

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19599009

研究課題名（和文） シェーグレン症候群モデルマウスにおける $\gamma\delta$ T 細胞の病因病態への関与研究課題名（英文） Research of $\gamma\delta$ T cells in Sjogren's syndrome model mouse.

研究代表者

植田 郁子 (UEDA IKUKO)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：80452100

研究成果の概要：Id3^{-/-}マウスにおいて $\gamma\delta$ T細胞の増殖の異常が出現する機序と、シェーグレン症候群様症状発症との関連の検証を行った。 $\gamma\delta$ T細胞の増加は胸腺におけるT細胞発生の段階のうち β 鎖再編成の進んだ段階で起こっていた。 $\gamma\delta$ T細胞の多くがV γ 1陽性でレパトアの異常があり、刺激によるIFN- γ 産生は亢進していた。さらにId3^{-/-} $\gamma\delta$ T細胞を野生型マウスに移入したところ、唾液腺への細胞浸潤を認め、シェーグレン症候群発症への関与が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚生理学、シェーグレン症候群、 $\gamma\delta$ T細胞、Id3^{-/-}

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群は中年女性に好発する涙腺と唾液腺を標的とする臓器特異的自己免疫疾患であるが、時に全身の臓器病変を伴う自己免疫疾患である。原因はいまだ不明であるが、遺伝的要因、ウイルスなどの環境要因、免疫異常などが関連して発症する自己免疫疾患に位置づけられている。近年、Id3ノ

ックアウト (Id3^{-/-}) マウスが原発性シェーグレン症候群モデルマウスとして有用であることが報告された (Immunity 21, 551-560, 2004)。Id3分子はE2AやHEBなどのbasic helix-loop-helix型転写因子の機能を抑制する。これまでの研究によりId3^{-/-}マウスにおけるシェーグレン症候群の病態にはT細胞が重要な働きをしていることがわかっている

(Immunity 21, 551-560, 2004)。しかしながら T 細胞には CD4 陽性 $\alpha\beta$ T 細胞、CD8 陽性 $\alpha\beta$ 型 T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットが存在し、いずれの T 細胞が特に病気の発症に寄与しているかについての詳細な検討はこれまでにされていなかった。そこで Id3-/-マウスの T 細胞サブセットを観察したところ、Id3-/-マウスにおいて $\gamma\delta$ T 細胞が胸腺と末梢に異常に増加していることがわかった。このことから、 $\gamma\delta$ T 細胞がシェーグレン症候群様症状の発症に関わっていることが予想された。

2. 研究の目的

本研究ではId3-/-マウスで $\gamma\delta$ T細胞の増殖の異常が出現する機序を解明し、さらに $\gamma\delta$ T細胞の異常とシェーグレン症候群様症状の発症との関連の検証を行うことを目的とする。即ち、以下の点について詳細に検討する。

- (1) Id3-/-においてはId3分子の欠如による胸腺における分化の異常により $\gamma\delta$ T細胞が増加している可能性と末梢で $\gamma\delta$ T細胞が増加している可能性がある。したがって $\gamma\delta$ T細胞の発生のどの段階で増加しているのかという発生機序に関して検討する。
- (2) Id3-/-においてはId3分子の欠如により胸腺の正や負の選択に異常をきたす事により正常では選択されない、例えば自己抗原特異的な $\gamma\delta$ T細胞受容体(TCR)遺伝子を持つ $\gamma\delta$ T細胞が選択されるため、胸腺や末梢で異常な $\gamma\delta$ T細胞が増殖し、シェーグレン症候群様症状を引き起こす可能性がある。したがってId3-/-における $\gamma\delta$ T細胞のレパトアを正常マウスのそれと比較する。
- (3) Id3分子の欠如により末梢 $\gamma\delta$ T細胞がTCRを介した刺激に対し異常な応答をすることによりシェーグレン症候群様症状を引き起

こす可能性がある。正常な $\gamma\delta$ T細胞は抗原刺激に対してIFN- γ 産生、細胞障害活性を示すことが知られている。したがってId3-/-マウス由来の末梢 $\gamma\delta$ T細胞を用いてIFN- γ 産生や細胞障害活性応答を解析し正常マウスのそれと比較する。

- (4) Id3-/-由来の $\gamma\delta$ T細胞がシェーグレン症候群様症状を発症する直接的原因となっているかどうかを Id3-/-由来の $\gamma\delta$ T細胞をリンパ球を欠如したマウスに移入することにより病態を発症することができるかどうかを検討することにより解明する。

3. 研究の方法

- (1) Id3-/-において $\gamma\delta$ T細胞の発生のどの段階で増加しているのかという発生機序に関して、BrdUを投与して取り込ませることによりBrdU陽性細胞の動態を時間をおって観察した。
- (2) TCR β 鎖の再編成の有無についてD β とJ β との再編成を検出する特異的なプライマーを用いてPCRを行い検討した。さらに遺伝子再構成されていないTCR β 遺伝子を持つT細胞の量 (germline configuration)を定量的PCRを用いて測定した。
- (3)個々の蛍光色素で標識したV γ を特異的に認識する抗体を用いて、Id3-/-由来の $\gamma\delta$ T細胞を染色し、 $\gamma\delta$ T細胞レパトアをフローサイトメトリーで検討した。
- (4)Id3-/-マウスにおける $\gamma\delta$ T細胞のアポトーシスの増減の有無について検討するため、蛍光標識したAnnexin Vで染色し、フローサイトメトリーを用いて評価した。
- (5) Id3-/-マウス由来 $\gamma\delta$ T細胞のIFN- γ 産生能を蛍光色素で標識した抗IFN- γ 抗体を用いた細胞内サイトカイン染色を行いフローサイトメトリーにて測定した。また細胞障害作

用があるかどうかを、細胞内のperforinおよびgranzymeを蛍光色素で標識した特異的な抗体により染色しフローサイトメトリーにて解析した。

(6)Id3^{-/-}マウスから $\gamma\delta$ T細胞を取り出し、リンパ球を欠損したマウスに移植し、シェーグレン症候群の発症の有無を検討した。対象としてId3^{-/-} $\alpha\beta$ T細胞を移入したマウスと比較した。

4. 研究成果

(1) Id3^{-/-}における $\gamma\delta$ T細胞の発生についてBrdUを用いて行った検討

Id3^{-/-}マウスにおいて、 $\gamma\delta$ T細胞は胸腺で分化の異常により増加している可能性と末梢で増加している可能性があり、そのいずれであるかを検討するため、BrdUを投与し増殖中の細胞のDNAに取り込ませて標識し、BrdU陽性細胞の動態を観察した。BrdU陽性 $\gamma\delta$ T細胞の絶対数は野生型に比較してId3^{-/-}マウスで増加していたが、逆にその頻度は低下していた。このことからId3^{-/-}マウスにおける $\gamma\delta$ T細胞の増加は末梢でクローナルな増殖を起こしているというよりは、胸腺で $\gamma\delta$ T細胞の前駆細胞が、その発生の過程で増殖していることが示唆された。

(2) TCR β 鎖のgermline configurationの定量的によるId3^{-/-}胸腺における $\gamma\delta$ T細胞の発生の段階に関する検討

胸腺の発生のどの段階で生じるのかを検討するため、まず $\gamma\delta$ T細胞のTCR β 鎖の再編成の有無について検討した。PCRを用いて確認したところ、これまでに報告されているように、野生型だけではなく、Id3^{-/-}マウスにおいても $\gamma\delta$ T細胞においてもTCR β 鎖の再編成がおこっていることが確認され、 $\alpha\beta$ と $\gamma\delta$ T細胞発生の分岐過程で生じていることが示唆

された。続いて $\gamma\delta$ T細胞がTCR β 鎖再編成の過程のどの段階で起こるのかについて、遺伝子再構成されていないTCR β 遺伝子を持つT細胞の量(germline configuration)を定量的PCRを用いて測定することにより検討した。TCR β 遺伝子におけるgermline configurationを測定することのできる2種類のプライマーを作成し、検討したところ、そのいずれにおいてもId3^{-/-}マウスでは野生型に比較し $\gamma\delta$ T細胞におけるTCR β 鎖のgermline configurationが低下していることが明らかとなった。このことからId3^{-/-}マウスの $\gamma\delta$ T細胞はT細胞の発生の段階のうち、よりTCR β 鎖再編成の進んだ段階から発生していると考えられた。

(3)Id3^{-/-} $\gamma\delta$ T細胞のアポトーシスの減少の有無に関する検討

Id3^{-/-}マウスにおける $\gamma\delta$ T細胞の増加が $\gamma\delta$ T細胞のアポトーシスの減少による可能性の有無について検討するため、蛍光標識したAnnexin Vで染色し、フローサイトメトリーを用い評価したところ、Id3^{-/-}マウスにおいて明らかなアポトーシスの増加は認められなかった。従って、TCR β 鎖のgermline configurationの定量的を用いた実験結果とあわせ、Id3^{-/-}マウスにおける $\gamma\delta$ T細胞の増加が $\gamma\delta$ T細胞の発生の段階における産生の増加に起因すると考えた。

(4)Id3^{-/-}マウスにおける $\gamma\delta$ T細胞のレパトアに関する検討

胸腺や末梢で異常な $\gamma\delta$ T細胞が増殖し、シェーグレン症候群様症状を引き起こす可能性について検討するため、 $\gamma\delta$ T細胞のレパトアをフローサイトメトリーにより調べた。その結果、Id3^{-/-}マウスにおける $\gamma\delta$ T細胞のほとんどがV γ 1陽性であり、 $\gamma\delta$ T細胞のレパトアに異常があることが確かめられた。

(5)Id3^{-/-}マウスにおける $\gamma\delta$ T細胞の機能に関

する検討

これらの $\gamma\delta$ T細胞機能の異常の有無につきId3^{-/-}マウスより脾臓の $\gamma\delta$ T細胞を単離して、PMA+ionomycinで刺激し、Id3^{-/-}マウス由来 $\gamma\delta$ T細胞のIFN- γ 産生能を蛍光色素で標識した抗IFN- γ 抗体を用いた細胞内サイトカイン染色を行いフローサイトメトリーにて測定した。また細胞障害作用があるかどうかを同様の刺激後、細胞内のperforinおよびgranzymeを蛍光色素で標識した特異的な抗体により染色しフローサイトメトリーにて解析した。これらの結果 Id3^{-/-}マウス由来 $\gamma\delta$ T細胞において、IFN- γ 産生が有意に増加しており、病態への関与が疑われた。同じくPMA+ionomycinの刺激によるperforinおよびgranzymeの産生は野生型マウスと同程度であった。

(6)Id3^{-/-} $\gamma\delta$ T細胞がシェーグレン症候群発症病態に関与しているかどうか

Id3^{-/-} $\gamma\delta$ T細胞が、シェーグレン症候群の発症に関与しているかどうかを直接的に調べるため、Id3^{-/-}マウスから $\gamma\delta$ T細胞を取り出し、放射線照射した野生型マウスに移植した。その結果、唾液腺への細胞浸潤を認め、Id3^{-/-} $\gamma\delta$ T細胞が、Id3^{-/-}マウスにおけるシェーグレン症候群の発症に関わっている可能性が示された。

(7)総括

これらの結果より Id3 は胸腺において、 $\gamma\delta$ T細胞の発生やTCR γ 、 δ 鎖の遺伝子再編成を制御していることが明らかとなった。また異常に増殖した $\gamma\delta$ T細胞は刺激により高いIFN- γ 産生能を有し、Id3^{-/-}マウスにおけるシェーグレン症候群様症状の発症に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Mugii Naoki, Minoru Hasegawa, Yasuhito Hamaguchi, Ikuko Ueda-Hayakawa (他 10 名、7 番目), Reduced red blood cell velocity in nailfold capillaries as a sensitive and specific indicator of microcirculation injury in systemic sclerosis, Rheumatology in press

② Ikuko Ueda-Hayakawa, Josh Malios, and Yuan Zhuang, Id3 restricts the developmental potential of gd lineage during thymopoiesis, J Immunol 182, 5306-5316, 2009

③ Yasuhito Hamaguchi, Minoru Hasegawa, Manabu Fujimoto, Ikuko Hayakawa (他 9 名、9 番目), The clinical relevance of serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. Br J Dermatol 158, 487-95, 2008

④ Takamasa Wayaku, Minoru Hasegawa, Kenzo Kaji, Ikuko Hayakawa (他 11 名、10 番目), Antigen specificity of antihistone antibodies in connective tissue disease patients with anti-U1RNP antibodies. 28, 113-119, 2007

⑤ Ikuko Hayakawa, Thomas F. Tedder, Yuan Zhuang, B-lymphocyte depletion ameliorates Sjogren syndrome in Id3 knockout mice. 122, 73-9, 2007

[学会発表] (計 1 件)

① Ikuko Hayakawa and Yuan Zhuang, Id3 is required to suppress $\gamma\delta$ lineage development post TCR β gene rearrangement. 第 37 回日本免疫学会総会学術集会、2007.11.21、東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 郁子 (UEDA IKUKO)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号 80452100

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし