

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21525

研究課題名(和文) グルココルチコイドによる自己免疫疾患の誘導機構

研究課題名(英文) Induction of autoimmune diseases by glucocorticoids

研究代表者

生田 宏一 (IKUTA, Koichi)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：90193177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：グルココルチコイド(GC)は免疫抑制作用を持ち、自己免疫疾患の治療に用いられる。研究代表者らは、日内変動するGCがT細胞のリンパ器官への集積を促し免疫応答性を高めることを明らかにし、GCの新たな生理機能を提示した。本研究では、GCが炎症誘導性Th17細胞の分化と機能を高め自己免疫疾患の発症を促進することを、T細胞およびTh17細胞特異的なGR欠損マウスを用いて明らかにした。これにより、強い免疫抑制作用で知られるGCが生理的な濃度では逆に自己免疫疾患を誘導する働きを持つという逆説的な概念を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルココルチコイド(GC)は抗炎症作用や免疫抑制作用を持ち、アレルギーや自己免疫疾患の治療によく用いられる。研究代表者らは、体内で日内変動しているGCが、Tリンパ球に作用することでTリンパ球をリンパ器官に集め免疫機能を高めていることを示した。本研究では、GCが炎症を誘導するヘルパーTリンパ球の機能を高め、自己免疫疾患を引き起こすことを、Th17細胞だけでGC受容体を欠損するマウスを用いて明らかにした。このことによって、強い免疫抑制作用で知られるGCが生理的な濃度では逆に自己免疫疾患を惹起する働きを持つという逆説的な考えを確立した。

研究成果の概要(英文)：Glucocorticoids (GC) have immunosuppressive effects and are used for treatment of autoimmune diseases. We demonstrated that oscillating GC promote accumulation of T cells into lymphoid organs and enhance immune responses, thereby demonstrating a new physiological function of GC on the immune system. In this study, we demonstrated that GC promote the differentiation and function of inflammation-inducing Th17 cells and enhance the development of autoimmune diseases, by using T cell- and Th17 cell-specific GR-deficient mice. Thus, we established a novel concept that GC with strong immunosuppressive effects induces autoimmune diseases at physiological concentrations.

研究分野：免疫学

キーワード：グルココルチコイド 自己免疫疾患 Th17細胞 実験的自己免疫性脳脊髄炎 関節リウマチ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) グルココルチコイド (GC) は強力な抗炎症作用と免疫抑制作用を持ち、炎症性疾患や自己免疫疾患の治療に広く用いられている。免疫系との関係では、GC の薬理作用が注目されているが、マウスでは昼間に濃度が低いと生理的な機能については不明の点が多い。研究代表者らは、自ら作製した IL-7R α 遺伝子エンハンサーの GR 結合モチーフ変異マウスと T 細胞特異的グルココルチコイド受容体 (GR) 欠損 (CD4-Cre GRcKO) マウスを用いて、概日リズムに依存して GC が IL-7R と CXCR4 の発現を誘導することで、T 細胞をリンパ器官に集積させ免疫応答性を高めることを明らかにした (Shimba et al, Immunity, 2018)。この結果は、GC が生理的な濃度では免疫機能を高める働きを持つことを示し、強い免疫抑制効果を持つとされてきた従来の GC の概念を覆すとともに、GC を介して免疫機能そのものが日内変動することを初めて示した画期的な発見であった。

(2) Th17 細胞は感染初期の炎症誘導性免疫応答を担うとともに、乾癬や関節リウマチなどの免疫疾患の発症と増悪に関与することが知られている。研究代表者らは、GC の T 細胞における生理的機能をさらに解析するために、T 細胞特異的 GR 欠損マウスを用いてヘルパー T 細胞分化を解析した。その結果、T 細胞特異的 GR 欠損マウスにおいて Th17 細胞の分化が障害され、腸管粘膜固有層の Th17 細胞が減少するという予備的結果を得た。GC が Th17 細胞の分化を促進するという結果は、GC が免疫疾患を低減させることや Th17 細胞が免疫疾患の発症を促すこととまったく相反する。そこで、病態モデルにおいても GC が Th17 細胞の機能を高めるのかを検証した。T 細胞特異的 GR 欠損マウスを MOG ペプチドで免疫すると、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症が著しく低下した。以上の結果から、生体内の GC が Th17 細胞の分化と機能を高め、自己免疫疾患の発症を促進するという仮説を立て、本研究を開始した。

2. 研究の目的

(1) 自己免疫疾患は免疫系が自己成分に異常に反応することで引き起こされる難治性疾患である。本邦では関節リウマチだけで 70 万人が罹患し、国民の健康と生活において大きな問題となっている。自己免疫疾患の治療には、強力な抗炎症作用と免疫抑制作用を持つ GC が広く用いられる。GC の産生は概日リズムにより制御され、その血中濃度はヒトでは昼に高く夜に低い日内変動をする (マウスでは逆転)。研究代表者らは、日内変動する生体内の GC が T リンパ球のリンパ器官への集積を促すことで免疫応答性を高めることを明らかにした (Shimba et al, Immunity, 2018)。この結果は、強い免疫抑制作用を持つとされる従来の GC の概念を覆し、新たな生理機能を提示した。それとともに、GC を介して免疫機能が日内変動することも示した。さらに、研究代表者らは、T 細胞特異的 GR 欠損マウスにおいて Th17 細胞の分化が障害され、多発性硬化症のモデルである EAE の発症が減弱するという予備的結果を得た。したがって、生体内の GC が免疫機能を高めるだけでなく、自己免疫疾患の発症を促進している可能性が考えられた。

(2) 本研究では、T 細胞および Th17 細胞特異的な GR 欠損マウスを用いて、GC が Th17 細胞の分化と機能を高め自己免疫疾患の発症を促進することを明らかにする。これにより、強い抗炎症作用で知られる GC が生理的な濃度では逆に自己免疫疾患を誘導する働きを持つという逆説的な概念を確立する。このために、下記の研究項目について研究を進める。

A. GC による Th17 細胞の分化と機能の亢進機構

GC が Th17 細胞の分化と機能を高めることを明らかにする。このために、T 細胞および Th17 細胞特異的 GR 欠損マウスにおける Th17 細胞の分化とサイトカイン産生機能を解析する。さらに、上記マウスの Th17 細胞における遺伝子発現を網羅的に調べ、Th17 細胞における GC の機能を解析する。

B. GC による Th17 細胞を介した自己免疫疾患の誘導機構

体内の GC が Th17 細胞の分化と機能を高めることで、自己免疫疾患の発症を促進することを明らかにする。このために、T 細胞および Th17 細胞特異的 GR 欠損マウスにおいて EAE と関節炎を誘導して、病態の変化を解析する。

3. 研究の方法

(1) GC による Th17 細胞の分化と機能の制御

GC の濃度が高い夜間に、T 細胞特異的 GR 欠損 (CD4-Cre GRcKO) マウスとコントロールマウスからナイーブ T 細胞を単離し、IL-6 と TGF- β を添加して CD3 と CD28 抗体で刺激して 4 日間培養し Th17 細胞の分化を誘導した。PMA とイオノマイシンで刺激後に IL-17A の産生を FACS にて解析することで、GC が Th17 細胞の分化を亢進させるかを検証した。

生体内で Th17 細胞は腸管粘膜固有層に多く分布する。T 細胞特異的ないし Th17 細胞特異的 GR 欠損 (IL17-Cre GRcKO) マウス (CD45.2) とコントロールマウス (CD45.1/2) の骨髓細胞を 1 対 1 で混合し、野生型マウス (CD45.1) に骨髓移植する。3 ヶ月後に粘膜固有層リンパ球を単離し、Th17 細胞の割合を FACS にて解析することで、GC が Th17 細胞の分化と維持に寄与する

のかを検証した。

(2) Th17 細胞における GR 標的遺伝子の解析

まず、GR の標的遺伝子の発現が最高値になる消灯 1 時間後において、ROR γ t-GFP を導入した T 細胞特異的 GR 欠損マウスの腸管粘膜固有層から、GFP を指標として Th17 細胞を単離した。RNA-seq 法にて mRNA の発現を、抗 GR 抗体を用いた ChIP-seq 法により GR が結合するゲノム領域を網羅的に解析し、コントロールマウスと比較することで Th17 細胞における GR の標的遺伝子の候補を絞り込んだ。得られた候補遺伝子の GO 解析等をおこなうことで、Th17 細胞の分化や機能における GC の新規機能を調べた。

(3) GC による Th17 細胞を介した EAE 発症の制御

Th17 細胞は、EAE 発症において主要な働きをしている。GC 濃度が高い夜間に Th17 細胞特異的 GR 欠損マウスとコントロールマウスに MOG ペプチドと alum を接種して EAE を誘導した。経時的に神経症状をモニターし、発症する時期と重症度を記録した。さらに、脾臓、リンパ節、脳脊髄組織からリンパ球を回収して、IL-17A の産生を測定し、Th17 細胞の誘導を解析した。以上の実験から、GC が Th17 細胞の機能発現を介して EAE 発症を促進することを検証した。

(4) GC による Th17 細胞を介した関節炎発症の制御

SKG マウスは T 細胞受容体下流のシグナル分子 ZAP-70 の変異のために、関節リウマチ様の関節炎を自然発症する。この関節炎には Th17 細胞が関係しており、遺伝的背景が BALB/c であることが必要である。そこで、すでに作製を終えた BALB/c 背景の T 細胞および Th17 細胞特異的な GR 欠損の SKG マウスにマンナンを投与し、関節の腫脹、組織染色、末梢血中の自己抗体を指標にして、関節炎の発症を経時的にモニターした。以上の実験から、GC が Th17 細胞の分化と機能を介して関節炎の発症を促進することを検証した。

4. 研究成果

(1) GC による Th17 細胞の分化と機能の亢進機構

T 細胞特異的 GR 欠損マウスとコントロールマウスからナイーブ T 細胞を単離し、CD3 と CD28 抗体で刺激し IL-6 と TGF- β を添加して 4 日間培養し Th17 細胞の分化を誘導した。その結果、T 細胞特異的 GR 欠損マウスで IL-17A を産生する Th17 細胞の分化が顕著に減少した (図 1)。生体内で Th17 細胞は腸管粘膜固有層に多く分布する。T 細胞特異的および Th17 細胞特異的 GR 欠損マウスを作製し、小腸粘膜固有層リンパ球を単離し解析したところ、いずれの GR 欠損マウスでも Th17 細胞の割合が顕著に減少した。したがって、GC が Th17 細胞の分化のみならずその維持にも必要であることが明らかになった。

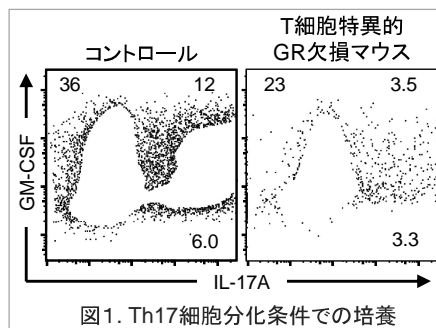


図 1. Th17細胞分化条件での培養

(2) Th17 細胞における GR 標的遺伝子の解析

GR の標的遺伝子の発現が最高値になる消灯 1 時間後にナイーブ CD4 T 細胞を単離し、抗 GR 抗体を用いた ChIP-seq 法により GR が結合するゲノム領域を網羅的に解析した。その結果、転写因子 TCF-1 の遺伝子上流に GR や C/EBP β などの転写因子が結合して、TCF-1 の発現を制御している可能性が示された。さらに、T 細胞特異的 GR 欠損マウスとコントロールマウスにストレスを負荷した後に小腸粘膜固有層から Th17 細胞を単離して、RNA-seq 法にて遺伝子発現を網羅的に解析した (図 2)。その結果、GR 欠損 Th17 細胞では低酸素応答関連遺伝子や脂質代謝関連遺伝子の発現が低下していた。

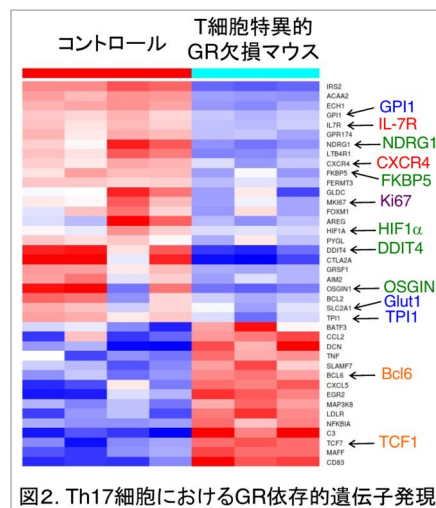


図 2. Th17細胞におけるGR依存的遺伝子発現

(3) GC による Th17 細胞を介した EAE 発症の制御

Th17 細胞は、EAE 発症において主要な働きをしている。T 細胞特異的 GR 欠損マウスとコントロールマウスに MOG ペプチドと alum を接種して EAE を誘導した。経時的に神経症状をモニターしたところ、T 細胞特異的 GR 欠損マウスで神経症状が顕著に減弱した (図 3)。さらに、脳脊髄組織からリンパ球を回収し IL-17A の産生を測定し Th17 細胞の浸潤を解析したところ、T

細胞特異的 GR 欠損マウスで Th17 細胞が減少していた。したがって、GC が Th17 細胞の分化を介して EAE の発症を促進することが明らかになった。

(4) GC による Th17 細胞を介した関節炎発症の制御

BALB/c 背景の T 細胞特異的な GR 欠損 SKG マウスにマンナンを投与すると、関節の腫れが弱くなり、Th17 細胞の割合が減少していた。以上の結果から、GC が Th17 細胞の分化と機能を介して関節炎の発症を促進することを示した。

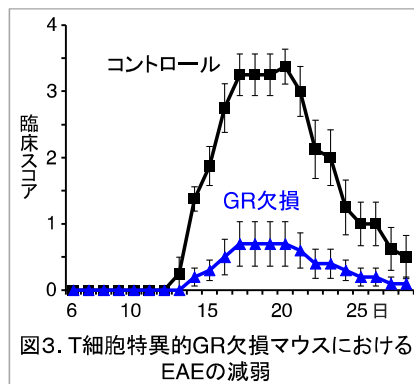


図3. T細胞特異的GR欠損マウスにおけるEAEの減弱

< 引用文献 >

1. Shimba A, Cui G, Tani-ichi S, Ogawa M, Abe S, Okazaki F, Kitano S, Miyachi H, Yamada H, Hara T, Yoshikai Y, Nagasawa T, Schütz G, and Ikuta K. Glucocorticoids drive diurnal oscillations in T cell distribution and responses by inducing interleukin-7 receptor and CXCR4. *Immunity*, 48: 286-298, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimba A. and Ikuta K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Glucocorticoids regulate circadian rhythm of innate and adaptive immunity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front. Immunol.	6. 最初と最後の頁 2143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.02143	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 Shimba A. and Ikuta K.	4. 巻 32
2. 論文標題 Immune-enhancing effects of glucocorticoids in response to day-night cycles and stress.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. Immunol.	6. 最初と最後の頁 703-708
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa048	査読の有無 無
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 Shimba A. and Ikuta K.	4. 巻 42
2. 論文標題 Control of immunity by glucocorticoids in health and disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Semin. Immunopathol.	6. 最初と最後の頁 669-680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00281-020-00827-8	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 Adachi A, Honda T, Dainichi T, Egawa G, Yamamoto Y, Nomura T, Nakajima, S, Otsuka A, Maekawa M, Mano N, Koyanagi N, Kawaguchi Y, Ohteki T, Nagasawa T, Ikuta K, Kitoh A, and Kabashima K.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Prolonged high-intensity exercise induces fluctuating immune responses to herpes simplex virus infection via glucocorticoids.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Allergy Clin. Immunol.	6. 最初と最後の頁 1575-1588.e7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Bilal, M., Nawaz, A., Kado, T., Aslam, M. R., Igarashi, Y., Nishimura, A., Watanabe, Y., Kuwano, T., Liu, J., Miwa, H., Era, T., Ikuta, K., Imura, J., Yagi, K., Nakagawa, T., Fujisaka, S., and Tobe, K.	4. 巻 54
2. 論文標題 Fate of adipocyte progenitors during adipogenesis in mice fed a high-fat diet.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol. Metab.	6. 最初と最後の頁 101328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2021.101328	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 Ikuta, K., Hara, T., Abe, S., Asahi, T., Takami, D., and Cui, G.	4. 巻 434
2. 論文標題 The roles of IL-7 and IL-15 in niches for lymphocyte progenitors and immune cells in lymphoid organs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr. Top. Microbiol. Immunol.	6. 最初と最後の頁 83-101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-86016-5_4	査読の有無 無
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 Takeuchi, A., Ozawa, M., Cui, G., Ikuta, K., and Katakai, T.	4. 巻 434
2. 論文標題 Lymph node stromal cells: diverse meshwork structures weave functionally subdivided niches	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr. Top. Microbiol. Immunol.	6. 最初と最後の頁 103-121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-86016-5_5	査読の有無 無
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 Ullrich, L., Lueder, Y., Juergens, A.-L., Wilharm, A., Barros-Martins, J., Bubke, A., Demera, A., Ikuta, K., Patzer, G. E., Janssen, A., Sandrock, I., Prinz, I., and Rampoldi, F.	4. 巻 12
2. 論文標題 IL-4 producing Vg1+/Vd6+ gd T cells sustain germinal center reactions in Peyer's patches of mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front. Immunol.	6. 最初と最後の頁 729607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.729607	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 Jin, J., Yamamoto, R., Takeuchi, T., Cui, G., Miyuchi, E., Hojo, N., Ikuta, K., Ohno, H., and Shiroguchi, K.	4. 巻 13
2. 論文標題 High-throughput identification and quantification of single bacterial cells in the microbiota	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-28426-1	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 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 旭拓真、阿部真也、崔広為、榛葉旭恒、生田宏一
2. 発表標題 胎児肝臓に由来する1型自然リンパ球の同定
3. 学会等名 Kyoto T Cell Conference 第30回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榛葉旭恒、生田宏一
2. 発表標題 ストレスはグルココルチコイドを介してTh17細胞の分化を促進し腸炎を増悪させる
3. 学会等名 Kyoto T Cell Conference 第30回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生田宏一、榛葉旭恒、江島亜希
2. 発表標題 ステロイドホルモンによる免疫機能とアレルギーの制御
3. 学会等名 日本アレルギー学会学術集会 (招待講演)
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	崔 広為 (CUI Guangwei) (70791276)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教 (14301)	
研究 分担者	榛葉 旭恒 (SHIMBA Akihiro) (30812242)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	

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