく細胞障害や炎症誘導が基本的な背景としてあり、多くは炎症病巣部に明確な T 細胞の関与が認められる。しかしながら、今回独自に作製した皮膚炎モデルマウスを用いた解析から、従来の自己免疫疾患の概念とは異なる「獲得免疫異常を背景とした細胞死起因性の自己炎症」の存在が提唱された。本研究では、先行研究から想定された病原性 T 細胞に起因する自己炎症性疾患の存在を確定させ、その詳細な病態メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 自己免疫性皮膚炎マウスを活用し、T 細胞によるネクロトーシス誘導を起因とした自己炎症性疾患の存在を確定する。

自己免疫性皮膚炎マウスの皮膚では、表皮細胞特異的 LUBAC 機能低下(典型的な細胞死起因性の自己炎症)モデルマウスの皮膚病巣部で認められるように、表皮細胞及び真皮線維芽細胞のアポトーシス様(活性型 Caspase 3 陽性)及びネクロトーシス様(リン酸化 MLKL 陽性)細胞死が亢進しており、細胞死に基づく T 細胞依存的な自己炎症機序が誘導されている可能性が強く示唆される。LUBAC 機能低下時の易誘導性ネクロトーシス誘発因子である TNF や、細胞内ネクロトーシス実行因子である RIPK3 の欠損マウスと自己免疫性皮膚炎マウスを交配し、T 細胞依存的なネクロトーシスを抑制することで皮膚炎が寛解するか解析する。長期的(3-4 ヶ月程度)に皮膚炎の重症度をスコア化することにより、その推移及び発症頻度の変化を解析する。さらに病理像の比較、皮膚内浸潤細胞のサブセット解析や、表皮細胞一細胞ごとの細胞死をフローサイトメトリーで解析することで、表皮細胞の細胞死の有無及び炎症タイプを評価する。

(2) 皮膚における T 細胞依存的な新規自己炎症誘導機序を明らかにする。

皮膚抗原反応性 CD8T 細胞が発現する FasL 等細胞死誘導因子がケラチノサイトのアポトーシスを誘導することは知られているが、ネクロトーシスについては報告が無い。自己免疫性皮膚炎マウス皮膚から採取した T 細胞の遺伝子発現解析や機能解析により、皮膚 T 細胞依存的な自己炎症病態メカニズムの特徴化を行う。また、T 細胞と線維芽細胞もしくはケラチノサイトを用いた *In vitro* の細胞死アッセイ系を用いて、TNF や TRAIL 等デスリガンドを対象にネクロトーシス誘導因子の探索、その下流シグナルの詳細な解析を行う。

4. 研究成果

(1) T 細胞依存的な自己炎症誘導機構の存在を確定させるため、マウス個体レベルでの検証を行った。LUBAC の構成因子である SHARPIN を Treg 特異的に欠損させた自己免疫性皮膚炎モデルマウスと、LUBAC 機能低下時の易誘導性ネクロトーシス誘発因子である TNF またはネクロトーシス実行因子である RIPK3 を全身で欠損したマウスを交配した。生後から皮膚炎のスコアリングを重症度や炎症範囲などの指標をもとに数ヶ月にわたり実施し、これら遺伝子の欠損が自己炎症に与える影響を観察した。TNF 欠損により明らかな皮膚炎の改善が認められており、組織染色の結果から細胞死の抑制も認められたことから、T 細胞依存的な炎症誘導には TNF

が重要なエフェクター因子として機能していることが証明された(図1)。実際に、Treg 特異的な SHARPIN 欠損マウスの皮膚病巣部の $CD3\epsilon^+TCR\beta^+$ T 細胞を解析したところ TNF や $IFN\gamma$ といった細胞障害性サイトカインの発現が亢進していた(図2)。RIPK3 欠損マウスとの交配による皮膚炎の改善は部分的であり、アポトーシスを含む他のプログラム細胞死も同時に誘導されていることが考えられた(図1)。研究結果から、T 細胞機能の異常亢進が TNF を介して異なるタイプの細胞死を惹起することや、細胞死に起因した個体レベルでの組織炎症の誘導を可能とすることを強く示唆している。

図 1

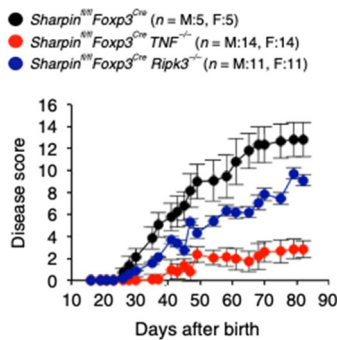


図 2

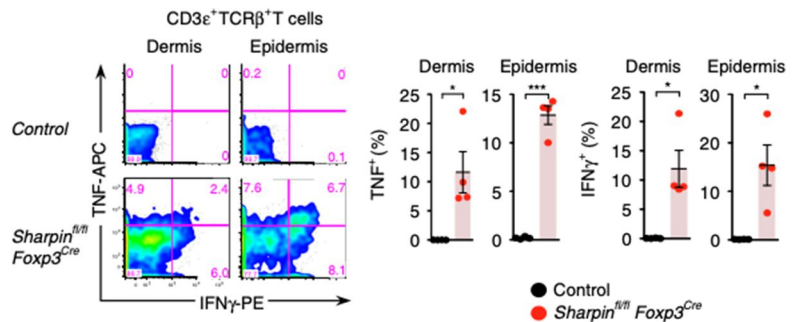
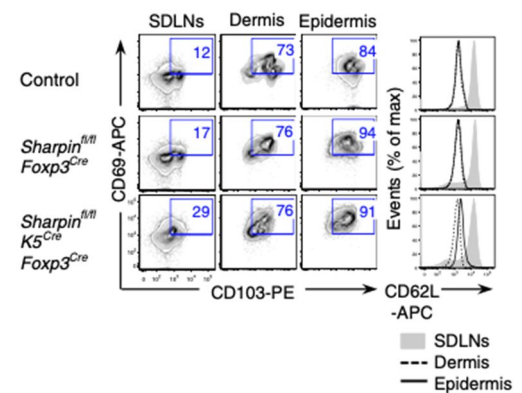


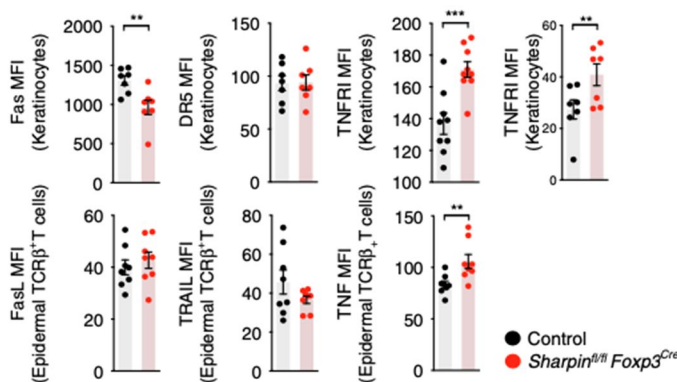
図 3

(2) 自己炎症性皮膚炎を誘発する T 細胞の免疫学的表現型を確定するため、上記 T 細胞をさらに詳細に解析した。これら皮膚内に浸潤する病原性 T 細胞は皮膚局在性の $\gamma\delta$ T 細胞と比較して僅かに増加していた。さらにこれらの皮膚浸潤 T 細胞は、通常皮膚に局在するメモリー T 細胞 (resident memory T cell; $CD103^+ CD69^+ CD62L^-$) と同様の表現型を示した(図3)。この結果は、病原性 T 細胞が皮膚組織内に一定期間以上組織に留まり、組織環境に順応した結果であることが想定されるため、T 細胞が TNF を介して皮膚構成細胞の細胞死を引き起こす為には、局所的な T 細胞の蓄積・密度の上昇や標的細胞との一定時間の安定した細胞間相互作用が必要なかもしれない。いずれにせよ、メモリー機能を有する組織局在性 T 細胞は個体に対しては保護的に働くと考えられており、これら免疫学的表現型を持つ T 細胞サブセットの細胞障害性については新たな研究トピックとして解析が進むことを期待したい。



(3) 皮膚表皮細胞と表皮浸潤性 T 細胞との細胞間相互作用が自己炎症を惹起することが想定されたため、これらの細胞群を単離し、細胞死関連因子の発現解析を試みた。TNF に加え、TNF 以外のデスリガンド FasL や TRAIL の関与について検討したが、TNF 及び TNF 受容体の発現レベルの亢進が顕著であり、これらが細胞死誘導の主因であると考えられた(図4)。加えて、T 細胞が抗原認識に伴う活性化により FasL や TRAIL に比べて TNF の発現が顕著に上昇することも本研究にて証明しており、これにより T 細胞誘導性自己炎症の発症機構の概要が明らかになった。

図 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Katsuhiko Sasaki, Ai Himeno, Tomoko Nakagawa, Yoshiteru Sasaki, Hiroshi Kiyonari & Kazuhiro Iwai	4. 巻 10
2. 論文標題 Modulation of autoimmune pathogenesis by T cell-triggered inflammatory cell death	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-11858-7	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 佐々木克博、岩井一宏	4. 巻 92
2. 論文標題 直鎖状ユビキチン鎖を生成するLUBACリガーゼの構造、機能、T細胞機能制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 20-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920020	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Katsuhiko Sasaki and Kazuhiro Iwai
2. 発表標題 An autoinflammatory mechanism by TNF-expressing T cells
3. 学会等名 17th TNF conference 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

自己免疫疾患の新たな病態発症メカニズムを解明 - 炎症性疾患におけるT細胞の新たな役割 -
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2019/190828_2.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------