

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790957

研究課題名（和文）

ヒトパルボウイルス B19 による樹状細胞機能異常を標的とした関節リウマチ治療法開発

研究課題名（英文）

Development of therapy for rheumatoid arthritis to correct the dysfunction of dendritic cells caused by human parvovirus B19

研究代表者

高橋 令子 (TAKAHASHI REIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90422120

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ヒトパルボウイルスB19 (B19)感染後に関節リウマチ (RA)を発症した患者を経験したことから、サイトカイン産生やそのシグナルの異常によってどのようにして自己免疫異常が起こるのか分子レベルの機序を解明することを目的としている。現在、サイトカイン産生を抑制する抗炎症機能をもつ細胞としては、抑制性T細胞 (Treg) が中心的であると考えられている。しかし、サイトカインシグナルによるTregの発生、維持に関する制御機構はほとんど知られていない。そこで、サイトカインシグナルの制御因子であるSOCS1のTregにおける機能について解析を行った。その結果から、SOCS1がTregにおいてそのマスター因子であるFoxp3の安定性およびサイトカイン産生抑制に寄与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have the purpose to clarify the associations between the pathogenesis of autoimmunity and the dysregulation of cytokine signaling, because we experienced patients infected by human parvovirus B19 followed by onset of rheumatoid arthritis. Regulatory T cells (Tregs) are main cell subset to have suppressive immunological functions. However, the development or maintenance of Tregs has not been clarified to be associated with the dysregulation of cytokine signaling. Therefore, we examined the role of SOCS1, which is the negative regulation of the cytokine-JAK-STAT pathway, in Tregs. We clarified SOCS1 is necessary for Treg function to suppress cytokine signaling and Foxp3 maintenance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：感染症内科学 膠原病内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：ウイルス 臨床免疫学 サイトカイン 抑制性 T 細胞

1. 研究開始当初の背景

我々はヒトパルボウイルス B19(B19)感染後に関節リウマチ (RA)を発症した患者を経験

したことから、B19感染とRAの発症に関して研究を進めてこれまで報告してきた。ある微生物がその病気の原因であることを証明す

るためのコッホの3原則に従って、

1) RA 関節滑膜で病原体(B19)を証明

①多くの RA 例の罹患部位(関節内、特に濾胞樹状細胞、マクロファージ、T細胞、B細胞)において B19 が持続感染している(Takahashi Y et al. PNAS, 1998)

2) 病原体(B19)感染により RA 病態形成機序を説明

①B19 は Ku80 を介して免疫系細胞に感染し、TNF α 、IL-6、IL-8 等の炎症性サイトカイン産生を惹起しうる(Munakata Y et al. J. Virol. 2003, Munakata Y et al. Blood 2005)

3) 候補病原体(B19)による RA の惹起

①B19 遺伝子導入マウスでは易多発関節炎になる(Takasawa N et al. J. Immunol. 2004)

②急性 B19 感染症の後に典型的な RA が発症する例が少なからず認められる(Murai C et al. Ann. Rheu. Dis. 2000, Munakata Y et al. Lancet 2005)

と報告した。

特に、RA 患者関節内の免疫担当細胞内に *in situ hybridization* 法で B19 を認めたことから、まずは免疫を司る細胞で、抗原提示、サイトカイン産生により、免疫応答、免疫寛容を誘導する樹状細胞に着目して解析し、健康人と RA 患者では B19 に対する樹状細胞の反応(表面分子発現、サイトカイン産生能など)が異なることを認めた(2007年キーストーンシンポジウム、2007年日本免疫学会総会・学術集会、2008年国際パルボウイルスワークショップ、2008年アジア太平洋リウマチ会議、2008年アメリカリウマチ学会 Annual Scientific Meetingなどで発表)。本研究では、B19 ないしパルボウイルスの持つ single-strand-DNA が惹起する樹状細胞の異常をさらに研究し、ウイルス感染のコントロールによる自己免疫異常の是正の可能性を追求し、治療法の開発を検討することを目標とした。そして、その過程においてサイトカインによる抑制性T細胞の制御異常が自己免疫病態に直結することが次第に明らかとなってきた。そのためにマウスモデルを用いてサイトカインシグナルによる抑制性T細胞の機能制御と免疫異常について研究を開始することとした。

2. 研究の目的

制御性T細胞(regulatory T cell; Treg)は、アレルギーや自己免疫疾患の制御に不可欠である。しかし近年、マスター遺伝子 *Foxp3* を発現して胸腺由来の Treg になったものが、*Foxp3* の発現を失い、サイトカイン産生エフェクター細胞に変化する「可塑性」が報告された(Komatsu N et al. PNAS 2009)。これを *exFoxp3* とよび、*Foxp3Cre* を用いた遺伝子マーカー実験から、通常のマウスでも *exFoxp3* が存在し、炎症状態では *exFoxp3* が

さらに増加することが示された(Zhou X et al. Nat Immunol 2009)。

この「Tregの可塑性」という現象の全身性エリテマトーデスなど自己免疫疾患の病態への影響を、患者検体、モデルマウスなどで検討し、さらに Treg の *Foxp3* 発現、抑制能の安定化により病態を制御できるかについてモデルマウスを用いて検討する。

3. 研究の方法

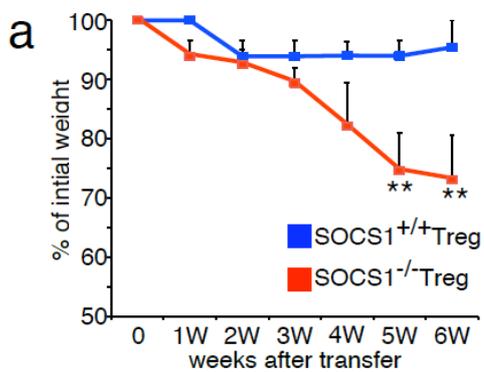
慶應義塾大学医学部において確立されたT細胞特異的 suppressors of cytokine signaling 1 (SOCS1) 欠損マウスを用いて、サイトカインの異常による自己免疫疾患モデルを確立する。このマウスから採取した Treg を用いて、*in vitro*、*in vivo* (RAG2 欠損マウスへの naïve T細胞と wild-type あるいは SOCS1 欠損の nTreg の移入実験)での Treg の抑制能を検討する。また、RAG2 欠損マウスへそれぞれの Treg のみを移入して、*Foxp3* 発現の安定性、IFN γ や IL-17 の産生を調べる。

4. 研究成果

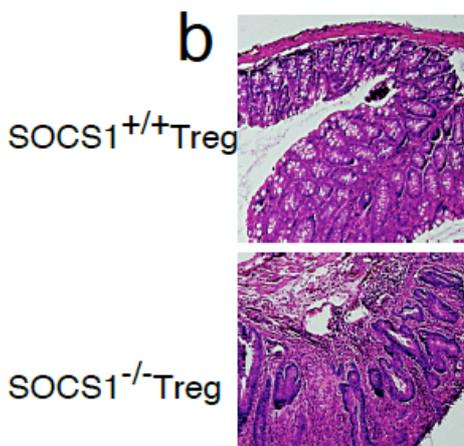
T細胞特異的 SOCS1 欠損マウスは、皮膚炎や関節炎、自己抗体の上昇など自己免疫疾患様の症状を示した。よって、自己免疫疾患を自然発症する SOCS1 欠損マウスを用いてその抑制性T細胞(Treg)の機能に関して研究を行った。以前より SOCS1 が胸腺由来 natural Treg (nTreg) で発現が高いことは報告されていたが(Lu LF *Immunity* 2009)、SOCS1 の Treg における機能は不明であった。我々は、このT細胞特異的 SOCS1 コンデシヨナル欠損マウスにおける nTreg の動態を解析したところ、脾臓で3-4倍、胸腺ですでに2倍以上に nTreg が増加しているにもかかわらず、皮膚炎、関節炎、高ガンマグロブリン血症などの SLE 様自己免疫疾患の症状を呈することを認めた。さらに、Treg 特異的 SOCS1 コンデシヨナル欠損マウスでも同様な症状を認めたことから、SOCS1 欠損 Treg における抑制能異常、*exFoxp3* の出現による SLE 様自己免疫疾患の発症を仮定して、研究を進めた。

はじめに、SOCS1 の nTreg における役割を解明するために、*in vitro*、*in vivo* でその抑制能を検討した。SOCS1 の nTreg における役割を解明するために、*in vitro*、*in vivo* でその抑制能を検討した。RAG2 欠損マウスへの naïve T細胞とそれぞれの nTreg の移入実験では、SOCS1 欠損 *Foxp3* 陽性 nTreg を移入した方が腸炎の抑制効力が劣っていた。そこで、RAG2 欠損マウスへそれぞれの nTreg のみを移入して、nTreg の運命を検討した。GFP でマーカーした *Foxp3* 陽性 T細胞 (>99% *Foxp3* 陽性)を移入した所、4週後に WT nTreg は約60%が *Foxp3* 陽性を維持しているのに対して、SOCS1 欠損 nTreg は40%まで *Foxp3* 陽性

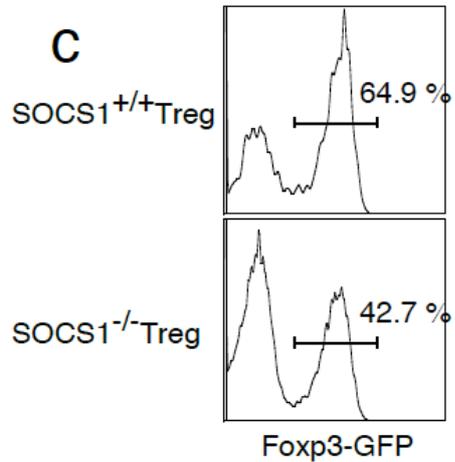
率が低下した。SOCS1 欠損 nTreg を移入した Rag 欠損マウスでは Foxp3 陽性、陰性どちらの分画からも IFN γ や IL-17 の産生が認められた。これらの結果から、SOCS1 が nTreg において Foxp3 の安定性およびサイトカイン産生抑制に寄与することが明らかとなった。今後 STAT の関与を含めてこの現象の分子機構を解明し、SOCS1 が Treg 機能にどのように機能するかを明らかにする。また逆に SOCS1 を過剰発現させたり、JAK 阻害剤を適量使用することによって Treg の安定性を高め、過剰な免疫応答や移植の拒絶を抑制できないか検討する。



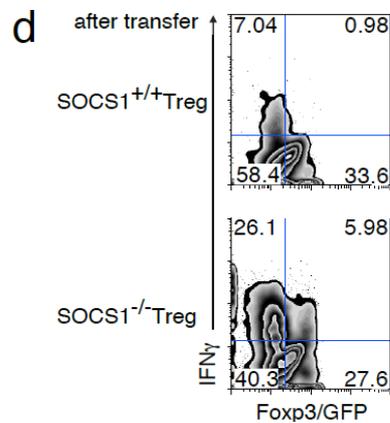
a. Rag2^{-/-}マウスに SOCS1^{+/+} (青) あるいは SOCS1^{-/-} (赤) Treg を移入して体重変化を観察。SOCS1^{+/+} Treg を移入したマウスと比較して、SOCS1^{-/-} Treg を移入した Rag2^{-/-}マウスにおいて、4 週以降に有意な体重減少を認めた。



b. SOCS1^{-/-} Treg (下) を移入した Rag2^{-/-}マウスは 6 週後に腸炎を発症した。



c. 移入された SOCS1^{-/-} Treg (下) は 6 週後 Rag2^{-/-}マウスの中で、SOCS1^{+/+} Treg に比べて有意に Foxp3 を失った。



d. 移入された SOCS1^{-/-} Treg (下) は 6 週後 Rag2^{-/-}マウスの中で、Foxp3 陽性、陰性に関わらず、IFN γ を産生した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Transcription Factor Smad-Independent T Helper 17 Cell Induction by Transforming-Growth Factor- β Is Mediated by Suppression of Eomesodermin
Ichiyama K, Sekiya T, Inoue N, Tamiya T, Kashiwagi I, Kimura A, Morita R, Muto G, Shichita T, Takahashi R, and Yoshimura A
Immunity (in press) (査読あり)

2. Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins and JAK/STAT Pathways: Regulation of T-Cell Inflammation by SOCS1 and SOCS3.

Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, Yasukawa H, Yoshimura A.
Arterioscler Thromb Vasc Biol.
2011;31:980-5. (査読あり)

3. SOCS1 regulates type I/type II NKT cell balance by regulating IFN γ signaling.
Hashimoto M, Hiwatashi K, Ichiyama K, Morita R, Sekiya T, Kimura A, Sugiyama Y, Sibata T, Kuroda K, Takahashi R, Yoshimura A.
Int Immunol. 2011;23:165-76. (査読あり)

4. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF- β -mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development.

Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, Takahashi R, Asakawa M, Muto G, Mori T, Hasegawa E, Saika S, Hara T, Nomura M, Yoshimura A.
J Immunol. 2010;185:842-55. (査読あり)

[学会発表] (計4件)

1. 高橋 令子 吉村昭彦 SOCS1 is necessary for stable expression of Foxp3 and suppression of IFN- γ production in nTreg 第14回国際免疫学会 8/22-22, 2010 神戸

2. 高橋 令子 吉村昭彦 SOCS1 Mediates Stabilization of Foxp3 Expression in Treg Cells Keystone symposia 2/21-26, 2010 Taos, USA

3. 高橋 令子 中川竜介 吉村昭彦 SOCS1 mediates stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells 第39回日本免疫学会総会 12/3, 2009 大阪

4. 高橋 令子 中川竜介 吉村昭彦 制御性 T 細胞における Foxp3 発現の安定性への SOCS1 の関与 第37回 日本臨床免疫学会総会 11/14, 2009 東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 令子 (TAKAHASHI REIKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 90422120

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし