

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08807

研究課題名(和文) MAIT細胞を介した抗DNA抗体産生細胞の分化成熟メカニズムの解明

研究課題名(英文) Role of MAIT cells in autoreactive B cell response to DNA.

研究代表者

千葉 麻子 (Chiba, Asako)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40532726

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)：全身性エリテマトーデス(SLE)のマウスモデルを用い、MAIT細胞は抗dsDNA抗体の産生を促進して病態形成に関わることを明らかにした。SLE発症後のマウスに、MAIT細胞の活性化を抑制する物質を投与することにより、抗dsDNA抗体の産生を抑制できることを示した。MAIT細胞の活性化に重要なIFN $\gamma$ の産生には、細胞老化が促進した単球が関与している可能性を明らかにした。IFN $\gamma$ はSLEの治療ターゲットとして注目されていることから、単球による過剰なIFN $\gamma$ 産生やMAIT細胞の活性化は、SLEの病態形成において重要な役割を担う可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MAIT細胞は、非ペプチド自己抗原であるdsDNAに対するB細胞応答を促進することを明らかにした。マウスモデルを用い、生体内でMAIT細胞の活性化を抑えることにより、抗dsDNA抗体の産生が低下することを示した。更に、SLEの病態形成やMAIT細胞の活性化に重要なIFN $\gamma$ の産生源として、細胞老化が亢進した単球の可能性を示した。MAIT細胞や細胞老化状態にある単球は、SLEの重症化や再発を抑える新規治療法の標的として発展する可能性が明らかとなり、社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：The production of anti-dsDNA antibodies is a hallmark of systemic lupus erythematosus (SLE). However, it is not well understood which cells activate dsDNA reactive B cells. This study demonstrated that MAIT cells directly activate B cells to produce anti-dsDNA antibodies. Inhibition of MAIT cell activation in vivo resulted in a reduction of anti-dsDNA antibodies even after the onset of SLE. IFN $\gamma$  is known to be the most important cytokine in the pathogenesis of SLE. We have previously shown that MAIT cells are activated by IFN $\gamma$  and that lupus monocytes are capable of producing IFN $\gamma$  upon activation of the STING pathway. This study also showed that increased IFN $\gamma$  production by lupus monocytes was associated with accelerated cellular senescence of these cells. These findings suggest that increased IFN $\gamma$  production by monocytes and activated MAIT cells may contribute to the pathogenesis of SLE.

研究分野：免疫学

キーワード：全身性エリテマトーデス MAIT細胞 自己抗体 IFN $\gamma$  単球

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE, systemic lupus erythematosus)は、抗 dsDNA 抗体を代表とした様々な自己抗体の産生を特徴とした全身性自己免疫疾患である。B 細胞による抗体の産生においては、同じ抗原を認識する濾胞ヘルパーT 細胞と B 細胞の相互作用が重要である。しかし、ヘルパーT 細胞は MHC class II 分子に結合したペプチド抗原を認識するため、DNA のような非タンパク抗原に対する抗体反応には直接関与しない。そのため、どのような細胞が dsDNA 反応 B 細胞の活性化に寄与するのかが不明な点が多い。mucosal-associated invariant T (MAIT)細胞は、T 細胞受容体に特定の 鎖を使用し、MHC class Ib に属する histocompatibility molecule related 1 (MR1)分子に提示された非ペプチドを抗原として認識する自然リンパ球の一種である。MAIT 細胞は末梢血 T 細胞の 5%を占める大きな細胞群であることから、免疫応答におけるその役割が注目されている。SLE 患者では、MAIT 細胞の活性化状態が疾患活動性と関連していたことから、SLE 病態における MAIT 細胞の役割に注目した。SLE モデルマウスを用いて MAIT 細胞の病態への関与を検証したところ、MAIT 細胞が存在することで、抗 dsDNA 抗体の産生が亢進すること、腎炎病態が悪化することが明らかとなった。MAIT 細胞の活性化を抑制する MR1 リガンドを、ループス発症前に投与することにより、抗 dsDNA 抗体の産生は低下し、腎炎も軽症化した。さらに、MAIT 細胞は、B 細胞に直接作用し、抗 dsDNA 抗体の産生を促すことを見出した。以上のことから、活性化した MAIT 細胞は自己反応性 B 細胞などの応答を促進することで、ループス病態の悪化に寄与することが示唆された。

我々は MAIT 細胞が抗原刺激だけでなく、サイトカイン、中でも、SLE 病態に深く関わる interferon (IFN )の刺激により強く活性化されることを報告している。このことから、ループス病態における MAIT 細胞の活性化にも、IFN などのサイトカインが関与していると推察される。IFN の主要な産生細胞として、形質細胞様樹状細胞(pDC)が知られている。SLE における IFN 産生源の探索を行ったところ、TLR7 リガンド刺激に対して、SLE 患者由来の pDC は高い IFN 産生能を有することを見出した。核酸受容体 cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) の二本鎖 DNA が結合すると、その下流の Stimulator of interferon genes (STING)経路が活性化される。末梢血単核球に STING リガンドである 2'3' cGAMP で刺激を加えると、SLE 患者では IFN の産生が見られ、その主要な産生源は単球であることが明らかとなった。単球は末梢血白血球の数%を占める大きな細胞群であるが、健常者由来の単球では STING 刺激でも IFN 産生は殆ど見られない。そのため、SLE では、単球が産生する IFN は MAIT 細胞を含む免疫細胞を活性化し病態形成に寄与する、と仮説を設定した。

### 2. 研究の目的

SLE 病態における、自己抗体応答における MAIT 細胞の役割と、MAIT 細胞を活性化する IFN について、その産生亢進のメカニズムを明らかにする。具体的には以下の 4 つの目的を設定した。

- (1) MAIT 細胞は、タンパク、非タンパク、どちらのタイプの自己抗原に対する抗体応答にも関わるのかが検証する。
- (2) 発症後のループスモデルマウスにおいても、MAIT 細胞の活性化を抑制することにより、自己抗体の産生は減少するのかを明らかにする。
- (3) COVID-19 パンデミックにより予定通りの研究を進めることができなかったため、COVID-19 ワクチン前後のヒト検体を用いることにより、タンパク抗原に対する抗体応答における MAIT 細胞の役割を検証する。
- (4) SLE 患者の単球では、どのようなメカニズムで IFN 産生能が亢進しているのかを明らかにする。RNA シークエンス解析により、IFN 産生 SLE 単球で特徴的に発現が亢進している遺伝子群を同定する。

### 3. 研究の方法

(1) SLE モデルマウスである *FcgRIIB<sup>-/-</sup>Yaa* マウスを、MAIT 細胞が存在しない MR1 欠損マウスと交配し、MAIT 細胞が存在しない SLE モデルマウスを作製した。このマウスと通常の *FcgRIIB<sup>-/-</sup>Yaa* マウスを用い、抗 dsDNA 抗体およびリボ核タンパク抗原である RNP に対する自己抗体について、血清中の濃度を ELISA 法により測定した。

(2) *FcgRIIB<sup>-/-</sup>Yaa* マウスに MR1 リガンドを投与し、MAIT 細胞の活性化の抑制がループス病態へ及ぼす影響を検証した。*FcgRIIB<sup>-/-</sup>Yaa* マウスは生後 8 週頃から血液中の抗 dsDNA 抗体値が陽性となることから、MR1 リガンドの投与期間を(A 群)生後 4-8 週および(B 群)生後 8-12 週に設定し、MR1 リガンド投与の効果について、それぞれのコントロール群と比較した。評価項目は、血清抗 dsDNA 抗体値、フリーサイトメトリー法を用いた胚中心 B 細胞および形質細胞の活性化状態、病理学的解析による糸球体腎炎の重症度とした。

(3) タンパク質抗原に対する B 細胞応答における MAIT 細胞の関与を検証した。新型コロナワクチン(BNT162b2 SARS-CoV-2 スパイク mRNA ワクチン)接種後の血液を採取し、MAIT 細胞、B 細胞、

抗体応答に関わるヘルパーT細胞(濾胞ヘルパーT細胞、末梢ヘルパーT細胞)、およびB細胞(メモリーB細胞、形質芽細胞)について、それらの頻度および活性化状態が、SARS-CoV-2 スパイクに対する抗体応答と関連性があるかを、フローサイトメトリー法を用いて検証した。また、スパイク抗原刺激により活性化マーカーが陽性となるT細胞を、スパイク特異的T細胞としてフローサイトメトリー法により検出した。免疫抑制薬の治療を受けていない20-79歳の男女71名(男性58%)を対象とし、血液採取のタイミングは、ワクチン接種前、2回目のワクチン接種後1週間、2ヶ月、6ヶ月、およびブースターワクチン接種後2ヶ月とした。

(4) 健常者およびSLE患者由来の単球にSTING経路刺激を加え、IFN $\gamma$ を産生する単球としない単球をセルソーターを用いて単離した。これらの単球についてRNAシーケンス解析を行なった。単球全体について健常者とSLE患者群で比較し、IFN $\gamma$ 産生および非産生細胞について健常者とSLE患者で比較することにより、SLE患者のIFN $\gamma$ 産生単球で特徴的に発現する遺伝子群の同定を行った。RNAシーケンス解析から注目した遺伝子については、STING刺激を加えた単球と加えていない単球を用いて、リアルタイムPCR法にて発現遺伝子量を健常者とSLE患者で比較を行なった。

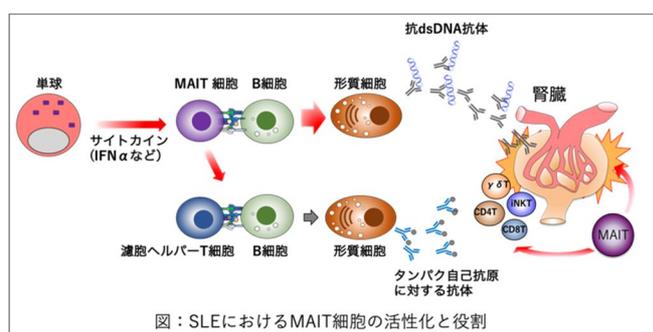
#### 4. 研究成果

(1) MR1分子の欠損によりMAIT細胞が存在しないFcgr1IIB $^{-/-}$ Yaaループスマウスでは、血清中の抗dsDNA抗体濃度が、MAIT細胞が存在するFcgr1IIB $^{-/-}$ Yaaマウスに比較して著しく低下していた。一方で、自己タンパク抗原であるRNPに対する抗体値については、MR1欠損と非欠損マウスで血清濃度に差がないことから、MAIT細胞の影響は少ないことが明らかとなった。以上の結果より、MAIT細胞は、特に非ペプチド自己抗原に対するB細胞応答に促進的に作用すると考えられた。

(2) 抗dsDNA抗体の血清濃度は、A群およびB群両方において、MR1リガンド投与により低下した。同様に形質細胞の応答もA群およびB群において低下した。胚中心B細胞の反応は、A群において有意低下し、B群でも低下傾向が見られた。糸球体腎炎の重症度スコアはA群において有意低下したが、B群ではコントロール群と差が見られなかった。以上の結果より、ループス発症後のマウスでも、MAIT細胞の活性化は自己抗体応答に寄与することが明らかとなり、またMAIT細胞の活性化抑制により自己抗体の産生を制御できることが示された。発症後のマウスにおけるMR1リガンド投与では、糸球体腎炎の病理所見の改善は見られなかった。これは、リガンド投与開始前に腎炎病体が完成してしまっていたことが原因と推察される。今後は臨床応用を視野に入れ、MR1リガンドの投与量や投与期間も検討する必要がある。

(3) SARS-CoV-2 mRNAワクチン接種により、全例においてスパイクに対する特異的抗体、CD4TおよびCD8T細胞の誘導が確認された。スパイク抗体値と形質芽細胞の応答には正の相関が見られた。年齢とともに抗体応答が減弱する傾向が見られたが、これは特に男性で顕著であった。年齢による濾胞ヘルパーT細胞応答の減弱は男女ともに見られたが、末梢ヘルパーT細胞応答については男性でのみ年齢とともに減弱していた。MAIT細胞は、年齢とともに血液中の頻度が低下したが、抗体応答やT細胞応答との関連性は見られなかった。SLEは女性に多い疾患であるが、一般的に抗体応答は女性において強いことが知られている。我々は、SLE患者の末梢ヘルパーT細胞が活性化を報告していることを報告しており、このように女性における強い抗体応答には、末梢ヘルパーT細胞が寄与している可能性が考えられた。

(4) RNAシーケンスデータの発現変動遺伝子の解析より、健常者由来の単球に比べ、SLE患者単球では、3000以上の遺伝子の発現が亢進していた。我々は、中でも細胞老化に関連する遺伝子と知られるCDKN2AおよびGATA4に注目した。リアルタイムPCR解析により、CDKN2Aは、STING刺激を加えていないSLE単球で発現が増加しており、STING刺激により更に発現が亢進した。GATA4は、STING刺激を加えることにより発現が誘導され、IFN $\gamma$ の産生能と関連していた。CDKN2Aは細胞老化のマーカーとして知られているが、GATA4は細胞老化随伴分泌現象(senescence-associated secretory phenotype: SASP)の関連遺伝子として知られている。SLEでは単球における細胞老化が亢進しており、STING刺激時にGATA4の発現が誘導されIFN $\gamma$ の産生が亢進する可能性が示唆された。GATA4は転写因子であることから、GATA4の発現がどのような遺伝子の発現を介してIFN $\gamma$ の産生を促進するのか、分子レベルでのメカニズの解明が必要である。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bai Jie, Chiba Asako, Murayama Goh, Kuga Taiga, Tamura Naoto, Miyake Sachiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Sex, Age, and Ethnic Background Shape Adaptive Immune Responses Induced by the SARS-CoV-2 mRNA Vaccine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 786586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.786586	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 Yusuke Yasutomi, Asako Chiba, Keiichi Haga, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Activated Mucosal-associated Invariant T Cells Have a Pathogenic Role in a Murine Model of Inflammatory Bowel Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 81～93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcmgh.2021.08.018.	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 Nakajima S, Tanaka R, Yamashiro K, Chiba A, Noto D, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Mucosal-Associated Invariant T Cells Are Involved in Acute Ischemic Stroke by Regulating Neuroinflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e018803
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.120.018803.	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 Chiba Asako, Murayama Goh, Miyake Sachiko	4. 巻 33
2. 論文標題 Characteristics of mucosal-associated invariant T cells and their roles in immune diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 775～780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab070	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 Nakajima Shihoko, Chiba Asako, Makiyama Ayako, Hayashi Eri, Murayama Goh, Yamaji Ken, Kobayashi Shigeto, Tamura Naoto, Takasaki Yoshinari, Miyake Sachiko	4. 巻 59
2. 論文標題 Association of mucosal-associated invariant T cells with different disease phases of polymyalgia rheumatica	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 2939 ~ 2946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keaa054	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 Murayama Goh, Chiba Asako, Kuga Taiga, Makiyama Ayako, Yamaji Ken, Tamura Naoto, Miyake Sachiko	4. 巻 59
2. 論文標題 Inhibition of mTOR suppresses IFN production and the STING pathway in monocytes from systemic lupus erythematosus patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 2992 ~ 3002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keaa060	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 Konuma Takaaki, Kohara Chisato, Watanabe Eri, Takahashi Shunsuke, Ozawa Genki, Suzuki Kei, Mizukami Motoko, Nagai Etsuko, Jimbo Koji, Kaito Yuta, Isobe Masamichi, Kato Seiko, Takahashi Satoshi, Chiba Asako, Miyake Sachiko, Tojo Arinobu	4. 巻 204
2. 論文標題 Reconstitution of Circulating Mucosal-Associated Invariant T Cells after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Its Association with the Riboflavin Synthetic Pathway of Gut Microbiota in Cord Blood Transplant Recipients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1462 ~ 1473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1900681	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 三宅幸子, Jie Bai, 村山豪, 久我大雅, 田村直人, 千葉麻子
2. 発表標題 新型コロナウイルスmRNAワクチンに対する獲得免疫応答の包括的解析
3. 学会等名 第49回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kuga T, Chiba A, Hosomi K, Nakagawa T, Murayama G, Kusaoi M, Yamaji K Tamura N, Miyake S.
2. 発表標題 Enhanced interferon production due to the senescence-associated secretory phenotype of lupus monocytes.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Bai J, Chiba A, Murayama G, Kuga T, Tamura N, Miyake S
2. 発表標題 Humoral and cellular immune responses against SARS-CoV-2 induced by COVID-19 mRNA vaccine
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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