

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：奨励研究

研究期間：2021～2021

課題番号：21H04255

研究課題名 新規LMV誘導モデルマウスを用いたループス腸間膜血管炎の発症機序解析

研究代表者

藤城 真樹 (FUJISHIRO, Maki)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・技術補助員

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 470,000円

研究成果の概要：ループス腸間膜血管炎(LMV)は、全身性エリテマトーデス(SLE)に合併する病態であるが、血管炎を伴う腸管出血が見られる場合は予後が悪い。当研究グループでは、LMV誘導マウスモデルを作製し、このモデルが血管炎を伴う腸管出血を起こすことを見出した。本研究では、当モデルを用いて、血管炎の発症機序を血管内外からの影響に着目し検証した。血管外では、誘導群で病理学的に血管近傍への免疫細胞の浸潤を認め、血管内では、誘導群で複数の血清中サイトカイン等が有意に上昇する事を明らかにした。今後、同定した免疫細胞やサイトカイン等が血管内皮細胞や血管周囲細胞の傷害に關与する機序を明らかにしていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当グループで確立したLMV誘導マウスモデルを用いることで、血管炎の発症において腸管の血管近傍へ浸潤する免疫細胞や有意な上昇がみられる血清中サイトカイン等を明らかにした。それにより、免疫細胞の浸潤阻害や血中サイトカインをコントロールすることにより、血管炎の抑制、しいてはLMV病態を抑制することが出来る可能性がある。今後さらにLMVの詳細な発症機序を解明することによって、予防方法や早期診断法、新規治療薬の開発などに役立つ見込みがある。

研究分野：免疫学、病理学

キーワード：ループス腸間膜血管炎(LMV) ToII様受容体7(TLR7) 全身性エリテマトーデス(SLE)

1. 研究の目的

ループス腸間膜血管炎 (LMV) の症状において血管炎を伴う腸管出血が見られる場合は予後が悪いため、早期診断、早期治療が求められる。我々は全身性エリテマトーデス (SLE) 自然発症モデルマウスである B/WF1 マウスに Toll 様受容体 7 (TLR7) アゴニストを継続刺激した新規 LMV 誘導マウスモデルを作製した。本研究では、この LMV 誘導マウスモデルを解析し、特に LMV の病態と関りが深い血管炎に着目し、TLR7 シグナルの過剰な活性化によって、血管内皮細胞や血管周囲細胞が傷害を受ける機序を明らかにする。

2. 研究成果

LMV 病態、特に血管炎が発症することに着目し、血管外および血管内から与える影響について検証した。LMV 病態は、SLE で高値を示す自己抗体である抗 dsDNA 抗体がまだ上昇していない若週齢の B/WF1 マウスに TLR7 アゴニストである R848 を継続的に塗布して誘導した。始めに、血管外からの影響として、病理学的に血管近傍に集まる免疫細胞に焦点をあてた解析を行った。次に、血管内からの影響の検証として、誘導群の回腸血管近傍に見られた免疫細胞の浸潤が見られ始めた誘導 1 週間後の血清を用いてサイトカインアレイ解析を行った。

- (1) 血管炎を惹起する原因の検証として、まず血管外からの影響を確認した。LMV 誘導マウスモデルを作製し、誘導 6 週間後の回腸の血管周囲に浸潤した細胞を特定するため様々な免疫細胞の免疫染色を行い、血管周辺部および腸粘膜固有層に浸潤した細胞数をカウントした。その結果、マクロファージ (F4/80⁺)、好中球 (Ly6G⁺ & MPO⁺)、形質細胞様樹状細胞 (以下、pDC、CD11c⁺ & PDCA-1⁺)、ミエロイド系細胞 (CD11b⁺) が誘導群で有意に血管周囲や腸粘膜固有層に浸潤していることを確認した (Figure 1A)。
- また、血管の炎症が惹起されるタイミングを検証するため、誘導 1 週間から 3 週間まで 1 週おきに、これら細胞の浸潤を確認した。誘導 1 週間よりマクロファージ、好中球、pDC、ミエロイド系細胞の全てに浸潤が認められた。また、血管の炎症を確認するため、血管内皮細胞の VCAM-1 染色をしたところ、誘導 1 週間から発現がみられ、これら免疫細胞の浸潤と同時に血管の炎症が惹起されることを明らかにした。
- また、誘導 6 週間目の回腸の RNA を抽出し、qPCR を行ったところ、誘導群では、炎症性サイトカインである IL-6 の発現やマクロファージのマーカーである F4/80 の発現が上昇していた (Figure 1B)

Figure 1

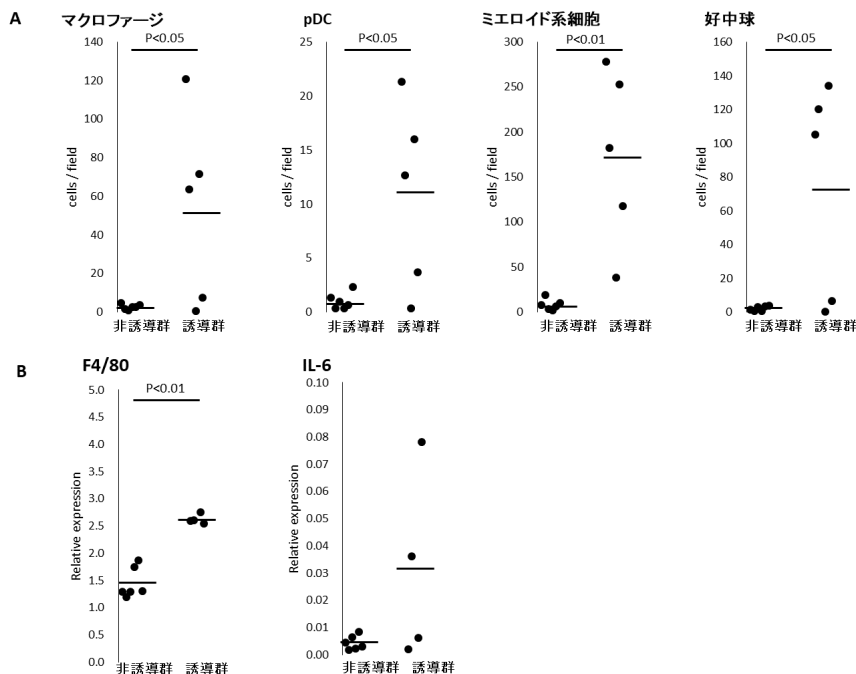


Figure 1
LMV誘導マウスモデルの回腸の血管周囲でマクロファージや好中球などの浸潤がみられる
LMV誘導 6 週間後の回腸を用いて、非誘導群と誘導群で比較した
(A) 回腸血管周囲への浸潤細胞のカウント (200倍 1視野あたりの細胞数)
(B) 回腸のqPCR

- (2) 次に、血管炎を惹起する原因の検証として、血管内からの影響を確認した。血清中のサイトカイン変動に着目し、回腸の血管近傍で免疫細胞の浸潤が見られ始めた誘導 1 週間後の血清を用いてサイトカインアレイ解析を実施した。結果、Fractalkine、MIG、RANTES、G-CSF、IL-13、IL-12 p40/p70 の 6 項目が LMV 誘導マウスモデルで非誘導群に比べ 2 倍以上の上昇を示した (Figure 2)。

Figure 2

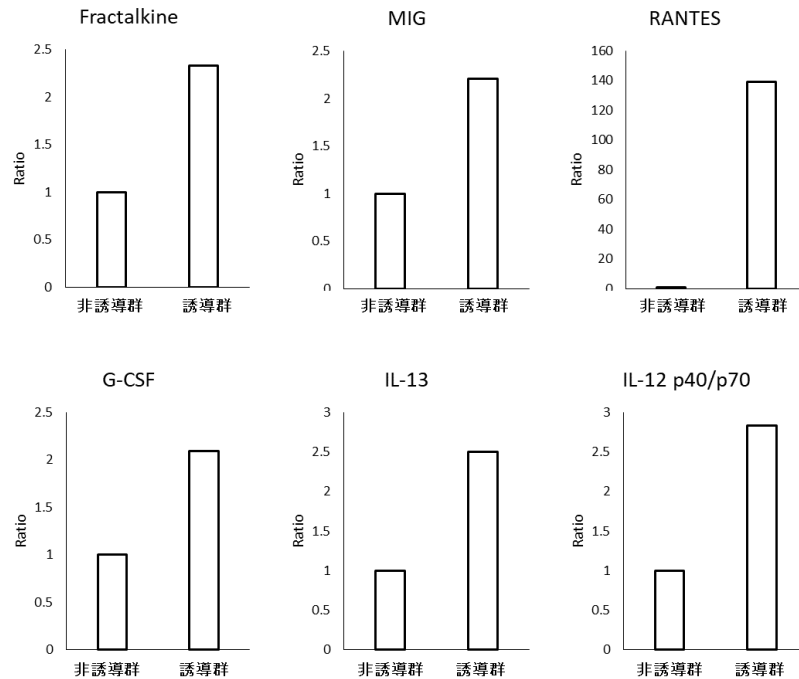


Figure 2

LMV誘導 1 週間後の血清を用いて、非誘導群と比較して 2倍以上の変動がみられたサイトカインやケモカインを6項目ピックアップした

本研究は、LMV 病態に関連した血管炎が発症する機序を解析した。LMV 誘導群では、過剰な TLR7 シグナルが入ることにより、回腸血管近傍への免疫細胞の浸潤促進が示唆されること、また、誘導群の血清中では複数のサイトカインやケモカインが顕著に増加することを明らかにした。今後、血管内皮細胞株である HUVEC 細胞を用いて、本研究で抽出したサイトカインやケモカインの刺激によって HUVEC が活性化することや、また、LMV の誘導によって血管周囲に浸潤してきた免疫細胞を TLR7 アゴニストで活性化し放出されるサイトカインなどが、HUVEC の炎症応答にどのように関与するかを検証する。それにより、血管炎の発症機序を分子レベルで明らかにし、特異性の高い効果的な治療ターゲットを探索する。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hayakawa Kunihiro, Fujishiro Maki, Yoshida Yuko, Kataoka Yuko, Sakuma Shota, Nishi Takuya, Ikeda Keigo, Morimoto Shinji, Takamori Kenji, Sekigawa Iwao	4. 巻 208
2. 論文標題 Exposure of female NZBWF1 mice to imiquimod-induced lupus nephritis at an early age via a unique mechanism that differed from spontaneous onset	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 33～46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cei/uxac012	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 Matsuoka Yuki, Morimoto Shinji, Fujishiro Maki, Hayakawa Kunihiro, Kataoka Yuko, Suzuki Satoshi, Ikeda Keigo, Takamori Kenji, Yamaji Ken, Tamura Naoto	4. 巻 39
2. 論文標題 Metformin repositioning in rheumatoid arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Rheumatology	6. 最初と最後の頁 763-768
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hayakawa K, Fujishiro M, Yoshida Y, Kataoka Y, Sakuma S, Nishi T, Ikeda K, Morimoto S, Sekigawa I
2. 発表標題 Imiquimod induced lupus nephritis in NZBWF1 mice is developed through a unique mechanism different from spontaneous onset
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〕

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------