

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15183

研究課題名（和文）レドックスシグナルを介した制御性T細胞の維持とその自己免疫疾患への関与

研究課題名（英文）Redox-mediated Treg homeostasis is involved in the development of autoimmunity

研究代表者

里岡 大樹（Satooka, Hiroki）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：40750360

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）：本研究では、関節リウマチのモデルマウスであるコラーゲン誘導関節炎（CIA）マウスを用いて、活性酸素群（ROS）が自己免疫疾患の発症および病態に関与する分子機構として、制御性T細胞（Treg）の維持に着目し、レドックスシグナルを介したその制御機構を解明することを目的とした。CIAマウスに抗酸化剤を投与すると顕著な関節炎の抑制および抗体価の低下が示された。一方で、CIAマウス内のTregの数の減少および細胞内ROSの増加が示され、これらは抗酸化剤の投与により改善された。さらに、CIAマウス由来TregではPTENの酸化が亢進することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫応答抑制の中心的役割を担うTregの生体内維持の破綻は、自己免疫疾患などの発症に大きく関与している。しかし、自己免疫疾患発症時におけるTregの維持破綻の分子機構については未だ不明な点が多い。本研究成果は、レドックスシグナルがTregの維持を制御するという新しい自己免疫疾患の発症機構に迫るものであり、新たな治療法の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：Reactive oxygen species (ROS) have been reported to be involved in the development of autoimmunity; however, the detailed mechanism of how ROS exacerbate autoimmunity is not well defined. In this research project, we focused on redox signaling in the homeostasis of regulatory T cells (Treg) during the development of autoimmunity. Using the model of rheumatoid arthritis, Collagen-Induced Arthritis (CIA) mouse model, we demonstrated that antioxidant reagents significantly suppressed the development of arthritis. Intracellular ROS in Treg from CIA mice were highly accumulated compared to naive mice, and the number of Treg in CIA mice were significantly lower than in naive mice. Administration of antioxidants ameliorated intracellular ROS accumulation and the lowered number of Treg in CIA mice. Furthermore, PTEN, redox-sensitive phosphatase, was oxidized in Treg from CIA mice compared to naive mice.

研究分野：免疫学

キーワード：レドックスシグナル・ROS 制御性T細胞 自己免疫疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内で免疫寛容を担う制御性T細胞 (Treg) にはCD4陽性 (CD4 Treg) とCD8陽性 (CD8 Treg) の細胞系譜が存在し、その破綻と自己免疫疾患の発症および病態との関連が指摘されている。Foxp3を特異的転写因子とするCD4 Tregについては多くの解析がなされてきたが、その生体内での安定的維持の分子機構については不明な点が多い。また、マウスにおいてCD44、CD122、Ly49の細胞表面発現により同定されるCD8 Tregについては、十分な解析がなされておらず、CD4およびCD8 Tregの生体内での維持機構の詳細は不明である。

近年、PI3キナーゼ (PI3K) 経路の主要な抑制分子であるPhosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) がTregの維持に関わることが報告された。PTENは、PI3Kが産生するホスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸 (PIP₃) をホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸 (PIP₂) に変換することにより、下流のAktを制御しTregの安定的維持を促す。Akt以外のPTENの下流シグナルとしては、ERM (ezrin-radixin-moesin) タンパク質ファミリーの一つであるmoesinの関与が考えられる。moesinは細胞皮層の構造やシグナル伝達に関与し、PTENによって産生されるPIP₂と結合することでその活性が制御される。申請者は、moesin欠損マウスが自己免疫疾患様病態を呈することを見出している。本マウスでは、野生型マウスと比較して、CD8 Tregの減少、濾胞性ヘルパーT細胞 (Tfh) ならびに胚中心B細胞 (GCB) の増加、血中の抗dsDNA抗体 (自己抗体) の上昇とループス腎炎様病態像を認めており (Satooka et al., *J. Immunol.* 199: 3418-3426, 2017)、PTEN-PIP₂-moesin経路によるTregの維持機構が示唆される。

近年の研究より、活性酸素群 (ROS) はシグナル分子として働き、様々な疾患の病態に関与することが明らかになってきている。特に、過剰なROSの産生はNF-κBなどのシグナル経路を介して炎症性サイトカインの産生を促し、慢性炎症などの免疫反応を誘導する (Hara-Chikuma, Satooka et al. *Nat. Commun.* 6:7475, 2015)。申請者は、ROSがPTEN活性部位のシステイン残基をレドックス (酸化還元) 依存的に阻害し、Aktなどの下流シグナルを制御することを報告しており (Satooka & Hara-Chikuma. *Mol. Cell. Biol.* 36:1206, 2016)、レドックスシグナルによるTregの維持機構が考えられる。自己免疫疾患では、慢性的な酸化ストレスの亢進が報告されており、Treg細胞内のROSの上昇によるTregの破綻が、自己免疫疾患の発症およびその病態に関与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、レドックスが自己免疫疾患の病態に関与するメカニズムとして、Tregの生体内維持に着目し、レドックスを介したその制御機構を明らかにすることを目的とする。特に、PTENとその下流シグナルに焦点をあて、病態局所で産生されるROSに応答したレドックスシグナルがTregの生体内維持を制御する分子メカニズムを解明し、自己免疫疾患などの免疫異常に対して新たな治療を開発する基盤を築くことを目指す。

3. 研究の方法

- (1) 試薬: H₂DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) および CellROX Green は、ThermoFisher より購入した。フローサイトメトリーや免疫組織化学に用いたモノクローナル抗体やコントロール抗体は、BD Biosciences、eBioscience、BioLegend のいずれかから購入した。
- (2) マウス: 関節リウマチのモデルマウスとして、Collagen-induced arthritis マウス (CIA マウス) を用いた。使用した DBA1/J マウス は、清水実験材料より購入し、滋賀医科大学動物生命科学センターにて飼育した。すべての研究および手順は滋賀医科大学動物実験委員会にて承認を得た。CIA マウスの作製においては、Bovine 由来 Type II collagen と complete Freund's adjuvant を用いてエマルジョンを作製し、マウス尾根部に免疫した。21日後に、Type II collagen と incomplete Freund's adjuvant を用いたエマルジョンをマウス尾根部に再免疫を行った。初回免疫より49日後に組織を採取し解析を行った。抗酸化剤である N-acetyl-L-cysteine (NAC) および 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPOL) の経口投与は初回免疫の一週間前より行い、解析するまで投与を続けた。Collagen-antibody induced arthritis (CAIA) マウスの作製には、10 mg/ml の抗コラーゲン抗体カクテル (Chondrex) を腹腔投与し、その3日後に LPS 500 μg/ml を腹腔に投与した。免疫開始後、7日目に組織を採取し解析を行った。
- (3) フロサイトメトリー: マウスの脾臓およびリンパ節は、スリ付きスライドグラスを用いて機械的にすり潰し、ナイロンメッシュに通して細胞浮遊液を調整した。調整した細胞懸濁液を抗CD16/CD32抗体と10分インキュベートした後、モノクローナル抗体と氷上で30分インキュベートした。洗浄後、FACSCantoII (BD Biosciences) でデータを取得し、FlowJo (Tree Star) を用いて解析した。各サブセットのソーティングには、FACS Aria (BD Biosciences) を使用した。
- (4) ROS の測定: ROS の測定には、H₂DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) および CellROX Green (ThermoFisher) を用いた。細胞懸濁液に10 μM の H₂DCFDA または CellROX Green を添加し、30分室温でインキュベートした後、FACSCantoII (BD Biosciences) で解析した。
- (5) 定量PCR: total RNA は TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて抽出した後に、FastGene RNA 精製キット (日本ジェネティクス) を用いて精製した。RT は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて行った。PCR は LightCycler 480 を用いて、cDNA、KOD

SYBR qPCR Mix、および各プライマーを含む最終容量 10 μ l の溶液で、98°C 2 分の後、98°C 10 秒、60°C 10 秒、68°C 30 秒を 40 サイクル行った。内在性コントロールとしては β -actin を増幅した。

(6) 組織学：組織学的解析のために、組織をパラフィンに包埋し、切片を hematoxylin と eosin で染色した。膝軟骨組織の染色には、Fast Green & Safranin-O 染色を用いた。

免疫組織学的解析では、膝関節組織を 20% sucrose を含む PBS で洗浄し、Super Cryoembedding Medium (Leica Microsystems Japan) に包埋し、凍結した。切片は 2% BSA/PBS で 30 分ブロックした後、Streptavidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories) で 30 分ブロックした。切片は Alexa Fluor 647 標識 CD4 抗体または抗 CD8 抗体、および H₂DCFDA と 1 時間室温で反応させた後、洗浄し FV1000D IX83 (Olympus) で観察した。

(7) ELISA：血中 immunoglobulin の測定には、抗マウス Ig 抗体を固層化後、プレートをブロッキング、洗浄した後に標準物質またはサンプルを入れ反応させた。プレートを洗浄後、HRP が標識された抗マウス Ig 抗体と反応させた。プレートは 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine で発色させた。コラーゲン特異的抗体の測定には、マウス由来 type II コラーゲンを固層化後、プレートをブロッキング、洗浄した後に標準物質またはサンプルを入れ反応させた。プレートを洗浄後、HRP が標識された抗マウス Ig 抗体と反応させた。プレートは 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine で発色させた。

(8) PTEN の酸化の測定および Western Blot：FACS Aria でソーティングした細胞は、Sulfonylated Protein Cell-Based Detection Kit (Cayman Chemical) を用いてサンプルを調整した。サンプルは、SDS-PAGE で電気泳動後、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンは、2% BSA/PBS で 30 分ブロックした後、抗マウス PTEN 抗体 (Cell Signaling Technology) と 4°C で 1 晩反応させた。洗浄後、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体と室温 1 時間反応させた。メンブレンは、ECL (Pierce) で発色させた。

4. 研究成果

(1) 抗酸化剤投与によるコラーゲン投与関節炎の抑制：CIA モデルマウスに抗酸化剤 NAC および TEMPOL を投与し、レドックス反応の自己免疫疾患への関与を検討したところ、NAC および TEMPOL を経口投与したマウスでは、投与していないマウスと比較して関節における浸潤細胞数が顕著に減少しており、関節の肥厚および骨破壊も抑制された。さらに、Superoxide radical を主に除去する TEMPOL でその効果が NAC よりも高いことから、関節リウマチにおける Superoxide radical の関与が示唆された。CIA マウスの結果に対して、CAIA マウスにおいては抗酸化剤の投与による炎症の抑制が認められなかった。このことより、抗酸化剤による関節炎の抑制効果は抗体産生のプロセスに関与することが予想された。

(2) 抗酸化剤による抗体産生の抑制と Treg 減少の回復：抗酸化剤による関節炎の抑制が、抗体産生のプロセスの抑制によるかを検討するため、抗体産生に関与する Tfh および GC B の数をフローサイトメトリーを用いて調べたところ、CIA マウスで観察された Tfh および GC B の増幅が、抗酸化剤の投与により顕著に抑制されることを見出した。さらに、炎症惹起時の抗体価を ELISA 法を用いて調べたところ、抗酸化剤を投与したマウスでは総抗体価および II 型コラーゲン特異的抗体価が CIA マウスと比較して、顕著に抑制されることが示された。

Tfh と GC B による抗体産生は、濾胞内において CD4 陽性および CD8 陽性の Treg によって制御されている。そこで、これらの細胞をフローサイトメトリーを用いて検討したところ、CIA マウスでは、CD4 ならびに CD8 制御性 T 細胞 (Treg) がナイーブのマウスと比較して顕著に減少しており、これらの細胞は抗酸化剤の投与によって、その数が回復することが示された。一方で、関節炎の悪性化に関与する IL-17 産生ヘルパー T 細胞 (Th17) と Treg 細胞の比を調べたところ、CIA マウスで顕著に増加していた Th17/Treg の比が、抗酸化剤の投与によりナイーブマウスと同等程度まで減少していることを見出した。

(3) ROS の Treg に与える影響についての検討：CIA マウスにおいて Treg 細胞が ROS により減少しているかを検討するため、Treg 細胞内の ROS の値を測定したところ、Treg 細胞内の ROS の値は細胞数と逆相関することが示された。さらに、CD4 および CD8 Treg における PTEN の酸化的阻害を検討したところ、CIA マウス由来の Treg において PTEN の酸化が亢進しており、抗酸化剤の投与によって酸化的阻害が解除されており、ROS による Treg の安定的維持シグナルの阻害が示唆された。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Satooka Hiroki, Ishigaki Hirohito, Todo Kagefumi, Terada Koji, Agata Yasutoshi, Itoh Yasushi, Ogasawara Kazumasa, Hirata Takako	4. 巻 10
2. 論文標題 Characterization of tumour-infiltrating lymphocytes in a tumour rejection cynomolgus macaque model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） https://doi.org/10.1038/s41598-020-65488-x	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 Sato Tomomi, Satooka Hiroki, Ichioka Satoko, Maruo Yoshihiro, Hirata Takako	4. 巻 -
2. 論文標題 Citruillinated fibrinogen is a target of auto-antibodies in interstitial lung disease in mice with collagen-induced arthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	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） 10.1093/intimm/dxaa021	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 Matsui Makoto, Nagakubo Daisuke, Satooka Hiroki, Hirata Takako	4. 巻 526
2. 論文標題 A novel Siglec-F+ neutrophil subset in the mouse nasal mucosa exhibits an activated phenotype and is increased in an allergic rhinitis model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 599 ~ 606
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.122	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 Murray Anne Frances, Satooka Hiroki, Shimizu Kuniyoshi, Chavasiri Warinthorn, Kubo Isao	4. 巻 5
2. 論文標題 Polygonum odoratum essential oil inhibits the activity of mushroom derived tyrosinase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e02817 ~ e02817
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02817	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 該当する

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Satooka H., Sato T., Nakamura Y., Todo K., and Hirata T.
2. 発表標題 Redox-mediated signaling in regulatory T cells is involved in the development of autoimmunity
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会. 2019年 12月 13日, アクトシティ浜松 (浜松市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Todo K., Asano K., Satooka H., and Hirata T.
2. 発表標題 Involvement of IgD-expressing cells in type I hypersensitivity
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会. 2019年 12月 13日, アクトシティ浜松 (浜松市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura Y., Satooka H., and Hirata T.
2. 発表標題 Moesin regulates macrophage homeostasis in the lung and its deficiency leads to pulmonary inflammation
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会. 2019年 12月 13日, アクトシティ浜松 (浜松市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satooka H., Sato T., Nakamura Y., Todo K., and Hirata T.
2. 発表標題 Redox-mediated regulatory T cell homeostasis and its involvement in autoimmunity.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会・学術集会. 2018年 12月 12日, 福岡国際会議場 (福岡市).
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato T., Satooka H., and Hirata T.
2. 発表標題 Characterization of rheumatoid arthritis-associated interstitial pneumonia using collagen-induced arthritis mice.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会・学術集会. 2018年 12月 12日, 福岡国際会議場 (福岡市).
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsui M., Satooka H., Nakamura Y., and Hirata T.
2. 発表標題 The ERM protein moesin regulates natural killer cell distribution in vivo.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会・学術集会. 2018年 12月 12日, 福岡国際会議場 (福岡市).
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 里岡大樹, 佐藤知実, 平田多佳子.
2. 発表標題 ERMタンパク質moesinによるCD8+ Treg細胞の恒常的維持とその自己寛容への関与.
3. 学会等名 第28回 Kyoto T Cell Conference. 2018年 6月 16日, 京都大学芝 蘭会館 (京都市).
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
研究協力者	平田 多佳子 (Hirata Takako)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	藤堂 景史 (Todo Kagefumi)		
研究協力者	佐藤 智美 (Sato Tomomi)		
研究協力者	中村 優月 (Nakamura Yuzuki)		