

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08681

研究課題名(和文)天疱瘡様自己抗体産生モデルマウスにおける樹状細胞活性化機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of DC activation in autoantibody-producing Pemphigus-like model mice

研究代表者

中野 直子(Nakano, Naoko)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・客員准教授

研究者番号：90222166

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)：既知のモデル抗原をマウスの表皮特異的に発現させ、抗原特異的CD4T細胞とクラススイッチが可能な抗原特異的B細胞を組み合わせで解析した。抗原を発現させたマウスではCD4T細胞の不応答化が認められたが、B細胞の一部はIgG1+細胞へ変化した。表皮にDNA損傷反応を起こすストレスを加えると、皮下リンパ節でcDC1とpDCの増加が認められた。一方、抗原特異的CD4T細胞はCXCR5やPD-1を発現するTfh様細胞へと変化し、IgG1+B細胞の割合が増加し、一部のマウスでは皮膚に炎症が認められた。よって、表皮細胞のストレスにより誘導される因子がDCを活性化させ、自己抗体産生を誘導することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで抗原特異的な自己免疫病の解析モデルは、T細胞あるいはB細胞サイドで解析するものが中心だった。本研究では発現させた自己抗原特異的なT細胞およびB細胞を同時に解析できるマウスを構築し、これらを制御する樹状細胞に注目した点に学術的意義がある。自己免疫疾患の発症は遺伝的要因に加え環境因子が大きく関わっていることから、表皮細胞に与えたストレスが樹状細胞を活性化し自己免疫応答を促進するという結果は、人々を取り巻く種々の物質が病気の発症につながる可能性を示唆しており、社会的な意義があると言える。今後、より具体的な活性化メカニズムを解明し、自己免疫病の制御法に繋げる必要がある。

研究成果の概要(英文)：A model antigen was expressed specifically in the epidermis using a Tamoxifen-induced Cre activation system. CD4 T cells from the antigen-specific TCR transgenic mice and B cells from the antigen-specific Ig-knock-in mice in the antigen-induced mice were analyzed. We found that antigen-specific CD4 T cells became anergic upon antigen induction, however, a part of antigen-specific B cells became IgG1+. DNA damage-inducing reagents caused epidermal stress, which promoted the migration of cDC1 and pDC into draining lymph nodes. Epidermal stress promoted Tfh markers, CXCR5, Bcl6, and PD-1 expression in CD4 T cells. At the same time, we found IgG1+ B cells more frequently and some mice having dermatitis. Therefore, epidermal stress-induced molecules activated DCs, converting anergic CD4 T cells into Tfh cells, which lead to autoantibody production.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫病 樹状細胞 CD4T細胞のアナジー化 自己抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚は絶えず外界からの刺激を受けており、恒常性維持のための調節機構を備えている。皮膚にはまた種々の免疫細胞が常在し、環境因子や異物に反応し生体の防御に貢献している。皮膚に紫外線照射を行うと細胞死や炎症反応が誘導されるが、このとき自己免疫応答の制御を担う制御性 T 細胞が誘導され、免疫応答が抑制されることが知られている。末梢で制御性 T 細胞分化を誘導する樹状細胞は、コンベンショナル樹状細胞中の CD103⁺cDC1 であることが報告されており、これらの樹状細胞は自己抗原を取り込んで T 細胞に提示し制御性 T 細胞の分化を誘導し、自己抗原特異的免疫応答を抑制している。CD103⁺cDC1 は一方、感染細胞やがん細胞から抗原を取り込み、細胞傷害性 CD8T 細胞に抗原提示し、感染やがんの排除において重要な役割を担っている。

(2) B 細胞のクラススイッチを誘導する T_{fh} 細胞に対する抗原提示は、一般的に CD11b⁺cDC2 であることが知られている。天疱瘡などに関わる自己抗体が産生されるとき、CD4T 細胞を活性化する樹状細胞と寛容化を誘導する樹状細胞のバランスの不均衡化が原因となる可能性があるが、その機構は不明である。また、自己免疫応答を誘導する樹状細胞は何の分子を介して活性化し自己免疫寛容が壊れるのか、その分子機構は明らかでない。本研究では、皮膚における樹状細胞応答の制御機構に焦点を当て、天疱瘡様の自己抗体産生に至る機構を明らかにする。

2. 研究の目的

(1) 本研究では天疱瘡に似た病態を作るために、表皮基底層に抗原を発現誘導するマウスを作製する。このモデル抗原に対する抗体産生を誘導し、天疱瘡で見られるような病態が形成される分子機構を解明することを目的とする。

(2) 抗体産生誘導にはヘルパー T 細胞と B 細胞の相互作用が重要であるが、本研究では免疫応答を活性化および抑制化する樹状細胞に注目し、T 細胞に抗原を提示する樹状細胞の役割を中心に解析する。また、T 細胞の活性化により誘導される B 細胞のクラススイッチをモニターできる抗原特異的 Ig-heavy chain ノックインマウスを用い、B 細胞活性化の場とタイミングの解析を容易にする。樹状細胞はウイルスの持つ核酸などに反応する自然免疫レセプターやセンサー分子を介して活性化し応答を起こすが、恒常性を失った自己の組織や異常細胞が樹状細胞を活性化する機構を明らかにし、最終的に皮膚で樹状細胞の寛容化と免疫応答を振り分ける機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 免疫応答を解析するモデル抗原として膜結合型 Hen Egg Lysozyme (mHEL) を Keratin14-プロモータの制御下で発現する CreER^{T2} マウスを用い、投与したタモキシフェン依存的に mHEL を発現させ、抗原特異的な応答を解析する。これまでの解析において、このマウスはタモキシフェン投与 3 日目に表皮基底層に mHEL が発現することが明らかになっている。本研究では、mHEL 特異的 TCR トランスジェニックマウスを組み合わせることにより、樹状細胞から T 細胞への抗原提示、T 細胞と B 細胞の一連の応答の解析を行う。また、表皮の恒常性を破る方法として、HEL の発現誘導とともに、紫外線照射や DNA 損傷反応をおこす薬剤の塗布を行い、樹状細胞の応答を解析する。

(2) これまでの ELISA による血清中抗体価測定に代わり、Jayson Cyster らによって確立された抗 HEL-Ig-h ノックインマウスと抗 HEL-Ig-light chain トランスジェニックマウスを組み合わせた HyHEL10 マウスを用い、HEL 特異的 B 細胞の活性化とクラススイッチをフローサイトメーターおよび免疫組織染色により解析する。これにより、B 細胞がいつどこで、どのクラスの抗体にクラススイッチしたかを明らかにする。

(3) 表皮細胞に発現させた mHEL を、どの樹状細胞が取り込んでリンパ節で T 細胞に提示するかを明らかにする。HEL 特異的 3A9TCR トランスジェニックマウスの CD4T 細胞を用い、mHEL を表皮に発現させたマウスの所属リンパ節からセルソーターで分取した樹状細胞分画中で、HEL 特異的 T 細胞を活性化させる樹状細胞を特定する。

(4) 表皮細胞にストレスを加え、このとき皮膚および皮下リンパ節における樹状細胞を組織染色およびフローサイトメーターにより解析する。

4. 研究成果

(1) mHEL 発現誘導マウスにタモキシフェンを投与すると表皮細胞特異的に HEL の発現が確認できた。このマウスに HEL 特異的 3A9 マウスを交配し HEL を発現させると、CD4T 細胞の多

くは CD44^{high}CD62L^{low} で CD73 および FR4 を発現するアナジー化 T 細胞に変化した。また、mHEL を発現誘導したマウスでは CD4T 細胞中の制御性 T 細胞の割合が増加し、免疫寛容化が誘導された。

(2) 同様に HEL を発現誘導したマウスにおける B 細胞の応答を解析したところ、B 細胞のクラススイッチはほとんど認められなかった。しかし、ここに HEL 特異的 CD4T 細胞を存在させると、一部の B 細胞は IgG1+細胞にクラススイッチした。このことから、不応答化した T 細胞は B 細胞をヘルプするポテンシャルを持っている可能性が示唆された。

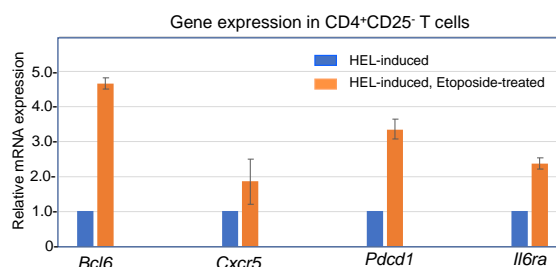


図1 HEL誘導マウスにおけるHEL特異的CD4T細胞の遺伝子発現解析

(3) 表皮に DNA 損傷反応を誘導する薬剤 Etoposide を塗布し、皮膚における炎症反応を誘導した。皮膚にはミエロイド系細胞の浸潤が全体的に亢進したが、その中で cDC1 および pDC の割合が増加した。cDC1 は細胞表面に BTLA を発現し、制御性 T 細胞誘導に関わっていることが報告されている⁽¹⁾。また、pDC も制御性 T 細胞誘導に関わっていることが知られている⁽²⁾。しかし、皮下リンパ節では、CD4T 細胞の割合が減少するとともに制御性 T 細胞の割合も減少した。これらのことから、表皮細胞のストレスによって誘導された因子によって cDC1 あるいは pDC の機能が変化したと考えられた。

図1 HEL誘導マウスにおけるHEL特異的CD4T細胞の遺伝子発現解析

(4) 皮膚にストレスを加えたマウスの皮下リンパ節から CD4T 細胞を単離し、発現遺伝子を解析した。Foxp3 を発現していない制御性 T 細胞以外の CD4T 細胞における CXCR5, PD-1, Bcl6 の発現上昇が認められた(図 1)。これらのことから、不応答化した CD4T 細胞は Tfh 細胞へと分化していることが示唆された。

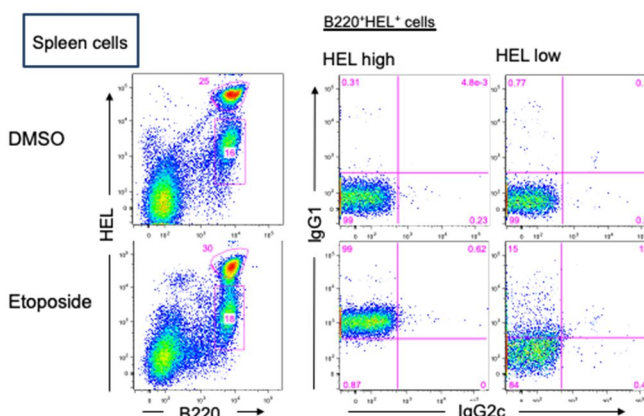


図2 HEL誘導マウスにおけるHEL特異的B細胞のクラススイッチ

(5) このようなマウスでは、HEL 特異的 B 細胞の多くが IgG1+に変化しており(図 2)、一部のマウスでは皮膚に異常が認められ、皮膚炎様の症状が認められた。

(6) 私たちはこれらの解析と別に、BTLA のリガンドであり同時にシグナルを受け取るレセプターとして機能する HVEM 分子を T 細胞特異的に欠損したマウスを作製して解析した。元々 cDC1 には BTLA の発現が高く認められ、B 細胞側にも BTLA が発現していることから、樹状細胞-T 細胞間、B-T 細胞間でも BTLA を介した HVEM シグナルが T 細胞の機能に関与している可能性がある。HVEM を T 細胞特異的に欠損させたマウスでは T 細胞分化に異常があることを明らかにできたが、CD4T 細胞の免疫応答の制御に関しては、現在解析中である。

<引用文献>

- 1) Jessica Bourque and Daniel Hawiger The BTLA-HVEM-CD5 immunoregulatory axis-an instructive mechanism governing pTreg cell differentiation *Frontiers Immunology*, 2019, 10, Article 1163
- 2) Boris Reizis Plasmacytoid dendritic cells: Development, regulation, and function *Immunity*, 2019, 50, 37-50

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuki Kugii, Yui Kuroki, Yasushi Hara, Ryo Goitsuka, Naoko Nakano	4. 巻 210
2. 論文標題 Lack of Herpes Virus Entry Mediator signals in thymocyte impairs conventional CD8 T cell selection and promotes memory-like CD8 T cell development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J. Immunol	6. 最初と最後の頁 1 - 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2200748	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Haruki Okuda, Naoko Nakano
2. 発表標題 Regulation of epidermal antigen-specific antibody production by autoreactive T cells
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2021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
研究分担者	後飯塚 僚 (Goitsuka Ryo) (50301552)	東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授 (32660)	

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