

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700438

研究課題名(和文) SLE様から強皮症様へ症状がスイッチするGVH病動物モデルのメカニズム解析

研究課題名(英文) The switching mechanisms of the phenotype of murine chronic Graft-versus-Host Disease from SLE type to SSc type.

研究代表者

小川 修平 (Ogawa, Shuuhei)

東京理科大学・生命医科学研究所・助教

研究者番号：20385553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：移植片対宿主病(GVH病)は骨髄移植の主要な合併症である。慢性GVH病は、罹患臓器が全身に渡り、全身性エリテマトーデス(SLE)、全身性強皮症といった自己免疫疾患に類似の臨床像を取る。様々な要因が症状に関与するが、本研究では、宿主(ホスト)側の環境がどのように症状に影響するのかを検討した。正常B6マウスをホストに用いた場合は抗DNA抗体産生や糸球体腎炎を特徴とするSLE型の慢性GVH病が誘導されるのに対し、CD28シグナル欠損マウスを用いた場合、激しい皮膚の炎症や体重減少が起こった。この症状の変化はホストの制御性T細胞の数やサイトカイン産生パターンの変化が要因であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In patients receiving allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT), chronic graft-versus-host disease (cGVHD) resembles autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE) and systemic sclerosis (SSc). In this study, we investigated the function of host T cells on symptoms in cGVHD. CD28-deficient mice as hosts showed an SSc-type cGVHD phenotype; in contrast, WT hosts showed an SLE-type cGVHD phenotype. Adoptive cell transfer experiments demonstrated that defects in host CD4+CD25+ Treg, but not in conventional CD4+ T cells were responsible for phenotypic conversion. Furthermore, the defect of host Treg cells altered the cytokine pattern of donor CD4+ T cells might lead to phenotypic change of cGVHD. Thus, host's CD28 signaling, particularly the pathway that drives Treg development, and host Treg cells played a protective role of the development of SSc-type cGVHD.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：疾患モデル 全身性強皮症動物モデル GVH病 T細胞 CD28 補助シグナル 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

T細胞の活性化や機能発現には、抗原特異的なT細胞受容体(TCR)を介するシグナルに加え、補助シグナル分子を介するシグナルが非常に重要な役割を果たしている。中でもCD28分子はT細胞の活性化促進において非常に重要な役割を果たしている。これまで、骨髄移植の副作用として問題となるGVH病の動物モデルにおいて、ドナーT細胞上のCD28を介するシグナルがGVH病の発症に決定的な役割を果たしていること、GVH病発症抑制はGVH誘導早期における短期間のCD28シグナル阻害で十分であることを明らかにしてきた(Ogawa et al. J. Immunol. 2001)。これまでのGVH病モデルマウスを用いた研究において、GVH病を誘導したホストマウスのT細胞は、誘導していないマウスのT細胞と比較し活性化レベルが高かった。そこで、Bm12マウスの脾細胞をB6マウスに移入することによって誘導される慢性GVH病の動物モデルにおいて、ホストにB6野生型マウスもしくはB6.CD28シグナル欠損マウスを用い、ホストT細胞や炎症環境がGVH病の発症に及ぼす影響を検討した。野生型マウスをホストとした場合は、自己抗体の産生を伴う全身性エリテマトーデス(SLE)様症状を示したのに対し、CD28の細胞内領域を欠失しCD28補助シグナルが伝達されないためT細胞が十分に活性化できないトランスジェニックマウス(CD28TM-Tg)をホストとした場合、皮膚の強い炎症、それに伴う耳介の脱落、リンパ組織の腫脹、脾臓におけるB細胞の消失、リンパ節内のB細胞の強い活性化、血清中のIgE抗体価の上昇が見られた。

2. 研究の目的

上述のように、同一のドナー細胞であっても、ホストの環境の違い(本研究ではCD28補助シグナルの有無)でGVH病の症状が大きく異なり、全身性エリテマトーデス(SLE)様症状を示す場合と、激しい皮膚の炎症が起こる全身性強皮症(SSc)様の症状を示す場合があることが分かってきている。SLE GVHとSSc GVHを比較することにより、病態の変化に関わるメカニズムを明らかにすることを本研究の目的とした。

また、SScの実験モデルはほとんどないため、本研究により新たなSScのモデルとして定義できれば、他の研究より作製された薬剤の効果を検討することに応用できる。さらに、本研究よりGVH病の症状の変化に関与する因子が同定されれば、それに対する阻害剤の開発など研究の発展が期待できる。

3. 研究の方法

Bm12マウスの脾細胞をB6マウスあるいはB6.CD28TM-Tgマウスに尾静脈内投与しGVH病モデルを誘導する。

経時的に観察し、外見的な炎症症状の変化

をスコア化する。

経時的に様々な臓器やリンパ組織の組織切片を作製し、炎症やリンパ球浸潤の程度、各組織の傷害の程度をスコア化する。

経時的に血清を回収し、血清中の抗体価やサイトカイン濃度を測定する。

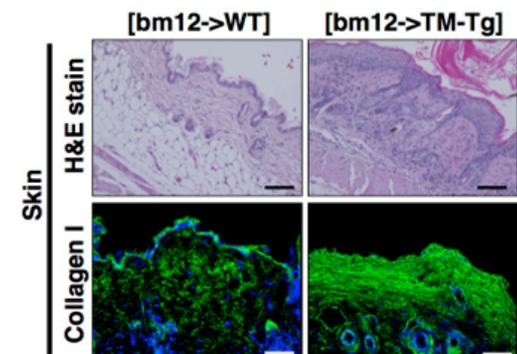
症状の違いに関与している可能性のあるサイトカインについて、中和抗体を用い、症状の発症における役割を明らかにする。

どの種類のT細胞サブセットがGVH病の症状に関与しているのかを検討するために、候補となるT細胞サブセットを野生型マウスより精製しCD28TM-Tgマウスに移入した後、GVH病を誘導する。

ホストマウスT細胞に発現するCD28分子を介するシグナルのGVH病の症状に対する影響を調べるため、CD28細胞内領域に変異を持ちCD28下流のシグナル伝達経路に異常があるマウスをホストに用いてGVH病を誘導する。

4. 研究成果

野生型マウスをホストとした場合と比較してCD28シグナル欠損(CD28TM-Tg)マウスをホストとしてGVHを誘導した場合、皮膚が肥厚しコラーゲンの蓄積する線維化が強く起こっていた。また、腎臓、唾液腺、肝臓、



脾臓へのリンパ球浸潤と線維化も亢進していた。

一方で、野生型マウスをホストとした場合で上昇する自己抗体価はCD28TM-Tgホストでは上昇は弱かった。また、血清中の抗体の特異性がそれぞれで異なっていることが明らかとなった。しかしながら、これら抗体の特異性と病状や病気の進行との関係は明らかではなく、今後の研究課題である。

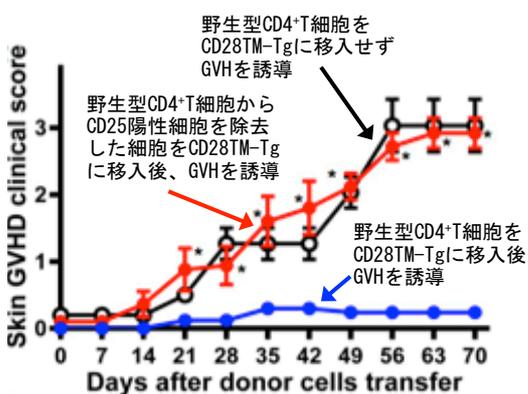
リンパ組織のCD4⁺T細胞および血清中のサイトカインを調べたところ、ドナーCD4⁺T細胞のIFN γ 産生はホストにより違いはなかった。一方、IL-4産生はCD28TM-Tgホストで高く、血清中のIL-5、IL-6、IL-10、IL-13の濃度もCD28TM-Tgホストで高かった。そこで、IL-4の機能を中和する抗体をGVH病の誘導時より投与したところ、明らかにSSc様症状が抑制された。従って、IL-4産生細胞あるいは産生されたIL-4がSSc様症状の発症に寄与していることが考えられる。

ある種のサイトカインの中和により線維化と炎症を伴うSSc様症状を緩和することができ、将来的には治療にも応用可能と思われる。

る。ただし、他の因子も SSc 様症状の誘導に関与しているものと思われる、さらなる解析により、より効果的な治療法の開発に繋がるものと期待される。

CD28 細胞内領域に変異を持ち、CD28 下流のシグナル伝達経路が部分的に阻害されている変異 CD28Tg マウスをホストに用いて GVH 病を誘導した。その結果、末梢 T 細胞の機能と制御性 T 細胞の分化に異常がある、CD28 の C 末側の PxxP モチーフに変異が導入された変異 CD28Tg マウスをホストに用いた場合、GVH 病の症状が SSc 様に近くなることが明らかとなった。そこで、末梢 T 細胞と制御性 T 細胞の SSc 様症状の発症への影響を調べるため、CD28TM-Tg マウスに野生型 T 細胞を移入した後 GVH 病を誘導したところ、SSc 様の症状は抑制され SLE 様の症状へと変化した。さらに野生型 T 細胞から CD4⁺ T 細胞の中の CD25 陽性細胞（主には制御性 T 細胞）を除去して CD28TM-Tg マウスへ移入した後 GVH 病を誘導した場合、SSc 様の症状に変化は生じなかった。

以上のことから、ホストマウスの制御性 T



細胞の数あるいは制御性 T 細胞の機能が GVH 病の症状に大きく影響していることが明らかとなった。症状のスイッチに制御性 T 細胞が関与していることは新しい知見であり、興味深い。制御性 T 細胞が GVH 病の誘導や症状に作用するメカニズムは明らかになっておらず、更に解析を行うことで、より詳細な GVH 病の発症機序が明らかにされるものと思われる。

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 3 件)

1. Ogawa, S., Ito, N., Watanabe, S., Watanabe, M., Inutake, Y., Sakurai, Y., Harada, Y., Kishimoto H., and Abe, R. CD28 signaling in primary CD4⁺ T cells: Identification of both tyrosine phosphorylation-dependent and independent pathway. *Int. Immunol.* 25, 671-681, 2013. (査読有)

2. Higo, K., Oda, M., Morii, H., Takahashi, J., Harada, Y., Ogawa, S., and Abe, R. Quantitative analysis by surface plasmon resonance of CD28 interaction with cytoplasmic adaptor molecules Grb2, Gads and p85 PI3K. *Immunol. Invest.* 43, 278-291, 2014. (査読有)

3. Watanabe, M., Nakajima, S., Ohnuki, K., Ogawa S., Yamashita, M., Nakayama, T., Murakami Y., Tanabe, K. and Abe, R. AP-1 transcription factor is involved in ICOS gene expression downstream of TCR/CD28 signaling and cytokine receptor signaling. *European Journal Immunology*, 42(7):1850-62, 2012. (査読有)

[学会発表] (計 16 件)

1. Akieda, Y., Nakamura, T., Wakamatsu, E., Ogawa, S., Watanabe, S., and Abe, R. The condition of host CD4⁺Cd25⁺ regulatory T cells determines the phenotype of chronic Graft-versus-Host Disease. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013, Makuhari Messe, Chiba, 2013 Dec.11-13

2. Nakamura, T., Akieda, Y., Ogawa, S., Watanabe, S., Wakamatsu, E., and Abe, R. The behavior of cytokines determines the cGVHD phenotype. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013, Makuhari Messe, Chiba, 2013 Dec.11-13

3. Ogawa, S., Yoshida, N., Sano, S., Ohtsuka, S., Nakamura, T., Akieda, Y., Watanabe, S., and Abe, R. Differential requirement for CD28 cytoplasmic motifs in T cell responses. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013, Makuhari Messe, Chiba, 2013 Dec.11-13

[図書] (計 0 件)

[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
<http://www.ribs.tus.ac.jp/immunology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 修平 (OGAWA, Shuhei)
東京理科大学・生命医科学研究所・助教
研究者番号：20385553

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：