

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591442

研究課題名(和文) 転写因子 IRF4 は自己免疫疾患における肉芽腫の形成に関与する

研究課題名(英文) IRF-4 is associated with the development of granulomas in autoimmune disease

研究代表者

関根 英治 (Sekine, Hideharu)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40363759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患における肉芽腫形成の機序は不明である。我々は、転写因子 IRF4 欠損の自己免疫モデルマウス(MRL/lpr系)で、肺などの多臓器にランゲハンス型多核巨細胞を伴う肉芽腫の自然発症を見いだした。研究の結果、同マウスでは IFN- γ 産生 Th1 細胞の増加と血清 IFN- γ の高値を認めた。一方、転写因子 IRF1 欠損 MRL/lpr マウスでは、IL-4 産生 Th2 細胞の増加と、異形型多核巨細胞を伴う肺肉芽腫の形成を認めた。即ち、転写因子 IRF4 と IRF1 は Th 細胞のバランス保持に重要であり、その欠損は MRL/lpr マウスにおいて Th バランスを変化させ、多臓器に肉芽腫性病変を生じさせることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms of granuloma formation in autoimmune diseases is unknown. We found that transcription factor IRF4-deficient lupus-prone MRL/lpr mice develop granulomas with Langhans giant cells in multiple organs including lung. We also found that IRF4-deficient MRL/lpr mice had increased numbers of IFN- γ -producing Th1 cells with elevated levels of serum IFN- γ . While, transcription factor IRF1-deficient MRL/lpr mice had increased numbers of IL-4-producing Th2 cells and granulomas with foreign body giant cells in their lung. Our data indicate that transcription factor IRF4 and IRF1 play important roles to maintain Th1/Th2-cell/cytokine balance, and defect of these transcription factors causes development of granulomatous lesions in multiple organs.

研究分野：膠原病・アレルギー

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー

キーワード：IRF4 IRF1 自己免疫 肉芽腫

1. 研究開始当初の背景

ヒトにおける肉芽腫性疾患は、結核菌・化学物質などによる原因因子の明確なものほかに、その発症に自己免疫が疑われる疾患が多数存在するが、肉芽腫の形成に至るメカニズムは解明されていない。

これまで研究代表者らは、全身性自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)のモデルマウス(MRL/lpr マウス)において、腎糸球体の構成成分(コラーゲン成分)や dsDNA などの複数の自己抗原に反応して腎炎原性となりうる B 細胞が存在することを見出し(1)、また IgG3 サブクラスの自己抗体で形成される免疫複合体が腎基底膜と糸球体上皮細胞の傷害を引き起こし、タンパク尿を引き起こすことを明らかにし(2)、さらに補体成分 C3 と糸球体腎炎発症との関連を明らかにしてきた(3)。

一方、SLE の診断には自己抗体の存在は必須ではなく、自己抗体非存在下でのループス腎炎発症の有無は不明である。そこで、研究代表者らは、自己抗体非存在下でもループス腎炎が発症するかを確認するため、B 細胞の抗体産生に必須の転写因子である Interferon regulatory factor 4(IRF4)を欠損した *Irf4*^{-/-}/MRL/lpr マウスを作製し、その腎炎の解析を行なった。その結果、IRF4 欠損 MRL/lpr マウスは典型的なループス腎炎の像を呈しないものの、糸球体のメサンギウム基質の拡大や増殖性変化を示した。驚くべき事に、IRF4 欠損 MRL/lpr マウスでは全例で類上皮肉芽腫形成を伴う白色脾(white spleen)が観察され、約半数例で肝や肺にもラングハンス型巨細胞を伴う非乾酪性類上皮肉芽腫を認めた(図1)。

これに対し、非自己免疫モデルマウスである C57BL/6(B6)系では、IRF4 欠損下でも脾・肝・肺に肉芽腫の形成は観察されなかった。

以上の結果から、自己免疫疾患における肉芽腫形成の背景には、転写因子 IRF4 と自己免疫モデルマウス(MRL/lpr 系)の遺伝的要因が関与することが推測され、肉芽腫形成に至る病態の解明を行う本研究の着想に至った。

(1) Sekine, et. al, *J Immunol* 172:3913-3921, 2004

(2) Sekine, et. al, *J Immunol* 177:7423-7434, 2006

(3) Sekine, et. al, *J Immunol* 166:6444-6451, 2001

2. 研究の目的

これまでの論文等による報告から、肉芽腫の形成にはマクロファージの活性化が重要であり、その活性化には IFN- γ を産生するヘルパー T 細胞の一種である Th1 細胞が関与することが判明している。ヘルパー T 細胞は Th1 細胞以外にも、IL-4 を産生する Th2 や IL-17 を産生する Th17 細胞が知られており、それらは互いに抑制し合いながら、調節性 T

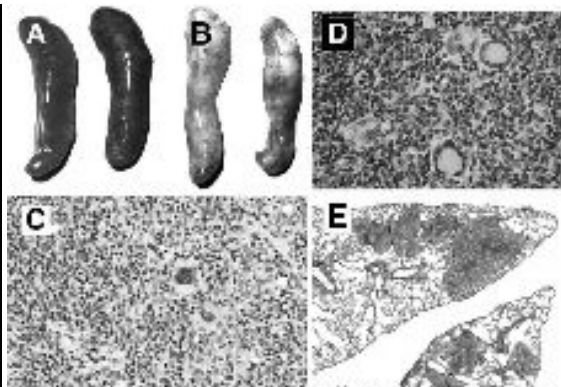


図1 (A) 野生型、及び (B-E) IRF4欠損MRL/lprマウスにおける脾・肝・肺の病理学的所見。(C) 野生型MRL/lprマウスの脾臓、(D) IRF4欠損MRL/lprマウスでの白色脾、(E)脾臓上皮肉芽腫を伴う脾臓、(F)肝臓脾臓でのラングハンス型巨細胞、(G)脾臓の肉芽腫を伴う脾臓。

細胞(Treg 細胞)の制御を受け、免疫応答のバランスを保持している。

一方、転写因子 IRF4 は B 細胞の抗体産生に必須であること以外に、ナイーブ T 細胞から Th2 細胞と Th17 細胞への分化成熟にも必須であることが報告されている。

転写因子 IRF1 は、Th1 細胞への分化成熟に必須であり、IRF4 と対照的な働きをすることが報告されている(4)。

これらの報告を踏まえて、研究代表者らは、IRF4 欠損 MRL/lpr マウスで観察された肉芽腫のメカニズムについて、IRF4 は Th2 細胞や Th17 細胞の分化成熟に寄与することで Th1 細胞による過剰な免疫応答を抑え、自己免疫肉芽腫の形成を抑制しているとの仮説を建てた。すなわち、自己免疫を自然発症する MRL/lpr マウスにおいて IRF4 欠損の結果 Th1/Th2/Th17 のバランスが変化し、Th1 優位に変化したため肉芽腫形成に至ったと考え、そのメカニズムの解明(仮説の証明)を本研究の目的とした。

(4) Elser, et. al, *Immunity* 17:703-712, 2002

3. 研究の方法

IRF4 欠損 MRL/lpr マウスにおける、脾臓 Th1, Th2, Th17 細胞のポピュレーションおよび血清中サイトカイン濃度を解析し、野生型 MRL/lpr マウスのそれと比較することで、IRF4 欠損で生じる同マウスにおける Th1/Th2/Th17 のバランスの変化を明らかにする。

6, 12, 24 週齢の野生型、および IRF4 欠損 MRL/lpr マウスを屠殺し、脾臓 CD4⁺ T 細胞を磁気ビーズにて分離し PMA/ionomycin で刺激した後、IFN- γ , IL-4, IL-17 産生性細胞を細胞内サイトカイン染色による FACS 解析または ELISPOT 法にて検出し、Th1, Th2, Th17 細胞のポピュレーションおよび絶対数を解析する。さらに、同マウスから採血し、血清サイトカインレベルを蛍光マイクロビーズアレイによるマルチプレックス解析にて測定す

る。

また、IRF4はB細胞の分化成熟や抗体産生へも関与するため、同マウスにおける脾臓CD19⁺B細胞のポピュレーションの変化をFACSで解析する。

コントロールマウスとしてIRF4欠損の非自己免疫マウス(*Irf4*^{-/-}C57BL/6マウス)を用いて同様の解析を行う。

IRF4欠損MRL^{+/+}マウスを作製し、IRF4欠損MRL/*Ipr*マウスで観察される病態へのFasの関与の有無を明らかにする。

MRL/*Ipr*マウスは先天的にアポトーシスに関与するFas遺伝子(=*Ipr*)に変異があることが判明している。*Irf4*^{-/-}MRL/*Ipr*マウスで観察された病態へのFas遺伝子変異の影響の可能性を除外するため、同遺伝子に変異のないMRL^{+/+}マウスをJackson laboratory社より購入し、申請者が保持する*Irf4*遺伝子欠損MRL/*Ipr*マウスと交配してIRF4欠損MRL^{+/+}マウスを作成。IRF4欠損MRL/*Ipr*マウスとの免疫・病理学的表現型の違いを解析する。

IRF1欠損MRL/*Ipr*マウスを作製してそれらの免疫・病理学的表現型を解析し、IRF1欠損で生じる同マウスにおけるTh1/Th2/Th17のバランスの変化や、病理学的表現型を明らかにする

*Irf1*遺伝子ノックアウトC57BL/6マウスをJackson laboratory社より購入し、申請者が保持する*Irf4*遺伝子欠損MRL/*Ipr*マウスに戻し交配してIRF1欠損、またはIRF4/IRF1二重欠損MRL/*Ipr*マウスを作製する。戻し交配が十分か否かSpeed congenics法にて検定する。十分な戻し交配を確認した後、免疫・病理学的表現型の解析を同様に進行。

4. 研究成果

脾臓CD4⁺T細胞内サイトカイン染色の結果、野生型MRL/*Ipr*マウスと比較し、IRF4欠損MRL/*Ipr*マウスでは、IFN- γ 産生性Th1細胞が著明に増加していることが判明した。また、IRF4欠損C57BL/6マウスでも同様の傾向が認められたが、IRF4欠損MRL/*Ipr*マウスほどのIFN- γ 産生性Th1細胞の増加は認められなかった(図2)。また、ELISPOTによる解析でも同様の結果であった(データ非表示)。

血清サイトカイン濃度を測定した結果、野生型マウスと比較し、IRF4欠損MRL/*Ipr*マウスでは上記の結果と矛盾なく血清IFN- γ レベルが有意に高値であった(図3)。

さらに脾臓CD19陽性B細胞のポピュレーションを解析した結果、驚くべきことにIRF4欠損MRL/*Ipr*マウスでは12週齢以降に脾臓B細胞の消失が観察されたが、野生型MRL/*Ipr*マウスやIRF4欠損C57BL/6マウスでは脾

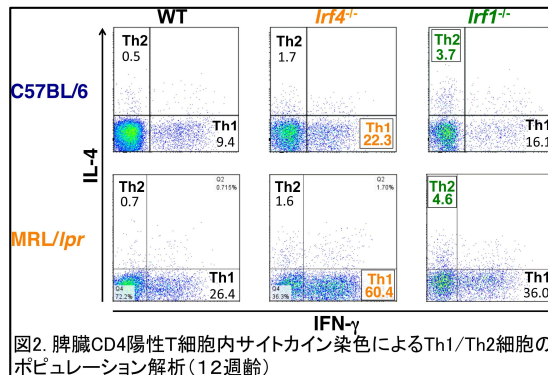


図2. 脾臓CD4陽性T細胞内サイトカイン染色によるTh1/Th2細胞のポピュレーション解析(12週齢)

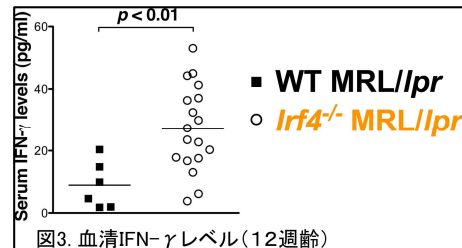


図3. 血清IFN- γ レベル(12週齢)

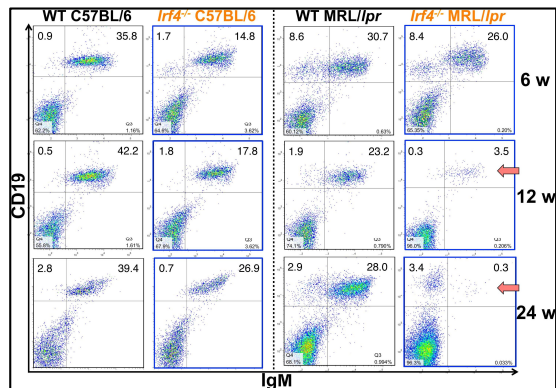


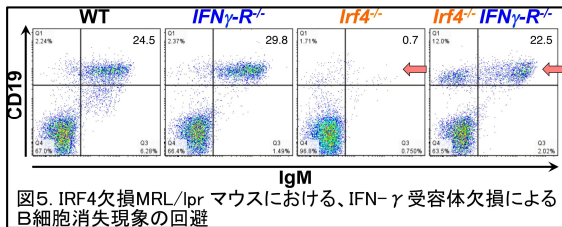
図4. 加齢による脾臓CD19陽性B細胞内ポピュレーションの変化。脾臓B細胞の消失は観察されなかった(図4)。

IRF4欠損MRL/*Ipr*マウスで観察された肉芽腫の形成やB細胞の消失の原因に、同マウスでのFasの欠損の関与が疑われたため、IRF4欠損MRL^{+/+}マウスを作製し、その免疫・病理学的表現型の解析を行った。

その結果、IRF4欠損MRL^{+/+}マウスでは、肝や肺にあきらかな肉芽腫の形成は認められなかったが、IRF4欠損MRL/*Ipr*マウスと同様に、12週齢以降に脾臓B細胞の消失が認められた。

すなわち、IRF4欠損MRL/*Ipr*マウスにおける肉芽腫形成にはTh1細胞の増加とFas異常の関与が考えられたが、B細胞の消失現象はFas異常に依存しないことが考えられた。

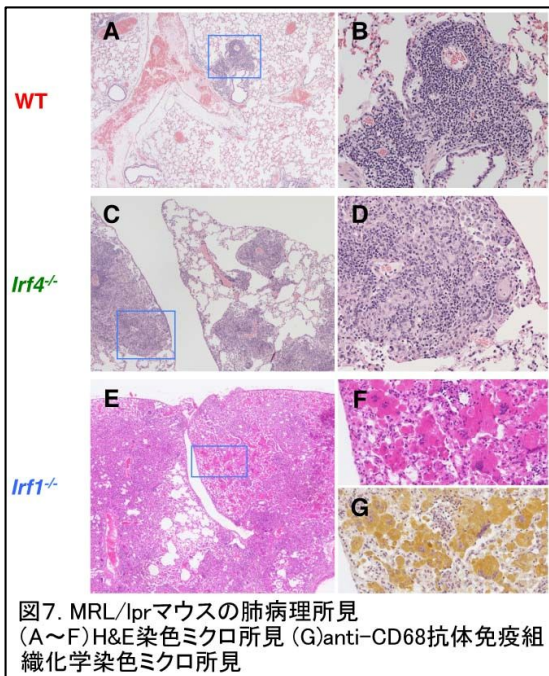
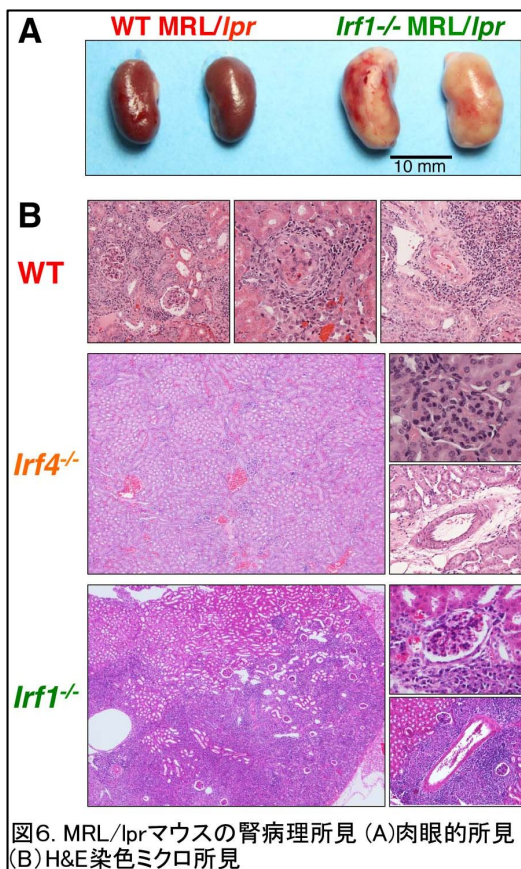
IRF4欠損MRL/*Ipr*マウスの病態にIFN- γ 産生性Th1細胞の関与が強く疑われたため、IRF4とIFN- γ 受容体を二重欠損した*Irf4*^{-/-}IFN γ R^{-/-}MRL/*Ipr*マウスを作製し免疫・病理学的表現型の解析を行った。その結果、同マウスでは当該臓器での肉芽腫の形成は観察されず、また脾臓B細胞消失も観察されなかった(図5)。



IRF4欠損MRL/lprマウスで観察された病態は、IRF4欠損によって生じたTh1/Th2/Th17細胞のバランスの変化(IFN- γ 産生性Th1細胞の増加)によることが強く疑われたため、Th細胞のバランスにIRF4と対照的な働きをするIRF1を欠損させたIRF1欠損MRL/lprマウスを作製し、その免疫・病学的表現型の解析を行った。

FACS解析の結果、野生型MRL/lprマウスやIRF4欠損MRL/lprマウスと比較して脾臓ではIL-4産生性のTh2細胞が増加することが判明した(図2)。

病理学的解析では、糸球体病変はほとんど観察されなかったものの、血管周囲へのCD4陽性T細胞の浸潤と、CD4陽性T細胞を主体とする境界明瞭な高度の間質性腎炎が観察された(図6)。また肺にCD68陽性のマクロファージや、類上皮細胞、異形型多核巨細胞の高度な浸潤を伴う肉芽腫の形成が観察された(図7)。一方、IRF4欠損MRL/lprマウスで観察された脾臓でのB細胞の消失現象は観察されなかった(データ非表示)。



総括: IRF-4欠損MRL/lprマウスでは自己抗体とB細胞の消失とともに腎炎の改善が認められたが、Th1細胞の増加と共に、多臓器にランゲハンス型多核巨細胞を伴う肉芽腫の形成が観察された。その機序として、自己反応性のTh1細胞の増強によるマクロファージの活性化が関与することが推測された。

IRF-1欠損MRL/lprマウスでは、Th2細胞の増強を認め、IRF-4欠損MRL/lprマウスに認められなかった間質性腎炎や異形型多核巨細胞を伴う肺肉芽腫性病変が観察された。その機序として、自己反応性Th2細胞がひきおこす病態が推測された。

結論: 転写因子IRF4とIRF1はTh細胞のバランス保持のために重要であり、その欠損はSLEモデルマウスであるMRL/lprマウスにおいてThバランスを変化させ、多臓器に異なる多核巨細胞を伴う肉芽腫性病変を生じさせる。

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7件)

- Sekine H, Kinser TT, Qiao F, Martinez E, Paulling E, Ruiz P, Gilkeson GS, and Tomlinson S. The benefit of targeted and selective inhibition of the alternative complement pathway for modulating autoimmunity and renal disease in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum*, 63:1076-1085, 2011.
- Sekine H, Ruiz P, Gilkeson GS, and Tomlinson S. The dual role of complement in the progression of renal disease in NZB/W F1 mice and alternative pathway inhibition. *Mol Immunol*, 49:317-323, 2011.

Sakamoto N, Sekine H, Kobayashi H, Sato Y, Ohira H. Association of the toll-like receptor 9 gene polymorphisms with Behcet's disease in a Japanese population. *Fukushima J Med Sci*, 58:127-135, 2012.

Kodama T, Sekine H, Takahashi M, Iwaki D, Machida T, Kanno K, Ishida Y, Endo Y, and Fujita T. Role of complement in a murine model of peanut-induced anaphylaxis. *Immunobiology*, 218:844-850, 2013.

Takahashi M, Sekine H, Endo Y, and Fujita T. Comment on "Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function". *J Immunol*, 190:2477, 2013.

Sekine H, Takahashi M, Iwaki D, and Fujita T. The role of MASP-1/3 in complement activation. *Adv Exp Med Biol*, 735:41-53, 2013.

関根英治, 町田豪, 坂本夏美, 高橋実, 補体の異常値と疾患, *福島医学雑誌*, 63, 93-107, 2013.

[学会発表](計8件)

Hideharu Sekine, Takeshi Machida, Eiji Suzuki, Christopher Reilly, Xian Zhang, Phil Ruiz and Gary S. Gilkeson. Interferon regulatory factor-4 deficient lupus-prone MRL/lpr mice show strong propensity for Th1 polarity and develop granulomatous lesions in multiple organs. The 75th Annual Meeting of the American College of Rheumatology, November 6, 2011, Chicago, USA.

Hideharu Sekine, Phil Ruiz, Gary S. Gilkeson, and Stephen Tomlinson. The benefit of targeted and selective inhibition of the alternative complement pathway for modulating autoimmunity and renal disease in murine models of systemic lupus erythematosus. The 5th Complement Workshop, June 23, 2011, Ixia, Rhodes, Greece.

町田 豪, 本間季里, 松山俊文, 由井克之, Ruiz Phil, 藤田禎三, Gilkeson Gary, 関根英治. IRF-4 欠損 MRL/lpr マウスは Th1 過剰応答を起し複数の組織に肉芽腫生病変を発症する. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会, 2011 年 11 月 27 日, 幕張, 千葉.

町田 豪, 山内直人, 関根英治. IRF-4 は MRL/lpr マウスの B 細胞分化・成熟に必須である. 基礎合同セミナーポスター発表会 2011, 2011 年 12 月, 福島.

Hideharu Sekine, Takeshi Machida, Natsumi Sakamoto, Eiji Suzuki, Xian Zhang, Christopher Reilly, and Gary S. Gilkeson. IRF-1 deficient lupus-prone MRL/lpr mice

show reduced glomerulonephritis but develop severe interstitial nephritis, renal vasculitis and pulmonary granulomas with propensity for Th2 polarity. The 76th Annual Meeting of the American College of Rheumatology, November 12, 2012, Washington, DC, USA.

Takeshi Machida, Natsumi Sakamoto, Eiji Suzuki, Xian Zhang, Christopher Reilly, Gary S. Gilkeson, and Hideharu Sekine. Lack of interferon regulatory factor-1 accelerates development of interstitial nephritis, renal vasculitis, and pulmonary granulomas with predominant Th2 polarity in lupus-prone MRL/lpr mice. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会, 2012 年 12 月 7 日, 神戸.

Takeshi Machida, Natsumi Sakamoto, Eiji Suzuki, Xian Zhang, Christopher M. Reilly, Gary S. Gilkeson, and Hideharu Sekine. Lack of IRF-1 accelerates development of tubulointerstitial nephritis and pulmonary granulomas with predominant Th2 polarity in lupus-prone MRL/lpr mice. 15th International Congress of Immunology, August 27, 2013, Milan, Italy.

Takeshi Machida, Natsumi Sakamoto, Kiri Honma, Toshifumi Matsuyama, Katsuyuki Yui, and Hideharu Sekine. Aged IRF-4-deficient lupus-prone MRL/lpr mice show peripheral B-cell deficiency with elevated serum IFN- γ levels and increased expression of IFN- γ -receptor-1 on B cells. 15th International Congress of Immunology, August 27, 2013, Milan, Italy.

[図書](計2件)

関根英治, 免疫複合体の可溶化とクリアランス, In 大井洋之, 木下タロウ, 松下操編, 補体への招待, メジカルビュー社, 2011 年 4 月, p88-98.

関根英治, 補体の検査法と意義, In 宮坂信之, 臨床検査増刊号・ここまでわかった自己免疫疾患, 医学書院, 2011 年 10 月, p1127-1134.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 英治 (SEKINE, HIDEHARU)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40363759

(2) 研究分担者

(なし)

研究者番号：

(3) 連携研究者

由井 克之 (YUI, KATSUYUKI)
長崎大学・医学部・教授
研究者番号：90274638

本間 季里 (HONMA, KIRI)
長崎大学・医学部・准教授
研究者番号：70307940