

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16291

研究課題名（和文）半月体形成性糸球体腎炎におけるGATA3陽性Tregと腎固有細胞とのクロストーク

研究課題名（英文）Crosstalk between GATA3+ regulatory T cells and renal resident cells in crescentic glomerulonephritis

研究代表者

酒井 亮太（Sakai, Ryota）

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：80727529

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：既報のビーズ法に加え、静電気を利用したフィルター法を組み合わせることで、高純度かつ高収率で腎臓から糸球体の抽出方法を確立した。これをセルソーティングによって一細胞レベルに分離し、初代培養細胞として培養・継代し、制御性T細胞(Treg)との共培養を可能にした。Conventional T細胞の増殖・生存に必要な強いTCR刺激では、TregにおけるT-betおよびRORgtの発現が亢進した一方で、GATA3の発現は抑制された。胸腺由来Tregでは「強すぎないTCR刺激」でGATA3発現が亢進し、プロフェッショナルな抗原提示細胞である樹状細胞ではなく、臓器固有細胞からの刺激によ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

プロフェッショナルな抗原提示細胞といわれる樹状細胞ではなく、糸球体から抽出された臓器固有細胞との共培養においてのみ、TregにおけるGATA3の発現が亢進したことから、臓器局所に遊走されたTregにおいて、組織制御性T細胞として機能するために「強すぎないTCR刺激」がGATA3発現には必要で、これは臓器固有細胞によってもたらされる可能性があり、ヒト細胞での臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We have established a new method for extracting glomeruli from kidneys with high purity and high yield by combining a filter method using electrostatic charges in addition to the previously reported beads method. The glomeruli were isolated at the single-cell level by cell sorting, and cultured and passaged as primary culture cells, enabling co-culture with regulatory T cells (Treg). Strong TCR stimulation, which is required for the proliferation and survival of conventional T cells, also enhanced T-bet and RORgt expression in Tregs, while GATA3 expression was suppressed. In thymus-derived Tregs, "not too strong TCR stimulation" enhanced GATA3 expression, indicating that it was due to stimulation from organ-specific cells such as mesangial cells rather than dendritic cells, which are professional antigen-presenting cells.

研究分野：免疫学、リウマチ膠原病学、腎臓病学

キーワード：制御性T細胞 組織制御性T細胞 抗原提示細胞 TCR GATA3 ボドサイト メサングウム細胞 血管内皮細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

血管炎症候群に分類される顕微鏡的多発血管炎(MPA)や全身性エリテマトーデス(SLE)によるループス腎炎の一部は、短期間に腎機能が低下し、急性腎不全をきたす急速進行性糸球体腎炎の臨床像を示し、病理組織学的には半月体形成性糸球体腎炎(cGN)を呈する。昨今、B細胞刺激因子阻害薬(ベリムマブ)やCD20モノクローナル抗体医薬(リツキシマブ)が各々の疾患や病態に対し、保険適応となったが、その寛解導入治療の主体は副作用の多い大量ステロイドであり、血漿交換療法などの集学的治療を行っても慢性腎不全となる例や、臨床的寛解に至っても薬剤中止後に再燃と寛解を繰り返し、結果的に修復不可能な慢性腎不全となる例が存在する。そして、人工透析により被る患者の生活環境や医療経済的な影響は計り知れない。cGNを呈する膠原病疾患における免疫制御や炎症収束・修復再生・長期寛解に至るメカニズムの解明が切に求められている。

筆者らはcGNマウスモデルを用いて、腎臓に存在する組織制御性T細胞(組織Treg)と呼ばれる非リンパ系組織に存在するTregに着目し、特にGATA3+Tregが、腎炎回復期の組織で著増し、腎機能の改善に寄与することを明らかにした(Sakai R et al. Cell Mol Immunol. 2020)。GATA3は脾臓やリンパ節などの2次リンパ組織におけるTregではほとんど発現が見られないが、組織に遊走した後、特に疾患回復期において強く発現し、GATA3をCRISPR-Cas9システムでノックダウンすると腎機能の悪化をもたらす。この腎炎モデルはIFN γ を産生するTbet+Th1細胞(CD4陽性T細胞中の40-50%)およびIL-17Aを産生するROR γ t+Th17細胞(同15-20%)によって病態悪化を示すが、腎組織にはIL-4を産生するGATA3+Th2細胞はほとんど存在しない(同3%以下)。GATA3+Tregがどのように誘導され、どのように免疫制御を司り、腎固有細胞(線維芽細胞や血管内皮細胞、足細胞など)に作用して、過剰な炎症と線維化を収束に導き、修復に寄与するのか、その具体的機序は明らかではない。Tregの臨床応用を考える上で、解決すべき重要課題であり、ヒトでの研究はもちろんであるが、まず、マウスモデルにおいて腎臓局所でその機序を明らかにすることでヒトへの治療応用が開けると考えた。

2. 研究の目的

筆者らは腎炎回復期においてGATA3を発現する組織制御性T細胞(Treg)が腎機能の改善に寄与することを先行研究で明らかにしている。半月体形成性糸球体腎炎マウスモデルで腎機能改善に寄与するメカニズムを明らかにすることを目的として、まずはGATA3陽性Tregの発現・誘導機構、免疫制御機構と腎固有細胞との関係性を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

1. GATA3の遺伝子座にGFPを組み込んだトランスジェニックマウスTg(GATA3-EGFP)とFoxp3-IRES-hCD2-CD52ノックインマウスをかけ合わせる。cGNモデル誘導後、回復期のマウス腎臓から生細胞のままGFP-GATA3およびhCD2-FoxP3を発現するTregを分離し、bulkもしくはsingle cell RNA-seq解析を行い、GATA3+Tregの機能発現に重要な遺伝子の同定を試みる。
2. Hatje F et al. JASN 2021の報告を参考に、腎系球体に存在する腎固有細胞であるメサンギウム細胞、血管内皮細胞、足細胞のソーティングを試み、初代培養細胞として培養する。
3. 様々な液性因子と共にin vitroでのGATA3陽性Tregの誘導を試みる。
4. GATA3陽性Tregと樹状細胞もしくは腎固有細胞との共培養を試みる。

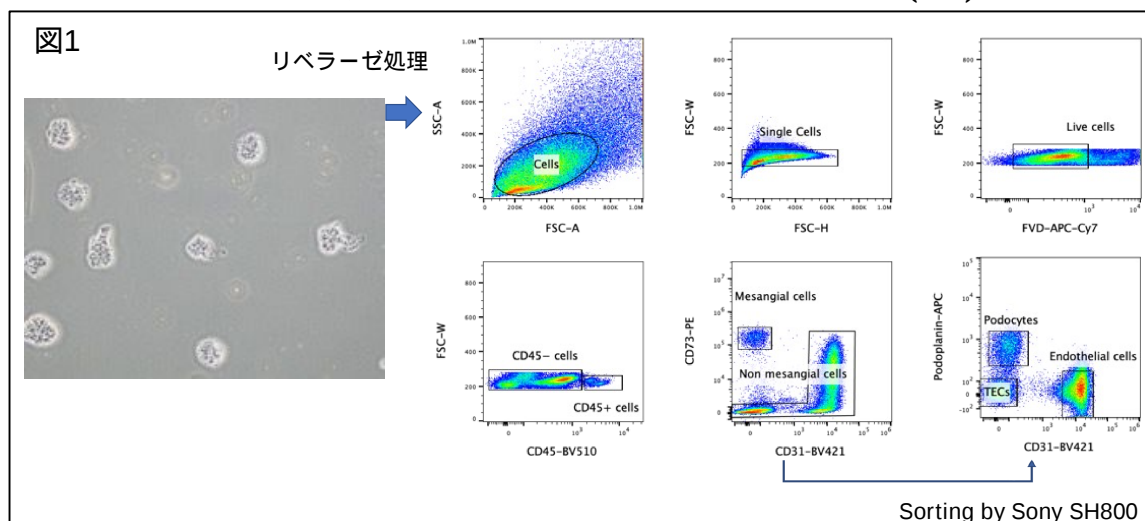
4. 研究成果

1. まず、生細胞のままGATA3陽性Tregの遺伝子発現の特徴を明らかにするために、GATA3を標識とするレポーターマウスの入手を試みた。東北医科薬科大学医化学教室森口尚先生が開発した、GATA3の遺伝子座にGFPを組み込んだトランスジェニックマウスTg(GATA3-EGFP)と慶應義塾大学医学部微生物学免疫学吉村昭彦先生との共同研究の一環として入手したFoxp3-IRES-hCD2-CD52ノックインマウス(C57BL6/J背景)をかけ合わせる予定であったが、GATA3-EGFPマウスがICR背景であることから、C57BL6/Jのコンジェニック化に時間を要すると考え、GATA3の遺伝子座にLacZを組み込んだトランスジェニックマウスTg(GATA3-lacZ)(C57BL/6N♀×DBA/2♂のF1で、交雑種であるBDF1背景)を入手した。このマウスは大腸菌由来の β -galactosidase遺伝子(lacZ)を発現することでGATA3を発現する細胞を標識でき、当方の先行研究で明らかとなったGATA3陽性Tregが標識可能である。問題点として、代表的な β -galactosidaseの検出方法であるX-gal染色は細胞膜透過性が乏しいため、細胞や組織を固定化する必要があり、生細胞の標識は困難であること、また、従来の β -galactosidase検出蛍光

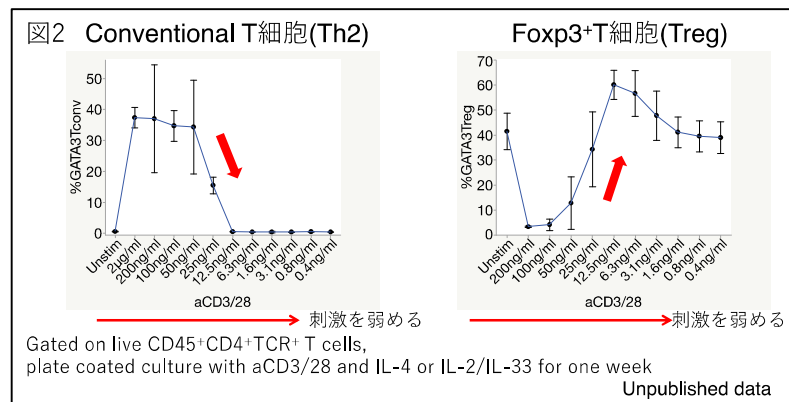
試薬は細胞内滞留性が低いため、 β -galactosidase 未発現細胞と発現細胞を明瞭に区別できない。そこで、浦野、神谷らが開発した新たな蛍光試薬 **SPiDER- β Gal** を用いることにした(株式会社同仁化学研究所)。本試薬は、 β -galactosidase との酵素反応により、キノンメチドと呼ばれる中間体を形成して、近傍のタンパク質中の SH 基等の求核性基と安定な共有結合を形成し、蛍光性になる。このようにして反応した試薬が細胞内タンパク質に固定化されることで優れた細胞内滞留性を有し、その結果、 β -galactosidase 発現細胞を一細胞レベルで明確に検出することが可能となる試薬である。この **GATA3-lacZ** マウスを **C57BL6/J** マウスをバッククロスした 3 世代目を確保した。また、蛍光試薬 **SPiDER- β Gal** を用いて、フローサイトメトリー解析で **GATA3** 陽性 **Treg** を明瞭に分離することとした。

しかし、蛍光試薬 **SPiDER- β Gal** 染色の条件検討を繰り返したが、フローサイトメトリー解析では **conventional T** 細胞で **GATA3** 陽性染色のうち、 β -galactosidase 陽性の染色を示す細胞は約 60%にとどまった。さらに **Foxp3** を発現する **hCD2** 陽性細胞および **GATA3** 陽性細胞のうち β -galactosidase 陽性染色となる細胞は約 10-20%にとどまり、**GATA3** 陽性 **Treg** を明確に分離することは困難と判断した。また組織における解析でも自家蛍光との区別が困難であり、**SPiDER- β Gal** 染色では明確に **GATA3** 陽性 **Treg** を区別することは困難と判断した。従って、生細胞のまま分離した **GATA3** 陽性 **Treg** の bulk もしくは **single cell RNA-seq** 解析は施行できなかった。

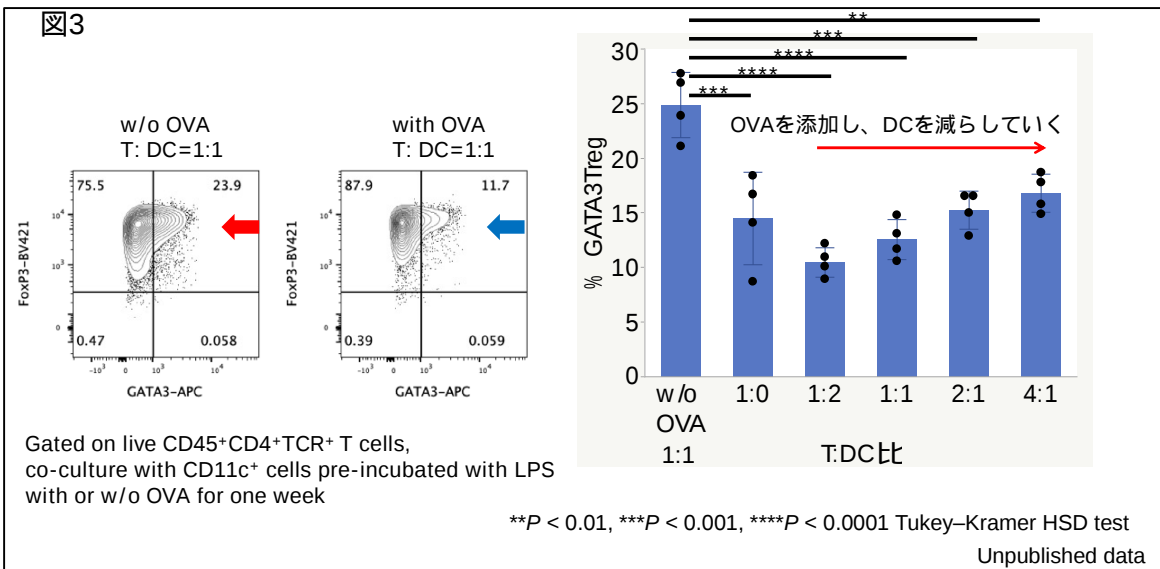
2. 次に、腎系球体に存在する腎固有細胞であるメサングウム細胞、血管内皮細胞、足細胞のソーティングを試みた。既報にあるビーズ法(Takemoto M et al. Am J Pathol. 2002)と、静電気を利用して異物を除去可能なフィルター法(Wang H et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2019)を組み合わせることで、高純度かつ高収率で腎臓から系球体を抽出する方法を確立した。この系球体を Hatje F らによる J Am Soc Nephrol. 2021 に報告された方法を用いて、リペラーゼ処理後にセルソーティングによって一細胞レベルに分離し、初代培養細胞として培養・継代可能なように各種培養条件を明らかにし、制御性 T 細胞との共培養実験が可能になった(図 1)。



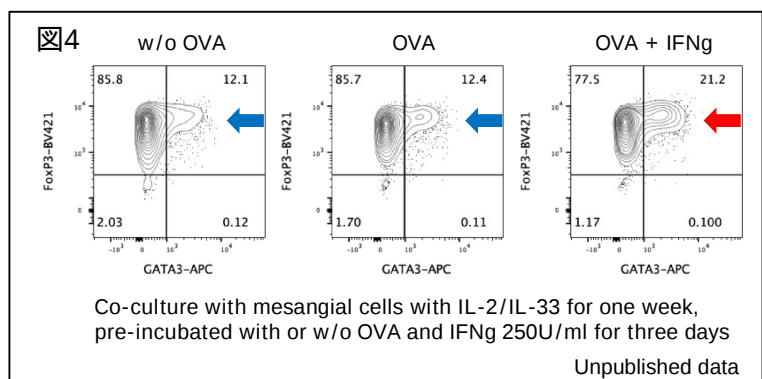
3.次に、**in vitro** での **GATA3** 陽性 **Treg** の誘導を試みた。一般的に **Treg** は **TCR** 刺激(antiCD3/28)及び **IL-2** の刺激が生存に必須とされるが、**in vitro** において **GATA3** 陽性 **Treg** の生存に最も寄与する因子について検討した。脾臓から単離した **Treg** を **CD3/CD28** 刺激なしに **IL-2** のみで刺激することで **GATA3** を発現し、さらに **IL-33** を加えることで **in vitro** で **GATA3** を強く発現することを明らかにした。ここで、**Foxp3** を発現しない **conventional T** 細胞を **IL-4** および **IL-2** のいわゆる **Th2** 条件で **TCR** 刺激をしたところ、**TCR** 刺激を減らしていくと段階的に **GATA3** の発現は減少した。一方で、**Treg** においては **GATA3** の発現には **IL-2** および **IL-33** 刺激が重要であるが、**Foxp3** を発現しない **conventional T** 細胞の増殖に必要な程度の強い **TCR** 刺激を加えたものは逆に **GATA3** の発現が抑制され、**Foxp3** を失った **Treg(exTreg)**が増加した。そこで **TCR** 刺激を段階的に減らしていくとある程度の強すぎない **TCR** 刺激では **exTreg** は増加せず、**TCR** 刺激無しと比較して **GATA3** 陽性 **Treg** が増加す



ることがわかった(図 2)。一方で、**Foxp3** を発現しない **conventional T** 細胞を **Th1**、**Th2** および **Th17** 誘導条件(Sekiya ら *Methods Mol Biol.* 2016)で刺激した場合は従来から知られているように、強い **TCR** 刺激が必要であり、**T-bet** 陽性 **Treg** および **RORgt** 陽性 **Treg** の誘導条件でも同様に強い **TCR** 刺激が必要であった。



4. この「強すぎない **TCR** 刺激」の誘導機序を明らかにするために **OVA** ペプチドに反応する **TCR** を有する **OT-II** マウスを用いてプロフェッショナルな抗原提示細胞といわれる樹状細胞との共培養を実施した。樹状細胞との共培養では **Treg** で **GATA3** が誘導されなかったのに対し(図 3)、系球体から抽出された臓器固有細胞(特にメサンギウム細胞)との共培養では、**IFN γ** 投与下で **GATA3** の発現



が亢進した(図 4)。**IFN γ** 投与下では臓器固有細胞(メサンギウム細胞および足細胞)の細胞表面における **Class II** の発現が濃度依存的に亢進した。以上より、臓器局所に遊走された **Treg** が組織制御性 **T** 細胞として機能するためには **GATA3** の発現が臓器固有細胞によってもたらされる可能性があり、ヒト細胞での組織制御性 **T** 細胞の臨床応用の礎となる知見である。

考 察

Treg は、免疫系の末梢寛容と組織の恒常性に重要な役割を果たすことが多数報告されている。しかし、この臓器特異的組織 **Treg** がどのように発現するのか、未だ不明な点が多く、今後の説明が期待されていた。本研究では、臓器局所で免疫制御や組織修復に寄与するとされる **Treg** における **GATA3** の誘導がどのようにもたらされるのか、その因子に焦点を当てた。結果、**conventional T** 細胞と異なり、臓器固有細胞からもたらされる「強すぎない **TCR** 刺激」と **IL-2** 並びに **IL-33** が **Treg** における **GATA3** 発現に重要である可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 酒井亮太、柴田明子、岡田悠介、吉永正一、斎藤俊太郎、倉沢隆彦、近藤恒夫、天野宏一
2. 発表標題 ループス腎炎に対するシクロホスファミド・タクロリムス併用療法の有用性と安全性
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryota Sakai, Mariko Toguchi, Koichi Amano
2. 発表標題 The survival factors of GATA3+ Tregs in the convalescence stage of glomerulonephritis
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井亮太、戸口真理子、天野宏一
2. 発表標題 腎炎回復期に出現するGATA3陽性Tregの生存に最も寄与する因子の検討
3. 学会等名 第50回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryota Sakai, Koichi Amano
2. 発表標題 Tissue resident GATA3+ regulatory T cells regulated by the IL-33-ST2 axis and amphiregulin play roles in the convalescence stage of crescentic glomerulonephritis.
3. 学会等名 The 65st Annual Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology. April 26-28, 2021
4. 発表年 2021年

1．発表者名 酒井亮太 戸口真理子 天野宏一
2．発表標題 腎炎における組織制御性T細胞の特徴とその役割
3．学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4．発表年 2023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
研究協力者	森口 尚 (Moriguchi Takashi)	東北医科薬科大学・医化学・教授	GATA3-IacZマウス供与
研究協力者	吉村 昭彦 (Yoshimura Akihiko)	東京理科大学・研究推進機構 生命医科学研究所・教授	IRES-hCD2-CD52マウス供与
研究協力者	戸口 真理子 (Toguchi Mariko)	埼玉医科大学総合医療センター・リウマチ・膠原病内科・実験補助員	

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