

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007~2008

課題番号:19591193

研究課題名(和文) 単球系細胞における stat5 の機能と自己免疫疾患制御の探索的研究

研究課題名(英文) Function of Stat5 in myeloid lineage cells: A explorative research to control autoimmune disease

研究代表者 山岡 邦宏(YAMAOKA KUNIHIRO)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号:20425317

研究成果の概要:

血液中の細胞でも単球系細胞、特に抗原提示能力が高い樹状細胞に着目しその分化・機能における Stat5 の機能を解明した。Stat5 を欠損した樹状細胞は正常に分化可能であったが IL-12 を過剰に産生し、抗原特異的 T 細胞からの過剰な IFN- γ 産生を誘導した。つまり、樹状細胞における Stat5 は IL-12 産生を負に制御することで T 細胞からの IFN- γ 産生を抑制し自己免疫疾患病態に関与している可能性が考えられた。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:内科系臨床医学

キーワード:臨床免疫学、樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の発症においては抗原提示細胞からの IL-12 産生とそれに引き続く IFN- γ の過剰産生が大きく関与していることが長らく示唆されてきた。最近、抗原提示細胞からの IL-23 の産生とそれによる T 細胞からの IL-17 の産生が自己免疫疾患発症に関わる報告が多く見られている。しかし、一方で依然として IL-12 の過剰産生が樹状細胞のアポトーシスを抑制し自己トレランスを破壊することが自己免疫疾患発症つなるとする報告や、(Chen M et al. Science

2006) 炎症性腸疾患発症に IL-23 は抑制的に働き IL-12 がより重要とする報告もあり、(Becker C et al. J Immunol 2006) 自己免疫疾患発症のメカニズムにおける樹状細胞とサイトカインの機能に関しては結論が得られていない。

サイトカインはその受容体に結合し Jak-Stat 伝達経路を介してその多様な生理機能を発揮する。サイトカインの中にあつて IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 と IL-21 はその受容体の一部である・鎖を共有し、Jak ファミリーの中の Jak3 が恒常的に結合して

いる。これらのサイトカインは受容体に結合後 Jak3 をリン酸化し引き続きその下流にある転写因子 Stat5 をリン酸化することによりその標的遺伝子の転写を制御している。Jak3 と Stat5 は共にリンパ球の増殖と分化に必要不可欠であることは多くの研究により証明されている。しかし、自然免疫に重要な樹状細胞を含めた単球系細胞における機能についてはあまり知られていない。最近、Jak3 欠損マウス由来樹状細胞において LPS や CpG DNA 等の Toll-like receptor (TLR) のリガンドで刺激すると野生型と比較して過剰な IL-12 を産生し、ひいては T 細胞から過剰な IFN- γ の産生を誘導することを申請者らは見いだした (Yamaoka K. et al. Blood 2005)。この結果をもとに Jak3 の下流で活性化される転写因子である Stat5 の関与につき検討を加えるため Cre-loxp システムを用いて Dr. Hennighausen L. (National Institute of Health, Bethesda, USA) が作成した Stat5a/Stat5b ダブルノックアウトマウスを用いた。Stat5a/Stat5b ダブルノックアウトマウスは生直後に死に至るため、胎児肝細胞を、致死放射線照射を行った野生型マウスに移植することで血球細胞特異的 Stat5 欠損マウスを作成した。移植後 8 週目に骨髓細胞採取し *in vitro* にて樹状細胞を作成し予備実験を行った。LPS 刺激後のサイトカイン産生は予想された如く、Jak3 欠損樹状細胞と同様、IL-12 の過剰産生が見られ、抗原特異的 T 細胞と共培養した際には T 細胞からの IFN- γ の過剰産生が観察された。以上より、Jak3-Stat5 シグナル伝達経路が IL-12 の産生を負に制御していることが明らかとなり、樹状細胞における Stat5 の生体内における機能と IL-12 過剰産生と自己免疫疾患発症につき検討を加えるため LysMCre トランスジェニックマウスと Stat5a/Stat5b ダブルノックアウトマウスを交配し単球系細胞特異的 Stat5 コンディショナルノックアウトマウス (Stat5^{condKO} マウス) を作成することを計画した。

2. 研究の目的

(1) Stat5 の樹状細胞における IL-12 制御機構の解明

現在までに IL-12 の産生制御に Stat5 が関与しているとの報告はなく、Stat5 欠損樹状細胞における IL-12 の過剰産生機構は不明である。IL-12 の転写に関わる転写因子としては IRF ファミリーの IRF1, IRF3, IRF8 や

NF \cdot B が知られているが Stat の関与は報告がない。しかし、LPS 刺激した際に TLR4 の下流で Stat5 が活性化され遺伝子の転写制御に関与すると報告もあり (Kimura A. et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2005) IL-12 の転写制御への関わりを示唆するものである。樹状細胞を TLR リガンドで刺激した際の Stat5 の活性化と他の転写因子との分子会合の可能性につき検討し、Stat5 による新たな IL-12 制御機構を解明する。

(2) Stat5^{condKO} マウスにおける単球系細胞機能の解析と自己免疫疾患発症との関係
骨髓移植を用いて作成した Stat5a/Stat5b ダブルノックアウト樹状細胞を用いた予備実験の結果より Stat5^{condKO} マウスにおいても樹状細胞より過剰の IL-12 産生と T 細胞からの IFN- γ 過剰産生が予想される。本研究は Stat5^{condKO} マウスを作成することで単球系細胞より産生される過剰な IL-12 の生体内に置ける役割を解明する。IL-12 過剰産生が確認されれば現在までに報告されているように自己免疫疾患発症の可能性が考えられる。しかし、自己免疫疾患発症については IL-12 以外に IL-23 と IL-27 の関与が報告されておりこれらのサイトカインについても検討を加える。これにより *in vivo* における単球系細胞の Stat5 によるサイトカイン産生制御機構と自己免疫疾患発症のメカニズムへの関与を解明する。

(3) 自己免疫疾患の臨床病態 (活動性・治療反応性など) と Stat5 発現解析
申請者の所属する臨床教室においては多くの自己免疫疾患患者 (関節リウマチ、SLE、炎症性腸疾患等) を抱えており、その疾患活動性と樹状細胞におけるサイトカイン産生 (IL-12、IL-23、IL-27) と Stat5 の発現、活性化につき検討を加える。Stat5^{condKO} マウスの結果との相関性を検討しヒトの自己免疫疾患と病因としての樹状細胞における Stat5 の関連を解明する

3. 研究の方法

単球系細胞特異的 Stat5 コンディショナルノックアウトマウス (Stat5^{condKO} マウス) を作成したが、マウス脾臓内における樹状細胞では Stat5 が発現していることが明らかとなり、前述の胎児肝細胞移植による血球系細胞特異的 Stat5 欠損キメラマウスにて以下の目的で実験を継続することとした。

(1) 樹状細胞の分化

In vitro; 胎生肝細胞または骨髓細胞を採取し、GM-CSF と IL-4 存在したで 7 日間培養後、

CD11c 陽性細胞 (Bone marrow derived DC; BMDC) の占有率をフローサイトメトリーにて検討した。

In vivo : キメラマウス脾臓内樹状細胞のサブセット解析をフローサイトメトリーにより行った。

(2) 樹状細胞の機能解析

① 微飲作用 :

FITCでラベルされたアルブミンで培養し30-60分後の細胞内への取り込みをフローサイトメトリーにて評価する。

② サイトカイン産生 :

LPSで24時間刺激後の培養上清中のサイトカインをELISAまたはサイトカインビーズアレイで測定した。

③ 遊走能 :

CD45.1 congenicマウスの一方の足底に野生型BMDC、もう一方の足底にStat5欠損BMDCを 1×10^6 個皮下注射し、24時間後の所属リンパ節への遊走をリンパ節中のCD45.2陽性細胞の占有率で評価を行った。

④ 抗原提示能力 :

オバアルブミンを特異的に認識するCD4陽性T細胞を有するOT2トランスジェニックマウスよりCD4陽性細胞を精製し、CFSEで標識する。各種オバアルブミン濃度存在下で樹状細胞と72時間共培養し、T細胞からのサイトカイン産生評価のため培養上清中のIFN- γ をELISAにて測定すると共にCFSEの希釈をフローサイトメトリーで測定しT細胞の増殖を評価する。

⑤ 養子免疫 :

OT2トランスジェニックマウスよりCD4陽性細胞を精製する。一方、樹状細胞をオバアルブミンと培養し、MHCクラスII上にオバアルブミンを提示する樹状細胞を用意。CD45.1 congenicマウスにT細胞を尾静脈より投与し、同時に野生型とStat5欠損樹状細胞をそれぞれ一方の手掌に注入する。3日後に両側の腋窩リンパ節を回収し、フローサイトメトリーを用いてCD45.2陽性T細胞からのIFN- γ 産生を抗IFN- γ 抗体を用いての細胞内染色で、CFSEラベル法でT細胞の増殖を比較検討する。

4. 研究成果

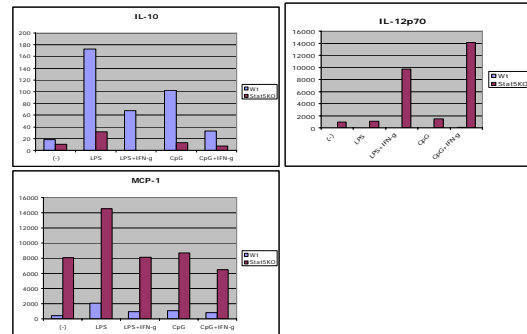
(1) 樹状細胞分化

胎性肝細胞またはキメラマウス骨髄細胞をGM-CSF+IL-4で7日間培養後、CD11c陽性細胞は野生型とStat5欠損DCの間に陽性率に違いを認めなかった。また、キメラマウスの脾臓内DCサブセットはPlasmacytoid DC(CD11c^{int}

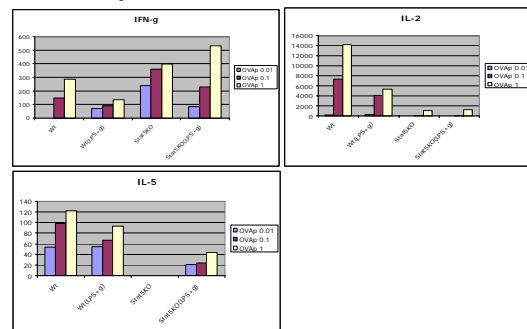
B220⁺)、conventional DC(CD11c⁺ B220⁻)共に占有率に野生型との間に差を認めなかった。また、conventional DCを更にCD4⁺CD8⁻、CD8⁺CD4⁻、CD8⁻CD4⁻の3つのサブセットに分けて解析を行ったが、やはり野生型と比較してそれぞれの占有率に違いはみられなかった。この結果よりStat5はJak3と同様、樹状細胞の分化に関与しないことが明らかとなった。

(2) 樹状細胞機能

DCの抗原取り込み能を反映する微飲作用と遊走能については、いずれも野生型との間に差を認めなかった。サイトカイン産生能ではLPSまたはCpG DNAによる刺激によりStat5欠損DCではIL-12とMCP-1過剰産生とIL-10の産生抑制を認めたが、代表的炎症性サイトカインであるIL-6やTNF- α の産生に差は認めなかった。

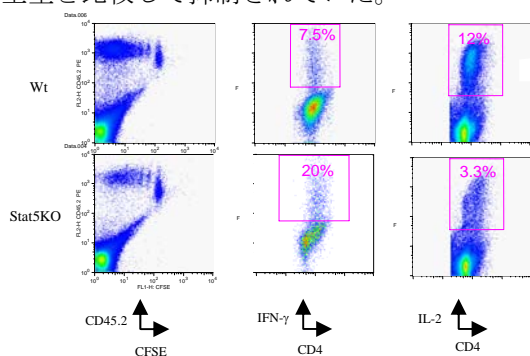


OT2CD4⁺T細胞との共培養ではT細胞のIFN- γ とIL-2の細胞内染色よりStat5欠損DCと共培養したものではIL-2陽性率が低く、CFSE希釈系においても増殖は抑制されていたにも関わらずIFN- γ 陽性細胞は野生型と共培養したT細胞よりも有意に高かった。この結果は培養上清中のサイトカイン測定にて抗原の濃度依存性に同様の傾向がみられ、LPS+IFN- γ で前処置した樹状細胞を用いた場合には更に顕著であった。



養子免疫の実験ではDCを投与した四肢の所属リンパ節内のCD4⁺T細胞の解析を行った。Stat5欠損DCを投与した所属リンパ節におけるOT2 CD4⁺ T細胞のIL-2陽性細胞は野生型と比較して低いものIFN- γ 陽性率は高かった。また、IL-2陽性細胞率を反映してCFSE希釈系に

よる細胞増殖の解析ではStat5欠損DCを投与したリンパ節においてOT2 T細胞の増殖は野生型と比較して抑制されていた。



これらの結果からDCにおけるStat5はIL-12産生を抑制することでCD4+T細胞をTh2分化に偏向することが明らかとなった。この結果はJak3欠損DCと同様の結果である。つまり、Jak3-Stat5の阻害は、DCの分化に影響を与えないものの、DCよりのIL-12産生を誘導し、T細胞からのIFN-γ産生の促すと考えられる。IFN-γについてはこれまでに自己免疫疾患の発症、増悪因子と考えられていたが、最近ではIL-17が病態に関与している可能性が数多く報告され、IFN-γはIL-17の産生を抑制することから関節リウマチを含めた自己免疫疾患制御に重要と考えられている。現在、Jak3に対する特異的阻害剤は関節リウマチに対する治験が第3相試験まで進行している経口内服薬であるが高い有効性が既に報告されている。その観点からは、リンパ球におけるJak3-Stat5の重要性は広く知られているものの、DCにおけるStat5の機能と抗炎症作用を明確にしたことは今後の国際的治験進行には重要な知見であると考えられる。つまり、本研究はJak3阻害剤の作用機序とその安全性を示す結果であると言える。

今後はヒト単球系細胞におけるStat5の機能の解明が必要である。ヒトにおけるJak3はその欠損によりリンパ球の分化・増殖不全に基づく重症複合型免疫不全症を呈するものの、単球系細胞の異常が報告されていないことはStat5がJak3の下流で活性化することを考慮すれば本研究結果と一致するものである。更なるサイトカイン産生やin vivoにおける機能を探るにはコンディショナルノックアウトマウスの作成が重要であり現在進行中である。

5. 主な発表論文等

(計 0)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 邦宏 (YAMAOKA KUNIHIRO)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：20425317

(2) 研究分担者

田中 良哉 (TANAKA YOSHIYA)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：30248562

(3) 連携研究者

なし