

令和 5 年 4 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08797

研究課題名(和文)濾胞制御性T細胞分化誘導による新規SLE治療法確立のための基礎的検討

研究課題名(英文) Study for Establishment of Novel SLE Therapy by Induction of Follicular Regulatory T Cell Differentiation

研究代表者

鈴木 浩太郎 (SUZUKI, KOTARO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90554634

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)：T濾胞制御(Tfr)細胞は、リンパ濾胞と胚中心に位置し抗体応答を制御する。CD25陰性成熟Tfr細胞は、CD25陽性Tfr細胞を経て、Tregから分化する。Ascl2がTfh細胞の発生に関与していることは、明らかにされているが、Tfr細胞の発生におけるAscl2の役割については不明である。本研究では、Ascl2がCD25陽性Tfr細胞とCD25陰性Tfr細胞で高率かつ優先的に発現していること、Ascl2の非存在下でCD25陽性Tfr細胞からCD25陰性Tfr細胞への分化が損なわれることを明らかにした。これらの結果は、Ascl2がTfr細胞の発生に重要な役割を果たしていることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究においては、FOXP3-Cre x Ascl2^{fl/fl}マウスを作成し、Tfr細胞分化やimiquimod誘導性ループスの病態形成におけるTfr細胞内Ascl2の役割を明らかにした。本研究結果により、今後Ascl2を標的としたTfr細胞/Tfh細胞バランスの制御による新たなSLE治療法確立のための基盤が構築されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：T follicular regulatory (Tfr) cells, a subset of Treg, locate to the lymphoid follicle and GC and regulate antibody responses. CD25⁻ mature Tfr cells differentiate from CD25⁺ Treg cells through CD25⁺ immature Tfr cells. Others and we have shown that Ascl2 plays a role in Tfh cell development; however, the role of Ascl2 in the development of Tfr cells remains unclear. Here, I found that Ascl2 was highly and preferentially expressed in CD25⁺ Tfr cells and CD25⁻ Tfr cells, and that the differentiation from CD25⁺ Tfr cells to CD25⁻ Tfr cells was impaired by the absence of Ascl2. Furthermore, the forced Ascl2 expression in Treg cells downregulated CD25 expression and suppressed IL-2-induced phosphorylation of STAT5, which is known to suppress CD25⁻ Tfr cell development. These results suggest that Ascl2 plays a vital role in developing Tfr cells.

研究分野：免疫学

キーワード：Tfr細胞 SLE Ascl2

1. 研究開始当初の背景

CXCR5 や Bcl6 などの濾胞ヘルパーT (Tfh) 細胞のマーカーを発現する濾胞性制御性 T (Tfr) 細胞は、リンパ濾胞と胚中心 (GC) に位置し、Tfh 細胞や GC 発達を調節することで抗体応答を制御する CD4+ Foxp3+制御 T (Treg) 細胞とは別のサブセットである。Tfr 細胞の分化は多段階のプロセスを経由する。ナイーブ Treg 細胞の一部は活性化すると CXCR5 をアップレギュレートし、CXCR5 依存的に二次リンパ組織の T-B 境界に向かって移動する。CXCR5+ Treg 細胞は、濾胞 B 細胞との相互作用により Bcl6、ICOS、PD-1 の発現を上昇させ、CD25+ (IL-2 receptor α chain) 未熟 Tfr 細胞への分化を導く。これらの CD25+ Tfr 細胞は GC に向かって移動し、CD25 を失い、Bcl6 を上昇させ、完全に成熟した CD25- Tfr 細胞へと分化する。最近の研究では、IL-2 受容体シグナルが STAT5 を介した Bcl6 の抑制と Blimp1 の誘導を介して Tfr 細胞の完全成熟を阻害することが示され、CD25 のダウンレギュレーションとその後の IL-2 受容体シグナルの阻害が成熟 CD25- Tfr 細胞の分化に重要な役割を果たすことが示唆されている。Bach2 が CD25 発現の直接抑制とその後の IL-2 受容体シグナルの減衰を通じて Tfr 細胞の発生に重要な役割を担うことが報告されたが、Bach2 欠損 Treg 細胞は、Tfr 細胞の分化に部分的な障害を示すに過ぎず、Bach2 以外の分子も Tfr 細胞の発生に関与していることが示唆された。

2. 研究の目的

塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス転写因子である Achaete-scute complex homolog 2 (Ascl2) は、Tfh 細胞で優先的に発現し、Tfh 細胞への分化を誘導するが、Ascl2 が Tfr 細胞で発現しているかどうか、Tfr 細胞の分化に関与しているかどうかはまだ不明である。ここでは、CD25+ Tfr 細胞と CD25- Tfr 細胞における Ascl2 の発現を調べ、Treg 細胞における Ascl2 欠損マウスを用いて、Tfr 細胞発生における Ascl2 の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) Tfr 細胞における遺伝子発現、2) Ascl2 欠損マウスにおける Tfr 細胞分化、3) Ascl2 遺伝子同士の効果、について検討した。

4. 研究成果

1) Ascl2 は Tfr 細胞で高発現している

Ascl2 が Tfr 細胞の分化に関与しているかどうかを調べるために、まず Tfr 細胞における Ascl2 の発現を検討した。Foxp3 レポーターマウス (ホモ接合体 Foxp3YFP/Cre [Foxp3Cre/Cre] マウス) を CFA 中で NP 標識 KLH で免疫し、免疫 10 日後に Treg 細胞 (YFP+CXCR5-CD25+CD4+ cells)、CD25+Tfr 細胞 (YFP+CXCR5+CD25+CD4+ 細胞)、CD25-Tfr 細胞 (YFP+CXCR5+CD25-CD4+ 細胞)、および Tfh 細胞 (YFP-CXCR5+CD25-CD4+ 細胞) はフローサイトメトリによって脾臓から分離した (図 1A)。Treg 細胞が Ascl2 を発現しない一方で、CD25+Tfr 細胞は中程度のレベルの Ascl2 を発現し、CD25-Tfr 細胞は Tfh 細胞のように高いレベルの Ascl2 を発現した (図 1B)。予想通り、CD25-Tfr 細胞は、Tfh 細胞より低いものの、Tfr 細胞発生のマスターレギュレーターである Cxcr5 と Bcl6 を発現した (図 1B)。CD25-Tfr 細胞は CD25+Tfr 細胞と比較して、Prdm1 (Blimp-1) と Ctla4 を低レベルで発現していた (図 1B)。特に、CD25+Tfr 細胞と CD25-Tfr 細胞は、Treg 細胞と比較して、Bach2 を低レベルで発現していた (図 1B)。

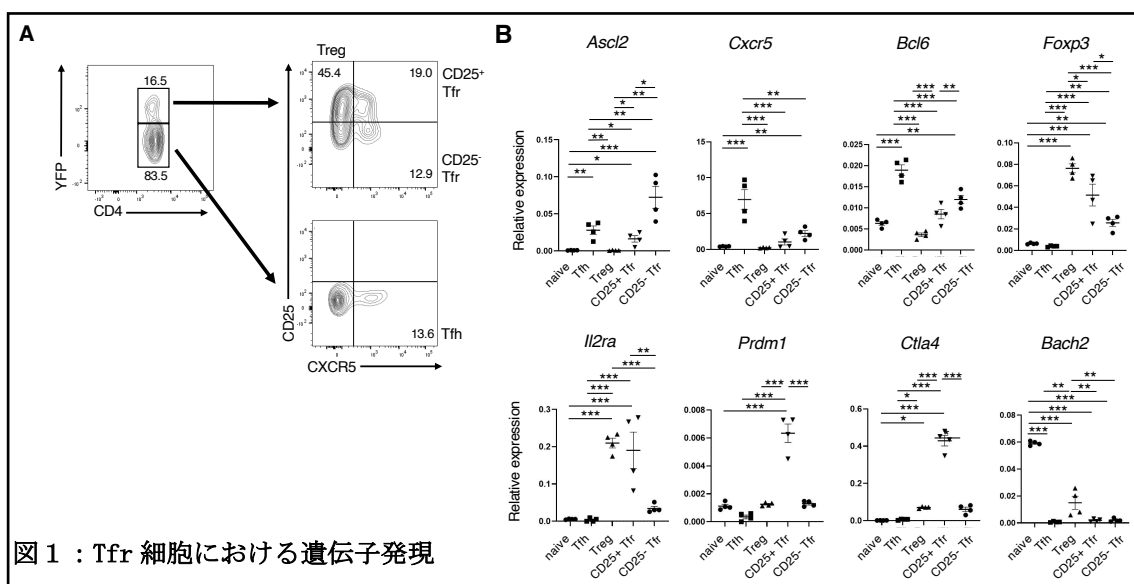
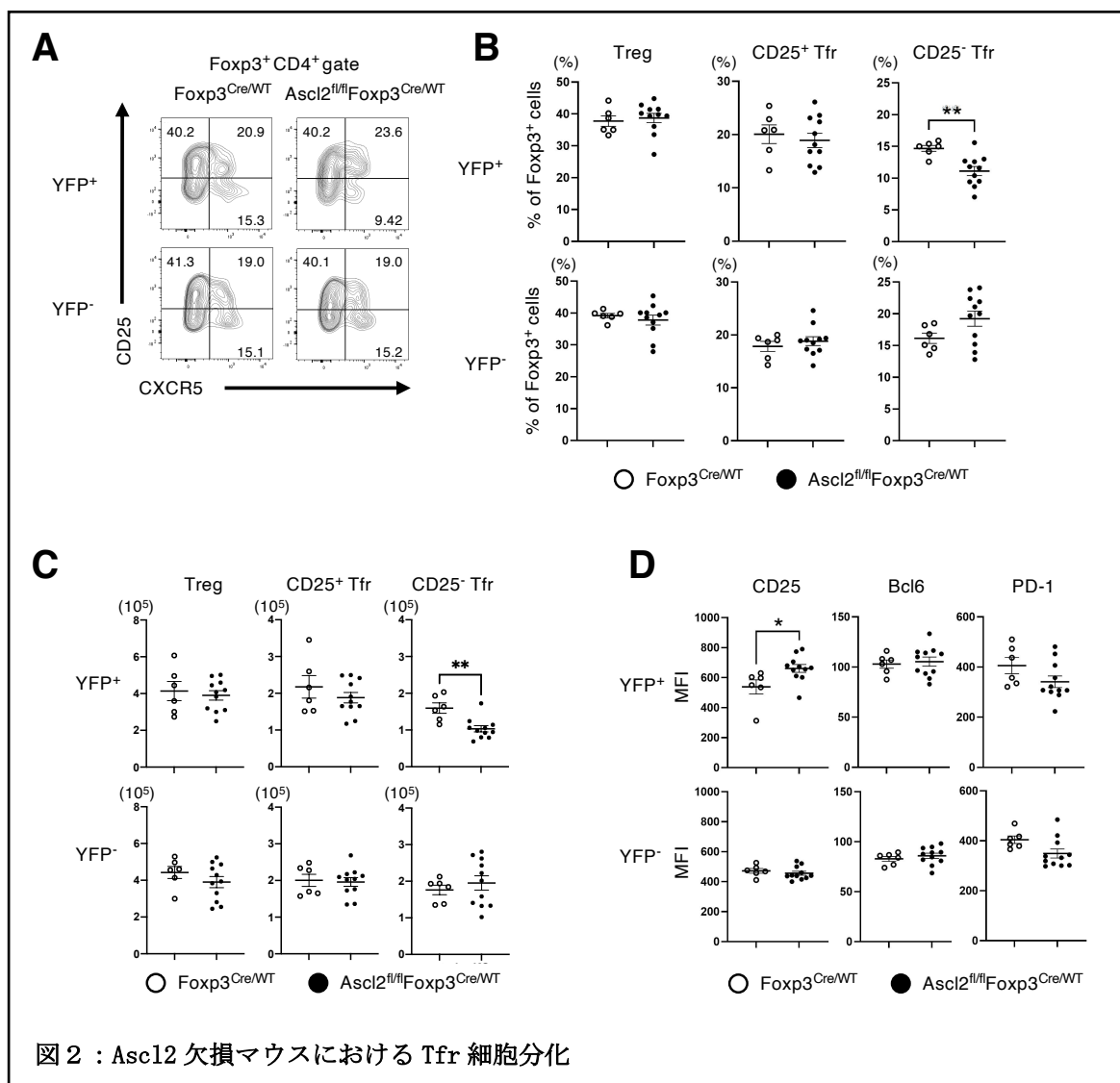


図 1 : Tfr 細胞における遺伝子発現

2) Ascl2 欠損 Foxp3+CD4+細胞では、CD25-Tfr 細胞の発生が損なわれている

次に、Tfr 細胞の発生に Ascl2 が必要であるかどうか検討した。この実験では、Ascl2^{fl/fl} Foxp3^{Cre}/WT (Ascl2^{fl/fl} heterozygous Foxp3^{YFP}/Cre) マウスを用いた。X 不活性化により、Foxp3^{YFP}/Cre 対立遺伝子が活性化された Foxp3⁺細胞では Ascl2 遺伝子が欠損しているが、雌 Ascl2^{fl/fl} Foxp3^{Cre}/WT マウスでは Foxp3^{WT} 対立遺伝子が活性化している Foxp3⁺細胞では Ascl2 遺伝子が欠損していない。Ascl2^{fl/fl} Foxp3^{Cre}/WT マウスおよびコントロール Foxp3^{Cre}/WT マウスに NP-KLH を免疫し、脾臓から分離した細胞をフローサイトメトリーにより解析した。FACS 解析の結果、Ascl2^{fl/fl} Foxp3^{Cre}/WT マウスと Foxp3^{Cre}/WT マウスの間で、YFP⁺細胞中の CD25⁺Tfr 細胞 (CXCR5⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞) の頻度に有意差はなかった (図 2A, B)。一方、YFP⁺細胞における CD25⁻Tfr 細胞 (CXCR5⁺CD25⁻Foxp3⁺細胞) の頻度は、Ascl2^{fl/fl} Foxp3^{Cre}/WT マウスでは Foxp3^{Cre}/WT マウスのそれよりも著しく低かった (図 2A, B)。YFP⁺細胞における CD25⁻Tfr 細胞の絶対数は、CD25⁺Tfr 細胞ではなく、Ascl2^{fl/fl} Foxp3^{Cre}/WT マウスにおいて、Foxp3^{Cre}/WT マウスのそれらよりも有意に低かった (図 2C)。Ascl2^{fl/fl} Foxp3^{Cre}/WT マウスと Foxp3^{Cre}/WT マウスの間で、CD25⁺Tfr 細胞および YFP⁻細胞中の CD25⁻Tfr 細胞の頻度および絶対数に有意差がないことを確認した (図 2A-C)。Tfr 細胞の発生における Ascl2 の役割をさらに検討するために、Tfr 細胞 (CXCR5⁺Foxp3⁺CD4⁺ cell) における CD25、Bcl6 と PD-1 の発現量を検討した。図 2A に示した結果と一致して、YFP⁺細胞の Tfr 細胞における CD25 の発現量は、Ascl2^{fl/fl} Foxp3^{Cre}/WT マウスの方が Foxp3^{Cre}/WT マウスの場合よりも高かった (図 2D)。一方、YFP⁺細胞の Tfr 細胞における Bcl6 および PD-1 のレベルには、Ascl2^{fl/fl} Foxp3^{Cre}/WT マウスと Foxp3^{Cre}/WT マウスの間で明らかな差はなかった (図 2D)。予想通り、Ascl2^{fl/fl} Foxp3^{Cre}/WT マウスと Foxp3^{Cre}/WT マウスの間で、YFP⁻細胞の Tfr 細胞における CD25、Bcl6、PD-1 のレベルには明らかな差は見られなかった (Fig. 2D)。これらの結果は、Ascl2 が Tfr 細胞における CD25 発現のダウンレギュレーションと CD25⁻成熟 Tfr 細胞の分化に、細胞内在性のメカニズムで関与していることを示唆している。



3) Ascl2 の強制発現により、Treg 細胞における CD25 と Blimp1 の発現がダウンレギュレートされる

Ascl2 が介在する Tfr 細胞分化の基礎となるメカニズムに取り組むため、レトロウイルス導入系を用いてナイーブ CD4+ T 細胞に Ascl2 を発現させ、iTreg 誘導条件下で CD4+ T 細胞の Tfr 細胞関連分子の発現に対する強制 Ascl2 発現の影響を検討した。図 3A および 3B に示すように、MIT-Ascl2 レトロウイルスで形質転換した細胞は、コントロール MIT レトロウイルスで形質転換した細胞よりも高レベルの CXCR5 を発現し、低レベルの CD25 および Blimp-1 を発現した。

Ascl2 は Treg 細胞では発現しないが、CD25+Tfr 細胞から CD25-Tfr 細胞への分化の過程で発現が増加する。Treg 細胞の Tfr 細胞への分化における Ascl2 の役割をさらに明らかにするため、ナイーブ CD4+T 細胞ではなく Treg 細胞に Ascl2 をレトロウイルスで導入し、Tfr 細胞関連分子の発現に対するその影響を分析した。この実験では、Foxp3Cre/WT マウスの脾臓からフローサイトメトリーにより Foxp3+ Treg 細胞を YFP+細胞として選別し、MIT-Ascl2 レトロウイルスで形質転換した。一貫して、MIT-Ascl2 レトロウイルスで形質転換した Foxp3+細胞は、MIT 形質転換した対照細胞に比べて、CXCR5 を高レベルで、CD25 と Blimp-1 を低レベルで発現した (図 3C、D)。さらに、MIT-Ascl2 導入 Foxp3+細胞は、MIT 導入 Foxp3+細胞よりも高いレベルの Bcl6 を発現した (図 3C、D)。また、CXCR5^{high} CD25^{lo} 細胞の頻度は、MIT-Ascl2 導入細胞では MIT 導入細胞と比較して有意に増加した (図 3E)。これらの結果は、Ascl2 が Foxp3+細胞において、CXCR5 と Bcl6 をアップレギュレートし、CD25 と Blimp-1 をダウンレギュレートすることを示す。

以上の実験より、Ascl2 が CD25 遺伝子の転写を抑制していることが示唆された。

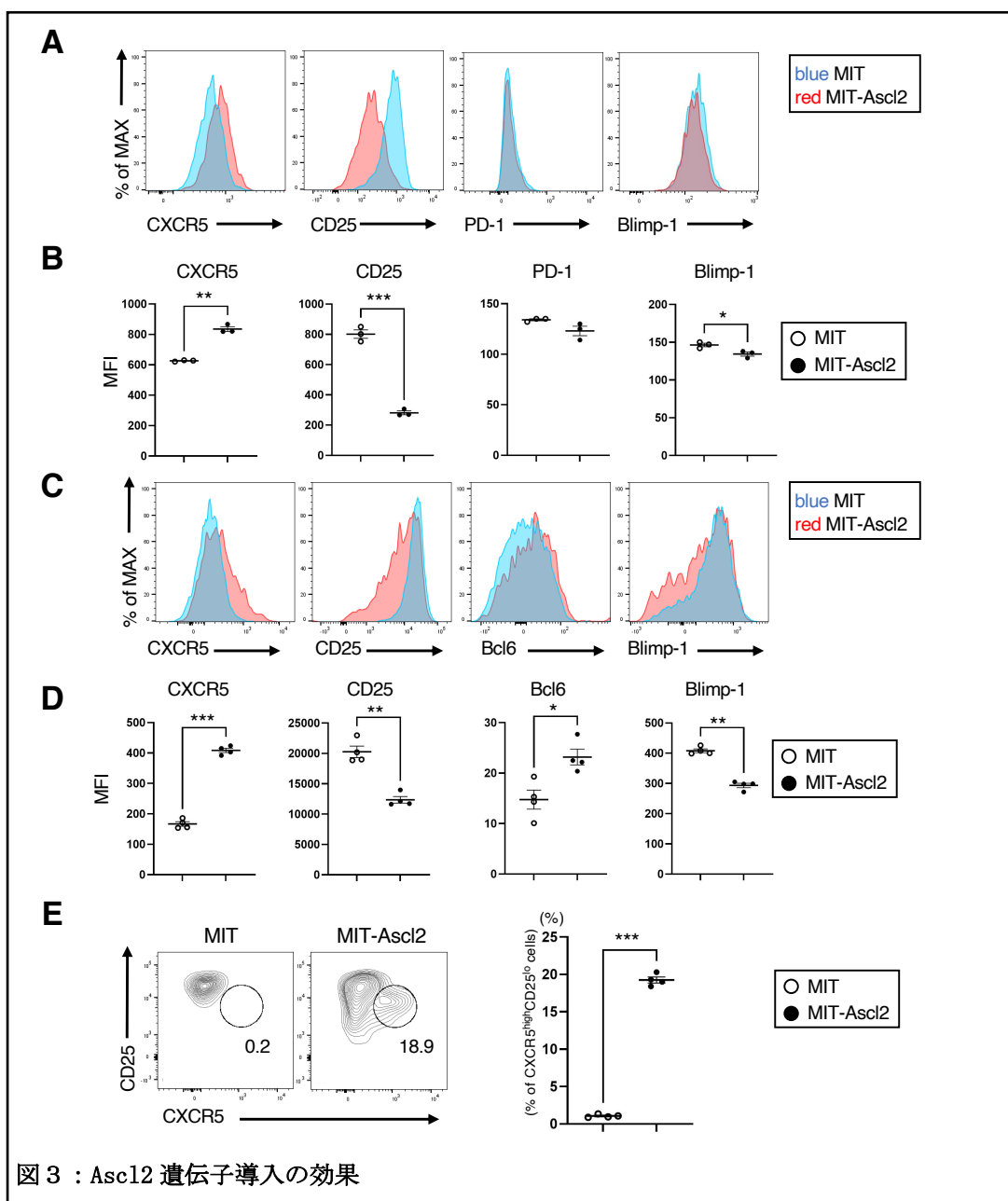


図 3 : Ascl2 遺伝子導入の効果

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukuta M, Suzuki K, Kojima S, Yabe Y, Suzuki K, Iida K, Yamada H, Makino S, Iwata A, Tanaka S, Iwamoto T, Suto A, Nakagomi D, Wakashin H, Maezawa Y, Maezawa Y, Takemoto M, Asanuma K, Nakajima H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) expressed in podocytes attenuates glomerulonephritis and suppresses autoantibody production in an imiquimod-induced lupus model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lupus Sci Med.	6. 最初と最後の頁 426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/lupus-2020-000426.	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 Suzuki K, Suzuki K, Yabe Y, Iida K, Ishikawa J, Makita S, Kageyama T, Iwamoto T, Tanaka S, Yokota M, Iwata A, Suto A, Nakajima H.	4. 巻 22
2. 論文標題 NF- B1 Contributes to Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation by Inducing V 4 + V 4 + T17 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol.	6. 最初と最後の頁 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2021.11.004.	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 Saku A, Furuta S, Kato M, Furuya H, Suzuki K, Fukuta M, Suehiro K, Makita S, Tamachi T, Ikeda K, Takatori H, Maezawa Y, Suto A, Suzuki K, Hirose K, Nakajima H.	4. 巻 39
2. 論文標題 Experience of musculoskeletal ultrasound scanning improves physicians' physical examination skills in assessment of synovitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 1091-1099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10067-020-04960-5.	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
1. 著者名 Makita S, Takatori H, Iwata A, Tanaka S, Furuta S, Ikeda K, Suto A, Suzuki K, Ramos SBV, Nakajima H.	4. 巻 11
2. 論文標題 RNA-Binding Protein ZFP36L2 Downregulates Helios Expression and Suppresses the Function of Regulatory T Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 1291-1300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.01291.	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0件

〔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	須藤 明 (Suto Akira) (50447306)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	
研究分担者	岩本 太郎 (Iwamoto Taro) (80835083)	千葉大学・医学部附属病院・助教 (12501)	

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