

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22778

研究課題名(和文) 全身性エリテマトーデスの病態におけるT細胞とTankyraseの役割

研究課題名(英文) Role of Tankyrases in SLE T cells

研究代表者

勝山 隆行 (katsuyama, Takayuki)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：80570093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：まず、T細胞特異的TankyraseノックアウトマウスでT細胞でTankyraseがノックアウトされていることが確認できた。また、T細胞において一部の炎症性サイトカインの発現が亢進していること、SLEの病態に関与していることが示されているDouble negative T細胞が増加している傾向を確認した。続いて、SLE疾患モデルマウスにおけるTankyrase下流シグナルの役割を確認するため、疾患モデルマウスでTankyrase下流蛋白Xをノックアウトしたところ、尿蛋白が改善し、組織所見も改善した。また、T細胞の活性化マーカー発現や炎症性サイトカイン産生についても改善することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では難治性自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)の病態形成におけるT細胞とTankyraseの役割についての検討を行なった。本研究で得られた成果によりTankyraseがT細胞機能異常を介して自己免疫疾患の病態に関与する可能性が示唆された。更なる研究を通してT細胞でのTankyrase欠損がSLEの病態に与える影響を解明することによりSLEの病態解明の一助とするのみでなく、新規治療標的の開発にもつながると考えられた。

研究成果の概要(英文)：First, we confirmed that T-cell-specific Tankyrase was knocked out in T cells in T cell-specific Tankyrase knockout mice. We also confirmed that the expression of some proinflammatory cytokines was increased in T cells and that double negative T cells, which are known to be involved in the pathogenesis of SLE, tended to increase. To confirm the role of downstream signaling of Tankyrase in the lupus model mice, we knocked out Tankyrase downstream protein X in the lupus model mice, which resulted in improvement of urinary protein levels and histological findings. The expression of T cell activation markers and inflammatory cytokine production were also improved.

研究分野：膠原病内科

キーワード：全身性エリテマトーデス T細胞 自己免疫疾患

## 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(systemic lupus erythematosus: SLE)は、多臓器に障害をきたす全身性の自己免疫疾患である。その病態は複雑であり、様々な免疫関連細胞を対象に病態解明・新規治療標的の発見を目的とした研究が行われている。自然免疫に関与する樹状細胞や好中球、自己抗体産生に関わる B 細胞の重要性が明らかとなる一方で、近年自己免疫疾患の発症・進行に T 細胞が重要な役割を果たすことも報告されている。SLE 患者 T 細胞では様々な分子発現異常やサイトカイン産生異常、分化異常などが報告されており、SLE の病態生理や臓器障害への関与が指摘されている。特に T 細胞内での Syk、MAPK、mTOR などの細胞内シグナル異常が報告されているが、それらのシグナルを制御する詳細なメカニズムや SLE の発症、臓器障害における役割については未だ明らかになっていない。

Tankyrase 1 とその paralogue である Tankyrase 2 は基質への ADP-ribose 付加を行う PARP ファミリーに属する。Tankyrase により ADP-ribosylation がおこると基質のコヒキチン化が促進されプロテアソームによる分解が誘導される。Tankyrase は SRC tyrosine kinase の活性化に必要なアダプター蛋白である 3BP2 の発現を制御することで破骨細胞機能に重要な役割を果たしている(Matsumoto, et al. J Clin Invest. 2019;127(7), 2612-2625)。また、Tankyrase が liver kinase B1 (LKB1) を介して adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK)の活性化に関与していると報告されている(Li N, et al. Nat Commun. 2019;10(1):4363)。このように Tankyrase は様々な細胞内シグナルを制御するが、T 細胞を含む免疫担当細胞における Tankyrase の役割や自己免疫疾患への関与についてはこれまで検討されていない。

そこで本研究では T 細胞における Tankyrase の機能について in vivo, in vitro で検討を行うこととした。疾患モデルマウスを用いることで、T 細胞機能における Tankyrase の役割を明らかにするだけでなく、自己免疫疾患の病態において Tankyrase が関与しているかを解明することで自己免疫疾患の病態解明につながると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、T 細胞機能における Tankyrase の役割を明らかにし、さらに SLE の病態形成における Tankyrase の機能を解明することである。これにより SLE をはじめとする自己免疫疾患の病態生理における Tankyrase の役割を明らかにし、SLE の病態解明の一助となるだけでなく、新規治療標的の開発にも寄与することができると考えた。

### 3. 研究の方法

Tankyrase 1、Tankyrase 2 を全細胞でノックアウト (KO)すると耐性致死となるため、Cre/Loxp システムを用いて T 細胞選択的 Tankyrase KO マウスを作製することとした。そのマウスを用いて in vivo での検討を行った。具体的には脾臓から抽出した T 細胞を用いてウエスタンブロットにより各タンパク質の発現を確認するとともに、qPCR で mRNA レベルの検討も行なった。また、T 細胞活性化マーカーの発現や刺激後のサイトカイン産生などについてフローサイトメトリーでも解析を行なった。

さらに、SLE 様の自己免疫疾患を自然発症するループス疾患モデルマウスで Tankyrase をノックアウトすることにより、SLE の病態における Tankyrase の役割について解析する予定とした。

## 4. 研究成果

### (1) T 細胞選択的 Tankyrase ノックアウトマウスについて

まず、T 細胞選択的に Tankyrase をノックアウトしたマウスを作成した。胎性致死ではないことが確認され、体重増加も対照マウスと比較して差がないことを確認した。関節炎や脱毛などの明らかな症状は確認できなかった。

脾臓から T 細胞を抽出し、qPCR で Tankyrase の発現を確認して Tankyrase がノックアウトされていることを確認した。

さらに既知の Tankyrase 下流蛋白の発現について検討したところ、Tankyrase ノックアウトマウスの T 細胞で対照マウスと比較して下流蛋白 X の発現が亢進していることが明らかとなった。

### (2) Tankyrase ノックアウトマウスの細胞機能について

続いて、Tankyrase ノックアウトマウスの脾臓細胞をフローサイトメトリーで解析し、その細胞機能や活性化について検討した。

各分画について検討を行い、対照マウスと比較して様々な差を認めた。例えば、SLE の病態に関与されているといわれる double negative T 細胞の割合が対照マウスと比較して増加していた。さらに、いくつかの T 細胞活性化マーカーの発現についても Tankyrase ノックアウトマウスから抽出された T 細胞で亢進していることが明らかになった。B 細胞活性化を介して自己抗体産生に関与することが知られている濾胞性 T 細胞については増加は認めなかった。また、PMA/Ionomycin で刺激後のサイトカイン産生についても検討をおこなったところ、IFN $\gamma$  などのいくつかの炎症性サイトカインの発現が Tankyrase ノックアウトマウスの T 細胞で亢進していることが示された。

これらの結果からは Tankyrase の発現低下は T 細胞活性化に関与し、自己免疫疾患の病態に寄与している可能性が示唆された。

### (3) 疾患モデルマウスでの検討ならびに今後の展望について

続いて、SLE 疾患モデルマウスにおける Tankyrase 下流シグナルの役割を確認するため、ループスモデルマウスで Tankyrase 下流蛋白 X をノックアウトしたところ、尿蛋白が改善し、組織所見も改善した。また、T 細胞の活性化マーカー発現や炎症性サイトカイン産生についても改善することを明らかにした。

疾患モデルマウスにおいて Tankyrase をノックアウトし、SLE の病態における Tankyrase の役割を解明する方針としていたが、マウスの作出に時間を要し、Tankyrase ノックアウトにより病勢が改善するかどうかを検討するには至らなかった。引き続き検討を続けている。さらに、上記の下流蛋白ノックアウトマウスをかけあわせることにより Tankyrase がどのような経路で SLE の病態に関与するかについてより詳細に解明できると考えている。

さらに、ヒト SLE 患者の末梢血 T 細胞で Tankyrase や下流蛋白 X の発現を確認し、病勢や臨床的特徴との関連について解析を行なっている。

これまで Tankyrase やその下流蛋白が自己免疫疾患において果たす役割について検討された研究はなく、病態解明や新規治療標的の開発の点からも意義のある研究であると考えられる。今後はさらに検討を続け、臨床応用に繋がられるように努めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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